

LORENDANE MILLENA DE CARVALHO

**FUNGO HELMINTÓFAGO *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Parascaris equorum***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de Magister Scientiae

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

C331f
2014

Carvalho, Lorendane Millena de, 1988-

Fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* no controle biológico de *Parascaris equorum* / Lorendane Millena de Carvalho. – Viçosa, MG, 2014.
x, 60f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Fungos helmintófagos. 2. *Parascaris equorum*.
3. Controle biológico. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

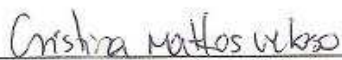
CDD 22. ed. 632.6

LORENDANE MILLENA DE CARVALHO

**FUNGO HELMINTÓFAGO *Pochonia chlamydosporia* NO CONTROLE
BIOLÓGICO DE *Parascaris equorum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

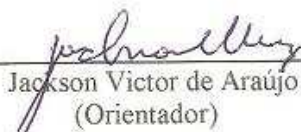
APROVADA: 20 de fevereiro de 2014.



Cristina Mattos Veloso



Fábio Ribeiro Braga
(Coorientador)



Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

“Eu segurei muitas coisas em minhas mãos, e eu perdi tudo; mas tudo que eu coloquei nas mãos de Deus eu ainda possuo.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado desde o momento em que nasci.

Aos meus pais, Firmino Carvalho e Eliene Braga, pelo amor incondicional, pela educação e princípios, por todos os seus ensinamentos. Vocês são a minha vida.

Aos meus irmãos, Gleidson Giordano e Bruna Mara, pelo amor, amizade, cumplicidade, e, acima de tudo, pelo exemplo a ser seguido. Vocês são a minha fonte de inspiração.

À minha avó, Maria Passos Braga, meu eterno amor. Sei que a senhora, mesmo não presente de corpo, continua torcendo e iluminando a conduta dos seus filhos, netos e bisnetos aqui na terra. Eu te amo.

Ao meu avô, Admar Braga, pelo amor e pelos inestimáveis momentos que passamos juntos, por cada história e cada risada. Agradeço a Deus por ter um avô como o senhor.

À minha sobrinha, Lara. Obrigada por ter dado um novo sentido à minha vida. Amo você de maneira incondicional.

Ao meu amigo e orientador, necessariamente nesta ordem, Professor Jackson Victor de Araújo. Obrigada pela inestimável orientação, e por me permitir realizar mais este sonho.

Ao meu amigo e co-orientador, Professor Fábio Ribeiro Braga, por tantos conselhos e ajuda imprescindível na realização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório: Juliana, Wendee, Alessandra, Rosane, Mariana, João Victor, Filipe, Ademir, José Geraldo (Tuim) e Samuel.

À secretária da Pós-Graduação, Rosi, pelas orientações e por sua gentileza.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Veterinária, pelo ensino e estrutura oferecidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

Por fim, agradeço aos meus animais, imprescindíveis em minha decisão de me tornar uma Médica Veterinária.

BIOGRAFIA

Lorendane Millena de Carvalho, filha de Firmino de Carvalho Filho e Eliene Braga de Carvalho, nasceu em 10 de Março de 1988, em Pirapora, Minas Gerais. Em Dezembro de 2005, concluiu o ensino médio no Colégio Cenecista de Pirapora. No ano de 2007, iniciou sua graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal do Espírito Santo – Alegre, ES. No ano de 2009, transferiu-se para a Universidade Federal de Viçosa, onde concluiu sua graduação em Medicina Veterinária, em Janeiro de 2012. Em Março de 2012 ingressou no Mestrado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em Fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 Equideocultura no mundo.....	17
2.2 Parascaris equorum.....	17
2.2.1 Ciclo biológico.....	18
2.2.2 Diagnóstico.....	18
2.2.3 Medidas de controle.....	19
2.3 Controle biológico.....	19
2.4 Fungos helmintófagos.....	21
2.4.1 Pochonia chlamydosporia.....	23
Referências.....	25
3. OBJETIVOS	
3.1 Objetivo geral.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
 CAPÍTULO 1 - Interaction of the nematophagous fungus Pochonia chlamydosporia and Parascaris equorum eggs in different culture media	
Abstract.....	34
1. Introduction.....	35
2. Material and Methods	
2.1 Obtaining Parascaris equorum eggs.....	36
2.2 Fungi.....	36
2.3 Experimental assay.....	36

2.4 Statistical analysis.....	37
3. Results.....	37
4. Discussion.....	39
5. Conclusion.....	42
References.....	46

CAPÍTULO 2 - Ação do extrato bruto do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Parascaris equorum*

Resumo.....	53
1. Introdução.....	54
2. Material e Métodos	
2.1 Obtenção dos ovos de <i>Parascaris equorum</i>	55
2.2 Fungos.....	55
2.3 Ensaio experimental.....	56
3. Resultados.....	57
4. Discussão.....	57
5. Conclusão.....	59
Referencias.....	61

4. CONCLUSÕES GERAIS.....	64
5. ANEXOS.....	65

RESUMO

CARVALHO, Lorendane Millena de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* no controle biológico de *Parascaris equorum***. Orientador: Jackson Victor de Araújo. Co-orientador: Fabio Ribeiro Braga.

O Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o quarto mundial. Somente a produção de cavalos movimenta R\$ 7,3 bilhões anuais. Com relação aos helmintos que geram prejuízos à equideocultura mundial, o *Parascaris equorum* pode ser destacado, em função dos prejuízos permanentes sobre a capacidade funcional de órgãos como pulmão e fígado, causados pela migração das larvas. Além disso, pesquisas sobre o controle biológico de helmintos de interesse veterinário vêm ocorrendo ao longo dos anos, na tentativa de se encontrarem medidas que venham somar forças ao controle convencional, na busca por melhores condições de sanidade e produtividade animal. Assim, os objetivos do presente trabalho foram: avaliar a ação, in vitro, de dois isolados do fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) crescidos em diferentes meios de cultura, sobre ovos de *Parascaris equorum*; avaliar a ação do extrato bruto enzimático do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *P. equorum*; analisar a produção enzimática do fungo *P. chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) após 21 dias de interação com ovos de *P. equorum*. Foram utilizados dois isolados do fungo *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4), provenientes da micoteca do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Os ovos de *P. equorum* foram obtidos por meio de dissecação de exemplares fêmeas adultos, recuperados de fezes de potros naturalmente infectados, após a

administração de citrato de piperazina tetrahidratado. Ao final de um período de 21 dias de interação, foram observados percentuais de destruição dos ovos de *P. equorum* de 41,9% e 48,3%, para os isolados VC1 e VC4, respectivamente. A ação do extrato bruto enzimático do fungo *P. chlamydosporia* (isolado VC4) apresentou um percentual de destruição de 36,5, após um período de 48 horas de interação. Os resultados apresentados no presente trabalho sugerem que o fungo *Pochonia chlamydosporia*, bem como o seu extrato bruto enzimático, podem ser utilizados para auxiliar no controle de ovos embrionados do ascarídeo *Parascaris equorum*.

ABSTRACT

CARVALHO, Lorendane Millena de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February of 2014. **Helminthophagous fungi *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Parascaris equorum***. Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-adviser: Fabio Ribeiro Braga.

Brazil has the largest herd of horses in Latin America and the fourth worldwide. Only the production of horses moves \$ 7.3 billion annually. With helminths that generate losses to world equideoculture the *Parascaris equorum* can be highlighted based on the permanent damage on the functional capacity of organs such as lung and liver, caused by the migration of these larvae. Furthermore, research on the biological control of nematodes in veterinary interest have occurred over the years in an attempt to find measures that will add strength to the conventional control, the search for better conditions of animal health and productivity. Thus, research on the biological control of nematodes in veterinary interest have occurred over the years in an attempt to find measures that will add strength to the conventional control, the search for better conditions of animal health and productivity. The objectives of this study were to assess the efficacy, in vitro, of two isolates (VC1 and VC4) of helminthophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* grown in different culture media on *Parascaris equorum* eggs; evaluate the action of a crude enzymatic extract of fungus *P. chlamydosporia* on eggs *P. equorum*; analyze the enzymatic production of fungus *P. chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4) after 21 days of interaction with *P. equorum* eggs. Was used two isolates of the fungus *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) arising from mycology collection Laboratory of Parasitology, Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Viçosa. The *P. equorum* eggs were

obtained by dissection of adult female specimens recovered from feces of foals naturally infected after administration piperazine citrate tetrahydrate. At the end of a period of 21 days of interaction, were observed percentage of *P. equorum* eggs destruction of 41.9 % and 48.3 % for isolates VC1 and VC4, respectively. The action of a crude enzymatic extract of the fungus *P. chlamydosporia* (isolated VC4) showed a percentage of 36.5% of destruction, after a 48 hours period of interaction. The results presented in this work suggest that the fungus *Pochonia chlamydosporia*, and its crude enzymatic extract, can be used to assist in the control of embryonated eggs of the ascarid *Parascaris equorum*.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o quarto mundial. Somente a produção de cavalos movimenta R\$ 7,3 bilhões anuais. Se somado aos muares (mulas) e asininos (asnos) são 8 milhões de cabeças. A maior população brasileira de equinos encontra-se na região Sudeste, seguida das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte. A região Nordeste, além do rebanho equino, concentra o maior registro de asininos e muares (MAPA, 2014).

Por muitos anos, os equídeos foram utilizados unicamente como meio de transporte. Contudo, é crescente a utilização desses animais para outras finalidades, como lazer, esportes e terapia (Lima et al., 2006). O rebanho compõe a base do chamado Complexo do Agronegócio Cavalo, que gera em torno de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. Além disso, o Brasil ocupa a 8ª posição entre os países exportadores de carne equina, exportando para países como Bélgica, Holanda, Itália, dentre outros (MAPA, 2014).

Com relação aos helmintos que geram prejuízos à equideocultura mundial, o *Parascaris equorum* pode ser destacado, em função dos prejuízos permanentes sobre a capacidade funcional de órgãos como pulmão e fígado, causados pela migração das larvas.

O *P. equorum* é um ascarídeo de ocorrência mundial, parasito de equídeos jovens, sendo encontrado no intestino delgado desses animais (Reinemeyer & Nielsen, 2009). Infecções maciças com ascarídeos adultos podem gerar cólicas e levar a quadros de enterite moderada, além de interferir no desenvolvimento dos

animais, gerando prejuízos ao crescimento corporal em função de alterações na capacidade de digestão e absorção dos nutrientes (Bowman et al, 2006).

A utilização indiscriminada de drogas antiparasitárias, realizada sem orientação profissional, a falta de rotação das bases utilizadas e a administração de doses inferiores às recomendadas, já são refletidas em muitos países, com relatos de resistência parasitária. Dentre as drogas com ocorrência de resistência já relatada, incluem-se principalmente as lactonas macrocíclicas. Já existem relatos de resistência a essas bases em países como Estados Unidos, Itália, Canadá e Brasil (Craig et al., 2007, Lyons et al., 2008, Veronesi et al., 2009, Hearn and Peregrine, 2003, Slocombe et al., 2007 e Molento et al., 2008).

Tendo em vista o crescente desenvolvimento de resistência às drogas antiparasitárias, fazem-se necessárias alternativas que reduzam a dependência das bases químicas para a realização do controle das parasitoses gastrintestinais, em todo o mundo. Assim, pesquisas sobre o controle biológico de helmintos de interesse veterinário vêm ocorrendo ao longo dos anos, na tentativa de se encontrarem medidas que venham a somar ao controle convencional, na busca por melhores condições de sanidade e produtividade animal.

Nesse aspecto, o controle biológico, realizado com fungos predadores helmintófagos, vem mostrando-se uma alternativa promissora. Os fungos helmintófagos são os antagonistas mais pesquisados dentro do controle biológico, em função de apresentarem bons resultados na redução de populações daqueles parasitos, demonstrando serem viáveis não só em condições laboratoriais, mas também em condições de campo (Larsen 1999).

De acordo com Araújo et al. (2004), os fungos helmintófagos são divididos em três grupos, denominados endoparasitas, predadores e oportunistas. Segundo Ferreira et al. (2008), existe um quarto grupo, denominado fungos produtores de metabólitos tóxicos, que, embora seja classificado como fungo nematófago, existem poucos estudos, envolvendo esses organismos, que elucidem o efeito das possíveis substâncias tóxicas produzidas pelos mesmos no controle de nematóides.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Equideocultura no mundo

De acordo com a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), a população mundial de equídeos tem se mostrado estável nas últimas décadas e, atualmente, está estimada em 113.473.522 cabeças, sendo 58.770.171 de equinos, 43.496.677 de asininos e 11.206.674 de muares (FAO, 2008). Com relação ao Brasil, a população de equídeos é estimada atualmente em 7.986.023 cabeças, das quais 5.541.702 são de equinos, 1.130.795 de asininos e 1.313.526 de muares, sendo a população nacional de equinos a quarta maior do mundo (IBGE, 2008). O rebanho brasileiro envolve mais de 30 segmentos, sendo responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2014).

2.2 *Parascaris equorum*

O *Parascaris equorum* é o maior nematóide que acomete os equídeos, sendo os parasitos adultos encontrados no intestino delgado de equinos jovens. Animais parasitados pelo *P. equorum* podem manifestar uma série de sinais clínicos. Em muitos casos, os animais apresentam letargia, perda de peso, tosse, descarga nasal e cólica, e, dependendo da carga parasitária, podem ocorrer casos de óbito (Lyons et al, 2008). A forma de infecção do equino jovem é através da ingestão de ovos deste parasito, que possuem casca grossa e “grudenta” e são resistentes, o que permite sua presença e viabilidade, por longos períodos, no ambiente e nos tetos da fêmea, sendo ingeridos durante a mamada.

Os equinos desenvolvem excelente imunidade contra o *Parascaris equorum*, fato este que explica a não ocorrência de infecção por este ascarídeo em animais com idade superior a 24 meses (Reinemeyer & Nielsen, 2009). Contudo, os danos causados aos tecidos do fígado e pulmão, devido à migração das larvas deste parasito, podem levar à redução da capacidade funcional destes órgãos, causando, assim, prejuízos permanentes aos animais que foram parasitados quando jovens (Bowman et al. ,2006).

2.2.1 Ciclo biológico

Após a ingestão dos ovos, ocorre a eclosão destes e as larvas atravessam a parede do intestino delgado, ganhando a circulação sanguínea e sendo levadas, via circulação portal até o fígado, onde haverá migração pelo tecido hepático. Após o período de, aproximadamente, sete dias, as larvas ganham, novamente, a circulação sanguínea, chegando até os pulmões e invadem os alvéolos pulmonares, onde irão completar a primeira muda. Após esta fase, a larva ascende pelo muco da árvore traqueobrônquica, atingindo o lúmen do esôfago, onde serão deglutidas e retornarão ao intestino delgado, para ocorrer a muda final e atingirem a maturidade (Bowman et al 2006, Monteiro 2010).

2.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico do parasitismo por *Parascaris equorum* é realizado pela detecção da presença de ovos nas fezes dos animais, por meio de exame parasitológico por técnicas de flutuação (Monteiro, 2010).

2.2.3 Medidas de controle

De acordo com Bowman et al. (2006), a resistência ambiental dos ovos infectantes de *P. equorum* é um ponto relevante na epidemiologia das infecções por esse ascarídeo. Assim, a higienização de baias, com a devida remoção das fezes é um fator de grande importância em um programa de controle de infecções por *P. equorum*. Além do cuidado com o ambiente onde os animais vivem, o tratamento com anti-helmínticos é realizado com os compostos à base de piperazina, fenbendazol, pirantel, ivermectina, dentre outros (Bowman et al. ,2006). Contudo, vale ser ressaltada a descrição de ocorrência de resistência (poligênica) do *P. equorum* as bases do grupo das lactonas macrocíclicas (Veronesi, 2010; Kaplan et al., 2006; Reinemeyer e Marchiondo, 2007; Molento et al., 2008)

2.3 Controle biológico

O conceito de controle biológico versa sobre a utilização de antagonistas naturais, os quais se encontram presentes no meio ambiente, visando o controle de agentes causadores de perdas e prejuízos para alguma atividade de interesse (Gronvold et al.,1996). De acordo ainda com esses autores, os antagonistas utilizados para a realização do controle atuam sobre as formas de contaminação do ambiente, reduzindo, assim, a carga de contaminação ambiental e levando a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola à redução a um limiar subclínico e “economicamente aceitável”. O controle biológico não atua sobre os estádios internos dos parasitos, mas em suas fases ambientais ou de vida livre, seja sob a forma de larvas ou ovos. Aqueles autores

ainda destacam o fato dessa forma de controle causar menos efeitos negativos ao ambiente, se comparada aos métodos químicos.

De acordo com Freitas et al. (2006), os mecanismos de controle biológico são o parasitismo, a predação, a competição e a antibiose. Muitos microrganismos já foram relatados como antagonistas de nematóides, dentre os quais, protozoários, turbelários, tardígrados, oligoquetas, insetos, ácaros, nematóides, vírus, bactérias e fungos (Mankau, 1980; Lisek e Nigenda, 1989; Stirling, 1991; Waller e Larsen, 1993; Gronvold et al., 1996). Contudo, Mendoza-de-Gives (1999) descreve que somente algumas espécies de fungos e bactérias demonstram ter potencial para utilização em programas de controle biológico de nematóides.

Os fungos helmintófagos são antagonistas dos nematóides e são comumente encontrados em solos naturais. Contudo, a sua atividade e quantidade no solo são incertas, já que necessitam de uma fonte primária de nutrição (Jaffee et al., 1996).

Com relação à viabilidade de aplicação destes organismos em condições de campo, Araújo et al. (1999) destacam que a resistência à passagem pelo trato gastrointestinal é uma característica importante em fungos helmintófagos empregados nos programas de controle biológico, quando se deseja o desenvolvimento de formulações de uso oral que permitam o controle de formas parasitárias no ambiente.

Atualmente, o método mais comum para a realização do controle de helmintos é a utilização de anti-helmínticos. No entanto, esse método apresenta algumas desvantagens como presença de resíduos na carne e no leite, risco de impacto ambiental, além do desenvolvimento iminente de resistência dos parasitos

(Waller e Faedo, 1993; Suarez, 2002). Segundo Gamarro e Castanys (1993), a resistência adquirida às classes químicas de anti-helmínticos é um grave problema enfrentado no tratamento das infecções helmínticas na atualidade.

Assim, Mota et al. (2003) destacam que os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade demonstram a necessidade da implantação de programas integrados de controle parasitário, que visem assegurar a saúde dos organismos vivos e ambientes menos contaminados. A viabilidade de utilização de fungos helmintófagos no controle das helmintoses dos animais de interesse veterinário vem sendo avaliada por diversos pesquisadores em todo o mundo (Braga et al. 2008, 2010, 2012 b, Araujo et al. 2012).

A administração de fungos helmintófagos aos animais domésticos é considerada uma proposta promissora, pois o emprego desses fungos tem apresentado uma boa atividade no que diz respeito ao controle dos estágios de vida livre dos nematóides nas pastagens, reduzindo, assim, a ocorrência de reinfestações (Barger, 1999; Braga e Araújo, 2014).

2.4 Fungos helmintófagos

Com relação à utilização de fungos helmintófagos para controle de parasitoses de equídeos, muitos trabalhos apontam essa alternativa como uma forma viável e promissora, com o intuito de redução da carga parasitária no ambiente, reduzindo, dessa maneira, a ocorrência de reinfecção dos animais e a frequência das necessidades de utilização de bases químicas no controle de parasitos (Braga et al., 2009; Paz-Silva et al., 2011).

A utilização de fungos predadores para o controle de populações de nematóides que acometem equinos já foi anteriormente estudada por Braga et al. (2010), que provaram a ação desses fungos sobre ovos de *Oxyuris equi*, além de Braga et al. (2009) e Tavela et al. (2012), que pesquisaram a ação dos fungos helmintófagos sobre larvas de terceiro estágio (L3) de Ciatostomíneos, obtendo resultados significativos na redução destas. Em outra oportunidade, Silva et al. (2010) avaliaram a ação do fungo ovicida *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC1) sobre ovos de *Anoplocephala perfoliata*, e provaram a sua capacidade de destruir os ovos deste parasita.

Isolados de *Pochonia chlamydosporia* também já foram utilizados em pesquisas anteriores, e apresentaram bons resultados no que diz respeito à sua capacidade ovicida sobre ovos de nematóides de interesse na Medicina Veterinária equina, como *Oxyuris equi* e *Anoplocephala perfoliata* (Braga et al., 2010, Silva et al., 2010).

Para que um fungo seja efetivo como controlador biológico, esse deverá estar presente e ativo nas fezes, no solo e ambiente, para possibilitar a interação com as formas pré-parasitárias (Faedo et al., 2002). Larsen (1999) menciona que é necessária uma seleção de fungos helmintófagos que possam atravessar o trato gastrointestinal dos animais, mantendo suas qualidades de crescimento e predação nos ovos e suas fases pré-parasitárias nas fezes.

A utilização de fungos no controle biológico de helmintos parasitos gastrintestinais tem o objetivo de auxiliar o controle químico. O ideal é que esse controle seja realizado não só em condições de previsão de maior infestação de

pastagens por ovos e ou larvas, mas também quando houver melhores condições para o crescimento dos fungos no meio ambiente. Esta ação irá prevenir, com isso, o parasitismo clínico e a perda de produtividade, fornecendo uma quantidade de larvas suficiente aos animais para provocar o desenvolvimento de imunidade adquirida naturalmente (Waller e Faedo, 1993).

2.4.1 Pochonia chlamydosporia

A espécie *Pochonia chlamydosporia* (Sin. *Verticillium chlamydosporium*) é um deuteromiceto, parasito facultativo de ovos de nematóides e é pertencente ao grupo dos fungos helmintófagos denominados “ovicidas”. Essa espécie parasita ovos de helmintos por meio de estruturas conhecidas como apressórios, formados a partir de hifas indiferenciadas quando em contato com esses ovos. Com relação à produção enzimática pelo *P. chlamydosporia*, a existência de uma protease serino-alcalina, denominada VCP1, foi sugerida por Morton et al. (2003), sendo considerada como um dos elementos que caracterizam seu mecanismo de ação.

As hifas desse fungo penetram a casca do ovo por meio de pequenos poros, existentes na camada vitelínica. Isso causa alteração na permeabilidade da casca e leva à expansão do seu volume. Esse processo leva a uma divisão da camada vitelínica, e o fungo coloniza o conteúdo do ovo (Araújo et al, 2004). O enfraquecimento da camada vitelínica está ligado à ação de enzimas hidrolíticas, proteases e quitinases, que removem a membrana vitelínica mais externa e degradam a quitina da casca (Kerry, 2000).

A ação ovicida do *P. chlamydosporia* sobre ovos de helmintos tem sido testada com sucesso, tanto em condições laboratoriais, quanto em condições de

campo (Braga et al, 2010, Frassy et al, 2010). Além disso, Esteves et al. (2009) citam que alguns trabalhos vêm demonstrando a capacidade de isolados fúngicos de *P. chlamydosporia* na produção de extratos enzimáticos sobre vários tipos de substratos sólidos, dentro os quais, polissacarídeos, proteínas e lipídeos.

Referencias

ARAUJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; SOARES, F. E. F.; FERREIRA, S. R.; TAVELA, A.O.; FRASSY, L. N.; ALVES, C. D. F.; CARVALHO, G. R. Control of *Strongyloides westeri* by Nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* (Impresso). 21,157-160. 2012.

ARAÚJO, J .V; MOTA, M. DE A. ; CAMPOS, A. K. . Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Seropédica-RJ*. 13, 165-170. 2004.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. *Revista brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.0, p.165-169, 2004a.

ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. *Veterinarski Arhiv*. 69 (2), 69- 78. 1999.

BARGER, I.A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. *International Journal for Parasitology*. 29, 41-47. 1999.

BOWMAN, D.D. et al., *Parasitologia veterinária de Georgis*. 8. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2006.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAUJO, J.M.; FERREIRA, S.R. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Parasitology*. 168, 264-268. 2010.

BRAGA, F.R. ; ARAÚJO, J.V. ; SILVA, A.R. ; ARAUJO, J.M. ; CARVALHO, R.O. ; CAMPOS, A.K. ; TAVELA, A.O. ; FERREIRA, S.R.; FRASSY, L.N. ; ALVES, C.D.F. *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* as possible biological control agents of *Oxyuris equi* and *Austroxyuris finlaysoni*. *Journal of Helminthology*. 84, 21. 2010.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 71-82. 2014.

CRAIG, T.M.; DIAMOND, P.L.; FERWERDA, N.S.; THOMPSON, J.A. Evidence of ivermectin resistance by *Parascaris equorum* on a Texas horse farm. *Journal of Equine Veterinary Science* . 27, 67-71. 2007.

ESTEVEZ, I.; PETEIRA, B.; ATKIM, S.D.; MAGAN, N.; KERRY, B. Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycological research*. 113, 867 – 876. 2009.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S.O.; YEATES, G.W.; HÖGLUND, J.; WALLER, P.J. Growth of the Fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. *Biological Control*. 23 (1), 64-70. 2002.

FERREIRA, P.A; FERRAZ, S.; LOPES, E.A.; FREITAS, L.G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. 2 (3), 15-21. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor> Acesso em: 21/01/2014.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. Introdução a nematologia. Universidade Federal de Viçosa, 2006, p. 57-59 (Caderno Didático, 58).

GAMARRO, F.; CASTANY, S. Mecanismos de resistência a fármacos em parasitos. In: LÓPEZ, L.R.; LÓPEZ, M.C. *Parasitologia Molecular*. Conselho Superior de Investigações Científicas, Madrid, 1993. 135-145p.

GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Veterinary Parasitology*. 64 (1-2), 47-64. 1996.

HEARN, F.P.D.; PEREGRINE, A.S. Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 223, 482- 485. 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da pecuária municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 08/01/2014.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 250p.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>> Acesso em 05/01/2014.

KAPLAN, R.M.; REINEMEYER, C.R.; SLOCOMBE, O.; MURRAY, M.J.
Confirmation of ivermectin resistance in a purportedly resistant Canadian isolate of *Parascaris equorum* in foals. In: Proceedings of American Association of Veterinary Parasitology, 51st Annual Meeting, pp. 69–7. 2006.

JAFEE, B.A.; STORNG, D.R.; MULDOON, A.E. Nematode-trapping fungi of the a natural scrubland: tests for food chain involvement. *Mycologia*. 88 (4), 444-564. 1996.

KERRY, B.R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. 38 (1), 323-441. 2000.

LARSEN, M. Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*. 29, 139-146. 1999.

MANKAU, R. Biological control of nematodepests by natural enemies. *Annals Review Phytopathology*. 18, 415-440. 1980.

MENDOZA-de-GIVES, P. Interaction between nematodes and biocontrol agents with potential for use in biomanagement systems. Nottingham: University of Nottingham, 1999. 219 p. (Doctor of Philosophy Thesis).

MORTON, O.C.; HIRSCH,P.R.; PEBERDY,J.P.; KERRY, B.R. Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* . *Mycological Research*. 107, (1), 38-46. 2003.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 23 (3), 93-100. 2003.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de autodeshelmintización del suelo. *Salud Pública de México*. 31 (6), 763-771. 1989.

LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; IONITA, M.; COLLINS, S.S. Evaluation of parasitocidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitology Research*. 103, 287-291. 2008.

MOLENTO, M.B.; ANTUNES, J.; BENTES, R.N.; COLES, G.C. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Record*. 162, 384-385. 2008.

MONTEIRO, S.G. *Parasitologia na Medicina veterinária*. São Paulo: Roca, 2010.

PAZ-SILVA, A.; FRANCISCO,I.; VALERO-COSS, R.O.; CORTIÑAS, F.J.; SÁNCHEZ J.A.; FRANCISCO,R.; ARIAS, M.; SUÁREZ, J.L.; LÓPEZ-ARELLANO,M.E.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; DE GIVES, P.M. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary Parasitology*. 30, 179(1-3):277-82. 2011.

REYNEMEIER, C.P.; MARCHIONDO, A.A. Efficacy of pyrantel pamoate in horses against a macrocyclic lactone-resistant isolate of *Parascaris equorum*. In: *Proceedings of American Association of Veterinary Parasitology, 52nd Annual Meeting*, p. 78. 2007.

REINEMEYER, C.R.; NIELSEN, M.K. Parasitism and Colic. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* . 25, 233-245. 2009

SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R, ALVES, C.D.F.; RIBEIRO FILHO, J.D. Destruction of *Anoplocephala perfoliata* eggs by the Nematophagous Fungus *Pochonia chlamydosporia*. *Journal of Equine Veterinary Science*. 30, 12. 2010.

SLOCOMBE, J.O.D.; DE GANNES, R.V.; LAKE, M.C. Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoato. *Veterinary Parasitology*. 145, 371–376. 2007.

STIRLING, G.R.; WEST, L.M. Fungal parasites of root-knot nematodes eggs from tropical and sub tropical regions of Austrália. *Australasian Plant Pathology*. 20 (4), 149-154. 1991.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Veterinary Research*. 33 (5), 563-573. 2002.

TAVELA, A.O. ; ARAÚJO, J.V. ; BRAGA, F.R. ; ARAÚJO, J.M. ; MAGALHÃES, L.Q. ; SILVEIRA, W.F. ; BORGES, L.A. . In vitro association of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Pochonia chlamydosporia* (VC1) to control horse cyathostomin (Nematoda: Strongylidae). *Biocontrol Science and Technology* (Print). 22, 607-610. 2012.

VERONESI, F; FIORETTI, D.P; GENCHI, C. Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals? *Veterinary Parasitology*. 172, 164–167. 2010.

VERONESI, F.; MORETTA, I.; MORETTI, A.; FIORETTI, D.P.; GENCHI, C. Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Veterinary Parasitology*. 161, 138-141. 2009.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the freeliving stages of nematodes parasites of sheep: screening studies. *Veterinary Parasitology*. 49 (4), 285-297. 1993.

WALLER, P.J.; LARSEN, M. The role the nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *International Journal for Parasitology*. 23, 539-546. 1993.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a ação, in vitro, de dois isolados do fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) sobre ovos de *Parascaris equorum*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ação, in vitro, de dois isolados do fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) crescidos em diferentes meios de cultura, sobre ovos de *Parascaris equorum*, após 21 dias de interação;
- Avaliar a ação do extrato bruto enzimático do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *P. equorum* após 48 horas de interação;

CAPÍTULO 1

Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media

Journal of Basic Microbiology (impact factor 1.198) 53, 1-6.

Doi: 10.1002/jobm.201300586

(2013)

Abstract

Research involving the use of nematophagous fungi in the biological control of parasites of interest to veterinarians has occurred over recent years, with promising results. This article reports the infection of *Parascaris equorum* eggs by the fungus *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4). Six groups were formed for each isolate, with six different culture media: 2% water– agar (2% WA); agar–chitin (AC); YPSSA (yeast extract, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, soluble starch); AELA extract (starch + water + agar); 2% corn-meal–agar (2% CMA); and 2% potato dextrose–agar (2% PDA). A total of 1000 eggs of *P. equorum* were transferred to each plate containing isolates grown for a period of 7 days (treatment group). Also, 1000 eggs were added to each plate without fungus (control group). The plates were kept in an environmental chamber at 25 °C in the dark for 21 days. After, we analyzed the effects on ovicidal activity: effect 1 (accession shell); effect 2 (penetration hyphae); and effect 3 (destruction of the eggs). No differences were observed in the destruction of eggs between the two isolates. The decreasing effectiveness of the different culture media was: PDA (38.9%); CMA (38.3%); WA (36.7%); YPSSA (36.45%); and AC (32.5%). The highest percentage egg destruction was observed when the strains were grown in culture medium AELA (44.9%); this was the best medium.

Keywords: Nematophagous fungi; Biological control; Ovicidal fungi; Equine *Ascarididae*; Culture medium

1. Introduction

Ovicidal nematophagous fungi, especially the species *Pochonia chlamydosporia* (synonymous: *Verticillium chlamydosporium*), have been studied under natural and laboratory conditions to investigate control of helminth infections (mainly roundworms) in animals [1, 2]. The aim of biological control is to reduce the parasite load in the environment, minimize the occurrence of reinfection for animals and decrease the frequency of use of chemical bases in the control of parasites in equines [3, 4].

Infection by *Parascaris equorum* is common in young horses and donkeys. It may cause cramps, present as moderate enteritis, interfere with the development of animals, impeding body growth, and is fatal in some cases [5–9]. The infection is acquired through ingestion of embryonated eggs that are present in the environment, this being one of the classical pathways of parasitism [10, 11]. The treatment of roundworm infections in horses caused in particular by *P. equorum* relates to the use of anthelmintics; however, apart from some successful experiences in the past, some drugs already have low effectiveness in control, mainly due to the development of parasitic resistance [12–15].

Horses develop excellent immunity against *P. equorum*, which explains the non-occurrence of infection in older than 24 months [11]. However, damage to the liver and lung tissues due to the migration of the larvae of this parasite can lead to reduced functional capacity of these organs, thereby causing permanent damage to the animals that were infected when young [7]. Thus, environmental decontamination of *P. equorum* eggs seems to be an interesting measure that should

be further investigated, especially using ovicidal antagonists present in the environment. The present study aimed to test the infection of *P. equorum* eggs by the fungal species *P. chlamydosporia* (isolates VC1 and VC4).

2. Materials and methods

2.1 Obtaining *Parascaris equorum* eggs

The eggs of *P. equorum* were obtained by dissection of adult female specimens obtained from the feces of naturally infected foals, after administration of 28 g per 80 kg live weight of piperazine citrate tetrahydrate (PROVERME[®], Brazil, ©TORTUGA). Subsequently, the eggs were rinsed in distilled water (10 times for 5min) and centrifuged at 1000 rpm. The supernatant was discarded and the eggs obtained were kept in distilled water under refrigeration (4 °C) until required.

2.2 Fungi

We used two isolates (VC1 and VC4) of the nematophagous fungus *P. chlamydosporia*. These isolates were from soil obtained from the city of Viçosa, Minas Gerais (latitude 20°45'20"00"S, longitude 42°52'04"00"W), southeast of Brazil, and had been kept in tubes containing 2% cornmeal– agar (2% CMA) medium at 4 °C in the dark in the Laboratory of Parasitology, Department of Veterinary, Federal University of Viçosa, Brazil.

2.3 Experimental assay

Six groups were formed for each isolate (VC1 and VC4) in Petri dishes of 4.5cm diameter containing 10 ml of culture medium. The media used were: 2% water–agar (2% WA); agar–chitin (AC); YPSSA (yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, soluble starch), AELA extract (starch + water + agar); 2% CMA; and

2% potato dextrose–agar (2% PDA). Six repetitions were performed for each group. A total of 1000 *P. equorum* eggs were transferred to each plate, where fungal isolates had been previously grown for a period of 7 days (treated group); 1000 eggs were added to each plate without fungus (control group). The plates were kept in an environmental chamber at 25 °C in the dark. Readings were made after 21 days. To perform the readings, 100 eggs per plate were removed using a spatula and placed on the surface of a strip containing one drop of blue Aman. The appearance of the eggs was evaluated with the aid of a light microscope with a 40x objective regarding the parameters of ovicidal activity, namely: effect type 1 (biochemical and physiological effect, no change of the eggshell and the embryo); effect type 2 (morphological alteration of the eggshell and embryo/penetration hyphae); and effect type 3 (properly recognized as “destruction of the eggs”) according to the technique of Lysek et al. [16] and Braga et al. [17].

2.4 Statistical analysis

Was used the program BioEstat 5.0 for the statistical analyses. The data for each interval observation were analyzed by the non-parametric Friedman’s test at the 1 and 5% levels of significance [18].

3. Results

Table 1 shows the type 1 (biochemical and physiological effect, no change of the eggshell and the embryo), 2 (morphological alteration of the eggshell and embryo/ penetration hyphae), and 3 (properly recognized as “destruction of the eggs”) effects of the isolates VC1 and VC4 in the different culture media tested. The different culture media showed ovicidal activity when they were supplemented with

chitin (AC), starch (AELA), corn (CMA), potato (PDA), and yeast extract (YPSSA). At the end of 21 days, was observed that eggs were destroyed in all media tested with the fungus *P. chlamydosporia* (VC1 and/or VC4). For effect type 3 (destruction of eggs), the best culture medium was AELA, where after 21 days the percentage of destruction was 44.9% when compared with other culture media. Next in order of decreasing effectiveness of ovicidal effectiveness are: PDA (38.9%); CMA (38.3%); WA (37.7%); YPSSA (36.45%); and AC (32.5%).

On the other hand, no difference was observed ($p>0.05$) between VC1 and VC4, the two tested isolates. However, the largest absolute values (destruction of eggs) were found for the isolate VC4 (WA, 38.6%; AC, 35.4%; AELA, 48.3%; and YPSSA, 40.4%). The isolate VC1 showed higher absolute values for the destruction of eggs in the culture media CMA (39.1%) and PDA (41.9%).

For effect type 2, which assumes adhesion and penetration of hyphae, but without destruction of eggs, isolate VC4 showed higher absolute values.

Interaction of the hyphae of the fungus *P. chlamydosporia* (isolates VC1 and/or VC4) with *P. equorum* eggs at the end of 21 days can be seen in Fig. 1a–i. In Fig. 1a–c, adhesion of hyphae of the fungus on the surface of the eggs can be observed; however, there is no morphological damage to the shell (effect 1). Figure 1d–f shows the adhesion and penetration of hyphae and some morphologic modification of the eggs (effect 2). In Fig. 1g–i, there is destruction of eggs and possibly not a viable embryo, characterizing effect 3.

4. Discussion

The present study was performed in order to evaluate the ovicidal activity of *P. chlamydosporia*, an ovicidal fungus, as a biological control strategy in laboratory conditions. Moreover, because of parasitic resistance described above [12–15] research now needs to provide one more control tool in addition to chemical control. However, the mechanism of interaction of *P. chlamydosporia* in respect of its ability to destroy *P. equorum* eggs in supplemented culture media is unknown.

Two isolates of the fungus *P. chlamydosporia* was used. Among the fungus's advantages are its production of chlamydospores (good feature of predation), it has already been studied in test passage through the digestive tract of horses [19]. However, there is a lack of study that point to the best culture medium, unless conditions for maintenance of the isolates in the laboratory are met. Some differences in the constitution of the culture media in which the isolates of *P. chlamydosporia* were grown during this study should be better explained. The enzymatic mechanisms upon accession and subsequent destruction of the eggs have been suggested by various authors [20–22].

The culture medium 2% WA has proved an excellent means to visualize the ovicidal activity of fungi of the genera *Paecilomyces* and *Pochonia*. However, this culture medium is poor in relation to the availability of carbon and nitrogen, which has been shown in several papers by our group [17, 23, 24]. For effect type 3, isolate VC1 showed 36.8% while VC4 showed mean of 38.6% ovicidal activity. On the other hand, the culture media 2% CMA and 2% PDA have been used in ovicidal

activity assays with the isolates VC1 and VC4; they are a rich source of nutrition and support activity of saprophytic strains [17].

The culture medium AC is a supplemented medium that has been demonstrated to be a good provider of carbon and nitrogen for nematophagous fungi. Braga et al. [25] proposed that this culture medium, as it is based on chitin, admittedly a path by which the fungus exerts its enzymatic activity, can be used for the growth of their isolates.

Regarding the culture medium AELA, in laboratory tests there is a greater production of fungal structures (or conidia and chlamydospores). Accordingly, in the present study, it proved its efficiency due to its supply of the nutrients (nitrogen and carbon) to the isolates tested (Mota et al., 2002). On the other hand, this may suggest amylolytic enzyme activity in the parasitized eggs of *P. equorum*. Likewise, the YPSSA culture medium comprises yeast extract. In the present study using YPSSA, ovicidal or enzyme activity only performed better than culture medium AC; however, in respect of absolute values, the VC4 isolate fared comparatively worse in the culture medium AELA. Braga et al. [22] proposed positive enzymatic activity (proteolytic, lipolytic and amylolytic) detected in agar supplemented for isolates VC1 and VC4 on eggs of *Oxyuris equi*, an equine intestinal nematode. In this study, no differences were found in ovicidal activity between VC1 and VC4. Likewise, in the present study, no differences were found in the activity of VC1 and VC4 on the *P. equorum* eggs. However, ovicidal percentage values for the two studies were different. In the work of Braga et al. [22] after 15 days, the percentage destruction of the eggs in the culture medium supplemented with starch was 68 and 78% for VC1 and VC4, respectively, whereas in the present study the percentage destruction was

41.5 and 48.3%, respectively. This difference in percentage can be explained by the shell morphology of *O. equi* eggs, compared with thicker-shelled eggs of *P. equorum*, which possibly suggests a greater efficiency in thinner-shelled eggs.

Research involving the use of nematophagous fungi in the biological control of parasites of interest to veterinarians has occurred over recent years, with promising results [1, 2, 22]. Given the increasing development of resistance to antiparasitic drugs, alternatives are necessary that reduce dependence on chemical bases for the control of parasitic diseases in the world. Thus, it is expected that this research will contribute an alternative strategy to be used in association with antiparasitic drugs for the control of *P. equorum*, thereby reducing the need for the use of chemical control.

Eysker et al. [26] mentioned that no drug is completely effective in the control of equine parasitic helminths and in some situations the amount of parasites in their larval stage has been the problem identified as a serious obstacle to drugs. In this sense, the resistance of *P. equorum* to routinely used anthelmintic classes is already a serious problem in some countries such as the Netherlands [27], Canada [14], USA [28], Italy [29], and Brazil [30]. According to current knowledge, factors that contribute to the occurrence of anthelmintic resistance to major bases include: (1) incorrect frequency of treatments; (2) the lack of alternation between drug classes used; (3) administration of lower doses; and (4) the high density of animals treated in the same pasture [15]. In addition, Kaplan et al. [12] confirmed experimentally the existence of ivermectin resistance by *P. equorum*. Subsequent studies revealed that treatment with ivermectin and moxidectin was not effective in reducing the egg counts of animals infected with the same parasite [15].

In another trial, performed in Canada, Slocombe et al. [14] in studies with foals infected with *P. equorum* showed that the efficacy of macrocyclic lactones (ivermectin and moxidectin) was lower when compared with the results presented by another group of animals treated with a benzimidazole (fenbendazole), and one tetrahydropyrimidine (pyrantel pamoate), which showed reduction rates exceeding 97%.

From the present study, it was demonstrated that the richer the medium, the greater the availability of carbon and nitrogen, which emphasizes the dual interface of nematophagous fungi: (1) they are saprophytic, but also lose this characteristic in the presence of substrate, in this case, helminth eggs and/or other source of nutrition; and (2) the fungus *P. chlamydosporia* displays proteolytic, lipolytic, and polysaccharolytic activity depending on the culture medium that is supplied. In addition, field testing may rely on the incorporation of isolates of *P. chlamydosporia* grown in supplemented culture media that may be important in its ovicidal activity in future research.

5. Conclusion

The results demonstrate the effectiveness of the ovicidal nematophagous fungus *P. chlamydosporia* grown in supplemented culture media and the destruction of *P. equorum* eggs under laboratory conditions. Although no statistical differences occurred, the culture medium AELA showed higher absolute values compared to the other culture media.

Acknowledgments

The authors thank CAPES, CNPq, and FAPEMIG for the availability of scholarships.

Table 1. Ovicidal activity (%) of *Pochonia chlamydosporia* (isolates VC1 and/or VC4) on solid agar medium supplemented with 2% water–agar (2% WA), agar–chitin (AC), YPSSA (yeast extract, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O soluble starch), AELA extract (starch + water + agar), 2% corn-meal–agar (2% CMA) and 2% potato dextrose–agar (2% PDA) and control without fungi against *Parascaris equorum* eggs after 21 days of interaction.

	Effect 1	Effect 2	Effect 3
WA			
Fungi			
VC1	20.1 ± 6.7 ^A	23.0 ± 7.0 ^A	36.8 ± 17.9 ^A
VC4	18.4 ± 8.4 ^A	30.0 ± 9.0 ^A	38.6 ± 12.2 ^A
Control	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B
AC			
Fungi			
VC1	21.11 ± 15.4 ^A	32.2 ± 14.1 ^A	29.7 ± 19.5 ^A
VC4	14.8 ± 10.6 ^A	37.7 ± 13.8 ^A	35.4 ± 14.8 ^A
Control	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B
AELA			
Fungi			
VC1	18.8 ± 14.0 ^A	29.5 ± 13.0 ^A	41.5 ± 16.8 ^A
VC4	14.6 ± 14.1 ^A	25.11 ± 13.5 ^A	48.3 ± 18.0 ^A
Control	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B
YPSS			
Fungi			
VC1	21.2 ± 14.0 ^A	26.1 ± 11.3 ^A	32.5 ± 11.6 ^A
VC4	16.3 ± 11.0 ^A	30.7 ± 11.9 ^A	40.4 ± 14.9 ^A
Control	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B
CMA			
Fungi			
VC1	13.3 ± 11.1 ^A	33.3 ± 14.4 ^A	39.1 ± 17.8 ^A
VC4	13.8 ± 9.7 ^A	32.5 ± 12.7 ^A	37.5 ± 14.8 ^A
Control	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B
PDA			
Fungi			
VC1	18.2 ± 8.5 ^A	25.8 ± 12.0 ^A	41.9 ± 17.4 ^A
VC4	18.3 ± 11.2 ^A	31.8 ± 11.0 ^A	35.9 ± 13.6 ^A
Control	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B	0 ± 0 ^B

Data are given as mean ± standard deviation.

^{A,B} Percentages within a column with unlike superscript letters were significantly different (P<0.05; Friedman's test).

Effect 1: physiological, biochemical effect without morphological damage to eggshell, with hyphae adhered to the shell. Effect 2: lytic effect with morphological

alteration of embryo and eggshell, without hyphal penetration through the eggshell. Effect 3: lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, as well as hyphal penetration and internal colonization.

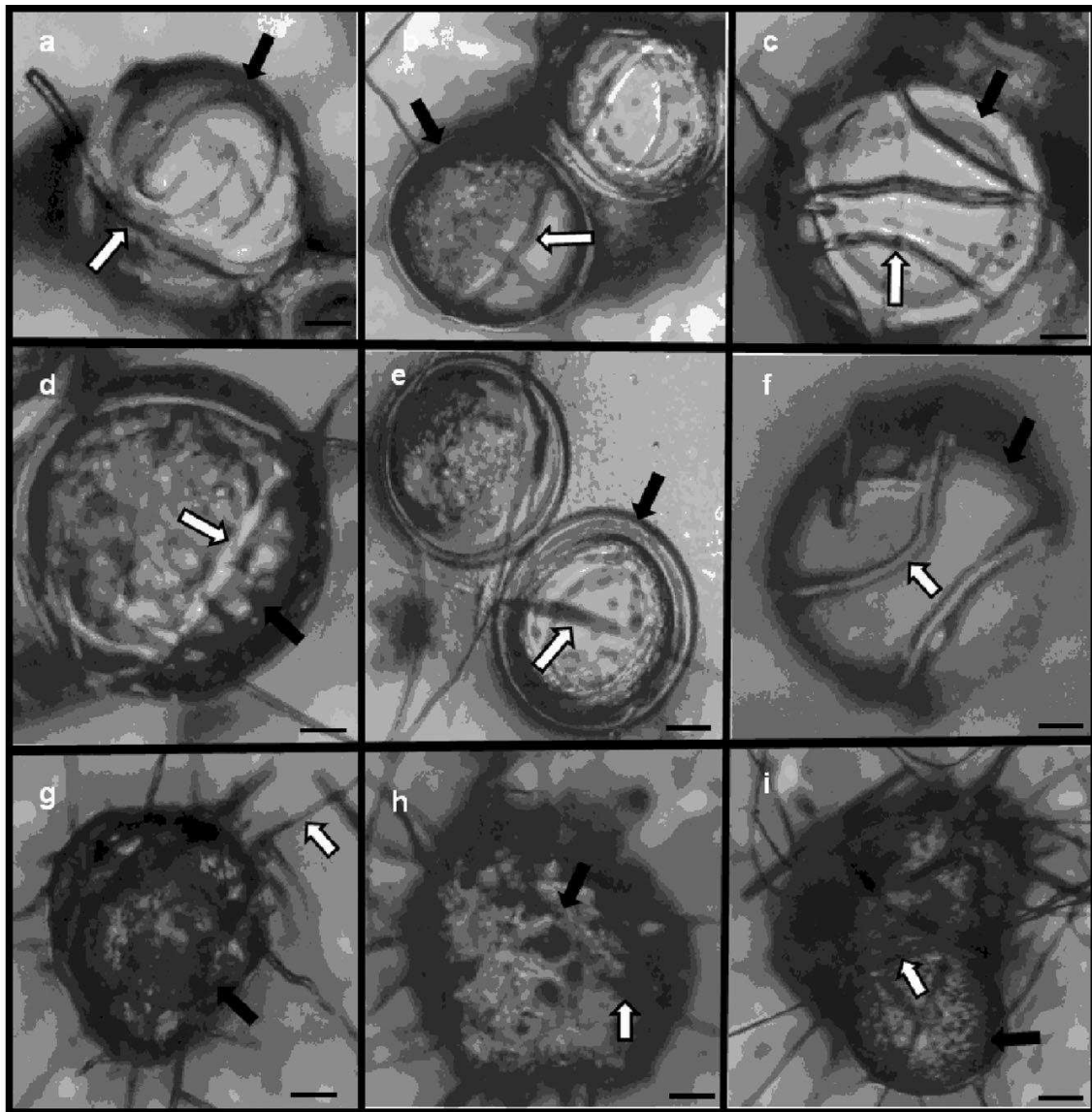


Figure 1. Interaction of hyphae of the fungus *P. chlamydosporia* (isolates VC1 and/or VC4) with *P. equorum* eggs (black arrow) at the end of 21 days. (a–c) Hyphae of the fungus on the surface of eggs (effect 1) (white arrow). (d–f) Adhesion and penetration of hyphae (effect 2) (white arrow), effect 2. (g–i) Destruction of the *P. equorum* eggs (effect 3) (black arrow). Bars: (a), 400 μ m; (b), 350 μ m; (c), 470 μ m; (d), 530 μ m; (e), 350 μ m; (f), 500 μ m; (g), 350 μ m; (h), 450 μ m; and (i), 300 μ m.

References

- [1] Carvalho, R.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Araujo, J.M. et al., 2010. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet. Parasitol.*, 169, 123–127.
- [2] Araujo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Ferreira, S.R. et al., 2013. *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara canis* eggs in lab conditions. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 22, 1–4.
- [3] Braga, F.R., Araújo, J.V., Silva, A.R., Araujo, J.M. et al., 2009. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Vet. Parasitol.*, 163, 335–340.
- [4] Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R.O., Cortiñas, F.J. et al., 2011. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Vet. Parasitol.*, 179, 277–282.
- [5] Lang, L., 1948. Todesfälle von 3 Fohlen durch Massen Spulwurmbefall. *Tierärztliche Umschau*, 3, 181.

- [6] Russell, A.F., 1948. The development of helminthiasis in thoroughbred foals. *J. Comp. Pathol.*, 58, 107–127.
- [7] Bowman, D.D., Lynn, R.C., Eberhard, M., Alacaraz, L., 2006. *Parasitologia Veterinária de Georgis*, 8th edn., Manole, Barueri, 422.
- [8] Lyons, E.T., Tolliver, S.C., Ionita, M., Collins, S.S., 2008. Evaluation of parasitocidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitol. Res.*, 103, 287–291.
- [9] Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. *Veterinary Parasitology*, 3rd edn., Blackwell Publishing, Ames, 874.
- [10] Urquhart, G.M., 1996. *Veterinary Parasitology*, 2nd edn., Blackwell Publishing, Oxford, UK, 307.
- [11] Reinemeyer, C.R., Nielsen, M.K., 2009. Parasitism and colic. *Vet. Clin. Equine.*, 25, 233–245.

- [12] Kaplan, R.M., Reinemeyer, C.R., Slocombe, O., Murray, M.J., 2006. Confirmation of ivermectin resistance in a purportedly resistant Canadian isolate of *Parascaris equorum* in foals, in: Proceedings of the Meeting of the 51st American Association of Veterinary Parasitologists, 69.
- [13] Reinemeyer, C.R., Marchiondo, A.A., 2007. Efficacy of pyrantel pamoate in horses against a macrocyclic lactoneresistant isolate of *Parascaris equorum*, in: Proceedings of the American Association of Veterinary Parasitology, 52nd Annual Meeting, 78.
- [14] Slocombe, J.O.D., Gannes, R.V.G., Lake, M.C., 2007. Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Vet. Parasitol.*, 145, 371–376.
- [15] Veronesi, F., Fioretti, D.P., Genchib, C., 2010. Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals? *Vet. Parasitol.*, 172, 164–167.
- [16] Lysek, H., Fassatiová, O., Pineda, N.C., Hernández, N.L., 1982. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol.*, 29, 265–270.

- [17] Braga, F.R., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Araújo, J.V. et al., 2011. Ovicidal activity of different concentrations of *Pochonia chlamydosporia* chlamydospores on *Taenia taeniaeformis* eggs. *J. Helminthol.*, 85, 7–11.
- [18] Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2003. *Aplicações es Estatísticas Nas Áreas de Ciências Biológicas*, Belém: Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq, 290.
- [19] Braga, F.R., Araújo, J.V., Silva, A.R., Carvalho, R.O. et al., 2010. Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Vet. Parasitol.*, 168, 264–268.
- [20] Kerry, B.R., Hidalgo, L., 2004. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematode on organically grown vegetable crops in Cuba. *IOBC/WPRS Bull.*, 27, 123–126.
- [21] Lopez-Llorca, L.V., Maciá-Vicente, J.G., Jansson, H.B., 2008. Mode of action and interactions of nematophagous fungi, in: Ciancio, A., Mukerji, K.G. (Eds.), *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crops Nematodes*, Springer, Dordrecht, 51–76.

[22] Braga, F.R., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Tavela, A.O. et al., 2012. Enzymatic analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. *Biocontrol Sci. Technol.*, 22, 685–696.

[23] Mota, M.A., Campos, A.K., Araújo, J.V., 2002. Evaluation of the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* submitted to different preservation methods against gastrointestinal parasitic nematodes of bovines. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 11, 13–17.

[24] Braga, F.R., Araújo, J.V., Carvalho, R.O., Silva, A.R. et al., 2009 Ovicidal effect of nematophagous fungi on *Taenia taeniaeformis* eggs. *World J. Microb. Biotechnol.*, 25, 533– 535.

[25] Braga, F.R., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Araujo, J.M., et al., 2013. Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterization of its chitinase. *Biocontrol Sci. Technol.*, 25(5), 584–594.

[26] Eysker, M., Boersema, J.H., Kooyman, F.N.J., 1989. Emergence from inhibited development of cyathostome larvae in ponies following failure to remove them by repeated treatments with benzimidazole compounds. *Vet. Parasitol.*, 34, 87–93.

- [27] Boersema, J.H., Eysker, M., Nas, J.W.M., 2002. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet. Rec.*, 150, 279–281.
- [28] Hearn, F.P., Peregrine, A.S., 2003. Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 223, 482–485.
- [29] Veronesi, F., Moretta, I., Moretti, A., Fioretti, D.P. et al., 2009. Field efficacy of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Vet. Parasitol.*, 161, 138–141.
- [30] Molento, M.B., Antunes, J., Bentes, R.N., Coles, G.C., 2008. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet. Rec.*, 162, 384–385.

CAPÍTULO 2

Ação do extrato bruto do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Parascaris equorum*

Resumo

O fungo ovicida do gênero *Pochonia chlamydosporia* tem demonstrado sua eficiência na destruição de ovos de nematóides e a utilização do extrato bruto enzimático desse fungo vem sendo estudada para avaliar sua ação proteolítica. Por sua vez, o *Parascaris equorum* é um ascarídeo que acomete equinos jovens, gerando prejuízos ao desenvolvimento dos animais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação do extrato bruto enzimático do fungo *P. chlamydosporia* (isolado VC4) sobre ovos de *P. equorum*, após um período de 48 horas de interação. Foi utilizado um isolado (VC4) do fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* e os ovos de *P. equorum*, obtidos por meio da dissecação de exemplares fêmeas adultas coletadas nas fezes de potros naturalmente infectados, após a administração de citrato de piperazina tetrahidratado. Foi observado um percentual de destruição dos ovos de 35,6%, devido à ação do extrato bruto. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a eficácia da ação do extrato bruto enzimático do fungo ovicida *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Parascaris equorum*, em condições laboratoriais, sugerindo ser uma alternativa possível de ser empregada no biocontrole desse parasito.

Palavras chave: Fungos helmintófagos, *Pochonia chlamydosporia*, extrato bruto enzimático, *Parascaris equorum*

1. Introdução

Parascaris equorum é um ascarídeo de ocorrência mundial, parasito de equídeos jovens, sendo encontrado no intestino delgado desses animais (Reinemeyer & Nielsen, 2009), podendo gerar desde cólicas e quadros de enterite moderada, até interferência no desenvolvimento dos animais, causando prejuízos ao crescimento corporal destes em função de alterações na capacidade de digestão e absorção dos nutrientes (Bowman et al, 2006).

Além dos prejuízos ao desenvolvimento da equideocultura em todo o mundo, são cada vez mais frequentes os relatos de ocorrência de resistência do *P. equorum* às bases antiparasitárias disponíveis atualmente no mercado, o que torna necessário o desenvolvimento de métodos alternativos para realizar o controle deste parasito. Além disso, o controle ambiental faz-se necessário, uma vez que a contaminação do ambiente por ovos do parasito é um ponto importante em seu ciclo de vida, favorecendo a infecção dos animais.

A utilização do fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* no controle in vitro de ovos de ascarídeos de humanos e animais tem apresentado bons resultados (Braga et al. 2007; Frassy et al. 2010, Carvalho et al. 2010, Braga et al. 2012a, Carvalho et al. 2013), contudo, sabe-se que sua atividade ovicida envolve uma ação enzimática sobre a casca destes ovos e, posteriormente, a inviabilização do embrião. Esse efeito é classificado como efeito do tipo 3 (destruição dos ovos). Além disso, pesquisas recentes têm buscando trabalhar com o seu extrato bruto enzimático, o qual indica conter uma série de enzimas extracelulares com atividade proteolítica e quitinolítica, descritas por Braga et al. (2012b). Anteriormente, Mukhtar and Pervaz

(2003) já mencionavam essa atividade sobre ovos de fitonematóides, contudo, a utilização de extrato bruto de *Pochonia chlamydosporia* ainda é recente e precisa ser melhor compreendida. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar, in vitro, a ação do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Parascaris equorum*.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos ovos de *Parascaris equorum*

Os ovos de *P. equorum* foram obtidos por meio da dissecação de exemplares fêmeas adultas obtidos nas fezes de potros naturalmente infectados, após a administração de 28 g/80 Kg de peso vivo de citrato de piperazina tetrahidratado (PROVERME®, Brasil, ©TORTUGA). A seguir, os ovos foram lavados em água destilada e centrifugados a 1000 rpm, 10 vezes, por cinco minutos cada vez. O sobrenadante foi descartado e os ovos obtidos foram mantidos em água destilada sob refrigeração (4 °C), até o momento de sua utilização.

2.2. Fungos

Foi utilizado um isolado (VC4) do fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia*. Esses isolados são oriundos de solo do Brasil, na localidade de Viçosa, Minas Gerais, e têm sido mantidos em tubos contendo meio CMA (corn-meal-agar 2%), a 4°C, no escuro, no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

2.3. Ensaio experimental.

Foi utilizado um isolado do fungo *P. chlamydosporia* (VC4), proveniente da micoteca do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, mantido em tubos de ensaio a 4 °C contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) no escuro e durante 10 dias. Para a obtenção do extrato bruto enzimático, procedeu-se ao cultivo fúngico em frascos Erlenmeyers com 50ml de meio mínimo líquido (NaCl 0,3 g/l; MgSO₄.7H₂O 0,3 g/l; K₂HPO₄ 0,3 g/l e extrato de levedura 0,2 g/l) e suplementado com 0,2% de gelatina. A gelatina foi filtrada por meio de filtro milipore (45 µm) antes de ser adicionada de forma asséptica no meio autoclavado. As amostras contendo o isolado foram incubadas no escuro a 28 °C em agitador rotatório a 120 rpm e, após cinco dias, o sobrenadante foi coletado e filtrado, usando papel filtro Whatman nº 1 a 4 °C de acordo com técnica modificada por Braga et al. (2012a).

Após a obtenção do extrato, foram utilizados dez tubos, os quais receberam uma quantidade de 100 µL de extrato bruto, acrescido de 100 ovos de *Parascaris equorum* (grupo tratado) e outro grupo com dez tubos, que receberam uma quantidade de 100 µL de água destilada, acrescido, também, de 100 ovos de *P. equorum* (grupo controle).

Ao final de um período de 48h, o conteúdo de cada tubo foi recuperado, com auxílio de uma micropipeta, colocado em uma lâmina de vidro, e levado ao microscópio de luz (objetiva de 10x), para observação de alterações (destruição) sobre a casca dos ovos.

A mensuração do efeito do extrato bruto enzimático foi realizada pela contagem individual do conteúdo dos tubos, os quais foram recuperados com auxílio de uma micropipeta e colocados em lâminas de vidro, para então, se proceder a avaliação, utilizando um microscópio de luz (objetiva de 10x). Os ovos foram contados, e classificados em dois grupos: ovos sem alteração morfológica da casca e/ou conteúdo; e ovos com alterações na casca e/ou no seu conteúdo.

3. Resultados

Após um período de 48 h de interação, foi observado um percentual de 35,6% de destruição dos ovos de *Parascaris equorum* pelo extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia*. O resultado dessa interação pode ser visualizado na Figura 1 (objetiva de 10x).

4. Discussão

O presente estudo demonstrou a atividade enzimática do extrato bruto de *Pochonia chlamydosporia* (VC4) sobre ovos de *Parascaris equorum*. A atividade enzimática (proteolítica, lipolítica e amilolítica) do *P. chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4), em meios ágar suplementados foi proposta por Braga e colaboradores (2012b). Ainda com relação ao isolado fúngico utilizado neste trabalho, Carvalho et al. (2013) demonstraram a atividade ovicida do *P. chlamydosporia* (isolados VC1 e VC4) sobre ovos de *Parascaris equorum*, com percentuais de destruição de 41,5% e 48,3%, respectivamente, ao final de um período de 21 dias.

Com relação às enzimas extracelulares produzidas pela espécie *Pochonia chlamydosporia* (VC4), Araujo et al. (2009) comentam sobre a importância dessas na infecção e destruição de ovos de helmintos. Em outra oportunidade, Braga et al

(2012a) provaram a eficiência do extrato bruto enzimático do *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Ascaridia galli*, e, naquele trabalho, obtiveram percentuais de redução de 64.1 e 56.5, para os isolados VC1 e VC4, respectivamente. No presente trabalho, diferença percentual de redução em relação ao trabalho anteriormente citado pode ser explicada pela morfologia e constituição da casca do ovo do *P. equorum*, que apresenta uma espessa camada proteinácea externa, se comparada à do ovo de *A. galli*.

Muitos trabalhos têm demonstrado o efeito do tipo 3 (destruição de ovos) sobre os mais variados gêneros de ovos de helmintos e em especial aqui de nematóides (Braga et al. 2010, Braga et al. 2012b), também de cestóides (Silva et al. 2010) e trematóides (Braga et al. 2008) que parasitam equinos. Estes trabalhos demonstraram que a ação enzimática de enzimas extracelulares é importante no processo de infecção e destruição destes ovos, partindo-se do princípio de que sua atividade é proteolítica e quitinolítica (Lysek et al., 1982; Lopez-Llorca et al., 1990).

Este é o primeiro relato da utilização de extrato bruto de *P. chlamydosporia* sobre ovos de *P. equorum* com percentuais de destruição (35,6 %) interessantes do ponto de vista biológico, uma vez que esses ovos são resistentes quando presentes no ambiente externo (Bowman et al. 2006). Braga e colaboradores (2012b) descreveram a atividade proteolítica; lipolítica e polissacarolítica por meio da visualização de “halos de digestão” a partir de meios suplementados com distintos substratos. Estes resultados serviram para demonstrar que “existia” a produção de enzimas extracelulares de acordo com o substrato utilizado. Entretanto, estes mesmos autores mencionaram, em outros trabalhos recentes, que a atividade de proteases produzidas pelo *P. chlamydosporia*, em extrato bruto, pode vir a ser uma

alternativa de pesquisas no controle de ovos de helmintos (Braga et al. 2010, 2012a). Contudo, existe apenas um relato a respeito da destruição de ovos de *Parascaris equorum* pelo fungo *P. chlamydosporia* crescido em meio sólido ágar em ensaio in vitro (Carvalho et al., 2013), que2 registraram a destruição destes ovos com percentuais 41,9% e 48,3% ao final de um período de 21 dias.

Portanto, os autores sugerem “um passo maior” na purificação de outras enzimas extracelulares do que a VCP1, contidas neste extrato bruto e que podem ser utilizadas futuramente no controle biológico de ovos de helmintos parasitos gastrintestinais de animais domésticos e de humanos.

5. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram a eficácia da ação do extrato bruto enzimático do fungo ovicida *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Parascaris equorum*, em condições laboratoriais, sugerindo ser mais uma alternativa possível de ser empregada no biocontrole desse parasito.

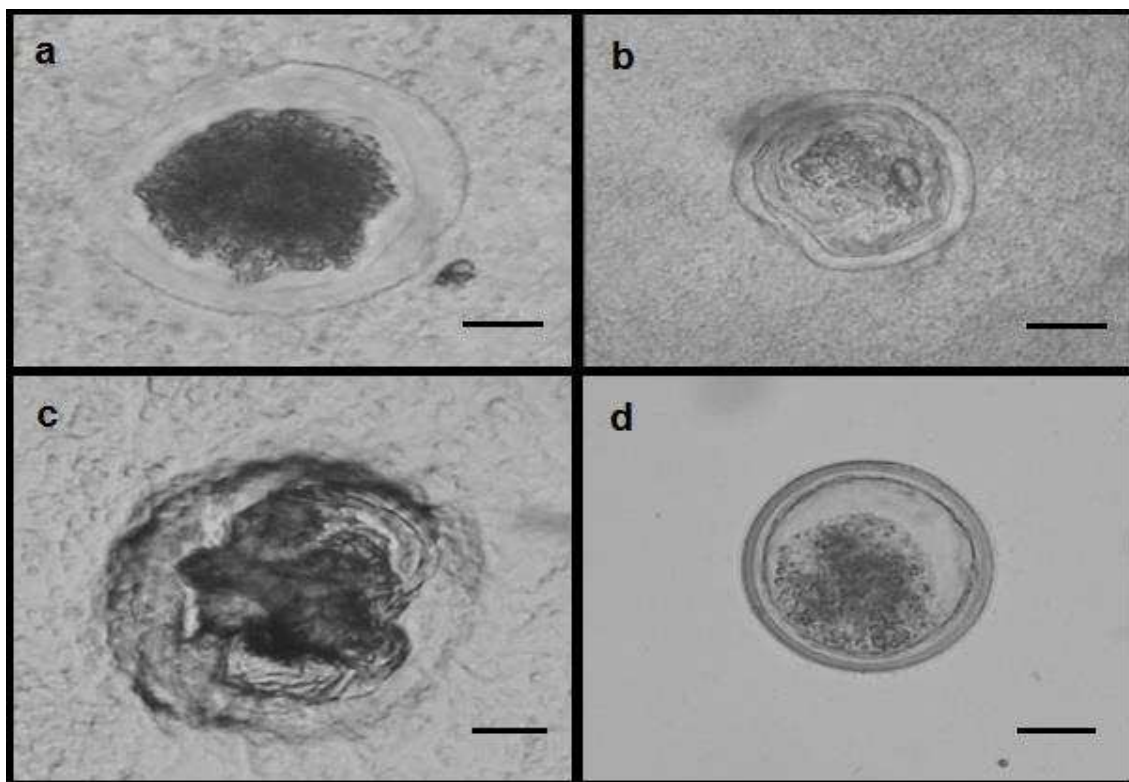


Figura 1: Efeito do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Parascaris equorum*, após 48 horas de interação. (a-c): ovos com morfologia alterada devido a ação do extrato fúngico (grupo tratado). (d): ovo com morfologia íntegra (grupo controle). Barras: (a):500 μm ; (b): 300 μm ; (c): 480 μm ; (d): 310 μm .

Referências

Araujo, J. M.; Araújo, J.V.; Braga, F.R.; Carvalho, R.O ; Silva, A.R.; Campos, A.K . Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. *Experimental Parasitology*, v. 121, p. 338-341, 2009.

Bowman, D.D. et al., *Parasitologia veterinária de Georgis*. 8. ed. Barueri, São Paulo: Manole, 2006.

Braga, F.R. ; Araújo, J.V. ; Campos, A.K ; Araujo, J. M. ; Silva, A.S. ; Carvalho, R.O. ; Tavela, A.O. (2008) In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 1559-1564.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Carvalho, R.O., Silva, A.R., Araujo, J.M., Freitas, F.E.S., Geniêr, H.L.A., Ferreira, S.R. & Queiroz, J.H. (2010) Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against *cyathostomin* eggs. *Veterinary Parasitology* 172: 264–268.

Braga, F.R; Araújo, J. V.; Araujo, J. M.; Frassy, L.N ; Tavela, A. O. ; Soares, F.E.F; Carvalho, R. O. ; Queiroz, L.M ; Queiroz, J.H. (2012a) *Pochonia chlamydosporia* fungal activity in a solid medium and its crude extract against eggs of *Ascaridia galli*. *Journal of Helminthology* 86: 348-352.

Braga, F.R; Araújo, J. V.; Soares, F.E.F ; Tavela, A.O ; Araujo, J. M ; Carvalho, R. O. ; Fernandes, F.M ; Queiroz, J.H. (2012b) Enzymatic analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. *Biocontrol Science and Technology* (Print) 22: 685-696.

Carvalho, R. O.; Araújo, J. V.; BRAGA, F.R.; Araujo, J.M.; Alves, C.D.F. (2010) Ovicidal Activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Veterinary Parasitology* (Print) 169: 123-127.

Carvalho, L.M.; Braga, F.R.; Domingues, R.R.; Araujo, J.M ; Lelis, R.T. ; Paula, A.T. ; Silveira, W.F.; Araújo, J.V. (2013) Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. *Journal of Basic Microbiology* 53: 1-6.

Frassy, L.N.; Braga, F.R; Silva, A. R.; Araújo, J. V.; Ferreira, S.R.; Freitas, L.G. (2010) Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia*

chlamydosporia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Impresso) 43: 102-104.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 22: 680 – 685.

Lopez-Llorca LV, Claughner D. (1990) Appressoria of the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. Micron and Microscopica Acta 21(3):125–130

Lysek, H., Fassatón, O., Pineda, N.C, Hernández, N. and Lorenzo. (1982) Ovicidal fungi in soils of cuba. Folia parasitological 29: 265 – 270.

Mukhtar, T., Pervaz, I. (2003) In vitro evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. International Journal of Agriculture and Biology 5: 576 – 579.

4. CONCLUSÕES GERAIS

- Os dois isolados (VC1 e VC4) do fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia*, crescidos em seis diferentes meios de cultura, são capazes de colonizar e destruir ovos de *Parascaris equorum*, após um período de 21 dias de interação.
- O extrato bruto enzimático do fungo *P. chlamydosporia* (isolado VC4) é capaz de destruir ovos de *P. equorum*, após um período de 48 horas de interação.

5. ANEXOS

Porcentagens de ovos de *Parascaris equorum* apresentando efeito tipo 1, após período de 21 dias de interação com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC1). Dados submetidos ao teste de Friedman (1 e 5% de probabilidade)

21 dias EFEITO1

AA	AAQ	AELA	YPSSA	CMA	BDA	Control
30	30	35	30	30	30	0
20	10	20	35	35	15	0
20	5	15	40	20	22	0
25	20	18	15	15	35	0
30	10	20	35	15	20	0
20	10	35	30	30	20	0
15	40	20	8	15	10	0
15	10	22	20	0	30	0
10	0	15	50	0	10	0
15	10	20	10	20	12	0
12	0	15	0	0	30	0
10	50	5	0	20	20	0
30	30	0	20	0	20	0
20	40	10	10	10	10	0
20	35	0	10	10	10	0
20	40	0	20	10	5	0
30	20	50	20	10	15	0
20	20	40	30	0	15	0

	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -	- 6 -	- 7 -
Soma dos Ranks =	90.0000	77.5000	86.0000	81.0000	65.5000	80.0000	24.0000
Mediana =	20.0000	20.0000	19.0000	20.0000	12.5000	17.5000	0.0000
Média dos Ranks =	5.0000	4.3056	4.7778	4.5000	3.6389	4.4444	1.3333
Média dos valores =	20.1111	21.1111	18.8889	21.2778	13.3333	18.2778	0.0000
Desvio padrão =	6.7028	15.3925	14.0079	13.9107	11.1144	8.5392	0.0000
Friedman (Fr) =	36.2083						
Graus de liberdade =	6						
(p) =	< 0.0001						
Comparações:	Diferença	(p)					
Ranks 1 e 2 =	12.5	ns					
Ranks 1 e 3 =	4	ns					
Ranks 1 e 4 =	9	ns					
Ranks 1 e 5 =	24.5	ns					
Ranks 1 e 6 =	10	ns					
Ranks 1 e 7 =	66	< 0.05					

Ranks 2 e 3 =	8.5	ns
Ranks 2 e 4 =	3.5	ns
Ranks 2 e 5 =	12	ns
Ranks 2 e 6 =	2.5	ns
Ranks 2 e 7 =	53.5	< 0.05
Ranks 3 e 4 =	5	ns
Ranks 3 e 5 =	20.5	ns
Ranks 3 e 6 =	6	ns
Ranks 3 e 7 =	62	< 0.05
Ranks 4 e 5 =	15.5	ns
Ranks 4 e 6 =	1	ns
Ranks 4 e 7 =	57	< 0.05
Ranks 5 e 6 =	14.5	ns
Ranks 5 e 7 =	41.5	< 0.05
Ranks 6 e 7 =	56	< 0.05

Porcentagens de ovos de *Parascaris equorum* apresentando efeito tipo 2, após período de 21 dias de interação com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC1). Dados submetidos ao teste de Friedman (1 e 5% de probabilidade)

21 dias	EFEITO2						
	AA	AAQ	AELA	YPSSA	CMA	BDA	Control
	20	40	10	10	15	15	0
	25	60	20	25	15	10	0
	15	40	25	20	25	30	0
	15	25	22	30	40	30	0
	20	30	25	20	25	15	0
	20	35	20	25	10	25	0
	15	30	30	10	20	20	0
	30	45	35	30	40	20	0
	12	40	20	20	30	12	0
	30	40	20	10	30	18	0
	22	10	25	50	60	20	0
	20	50	19	50	30	26	0
	25	20	40	30	35	30	0
	40	10	30	30	40	60	0
	30	10	50	30	60	40	0
	30	20	60	30	50	30	0
	20	35	50	30	45	25	0
	25	40	30	20	30	40	0
	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -	- 6 -	- 7 -
Soma dos Ranks =	65.0000	94.5000	85.0000	71.5000	95.5000	74.5000	18.0000

Mediana =	21.0000	35.0000	25.0000	27.5000	30.0000	25.0000	0.0000
Média dos Ranks =	3.6111	5.2500	4.7222	3.9722	5.3056	4.1389	1.0000
Média dos valores =	23.0000	32.2222	29.5000	26.1111	33.3333	25.8889	0.0000
Desvio padrão =	7.0960	14.1652	13.0170	11.3183	14.4507	12.0776	0.0000
Friedman (Fr) =	49.9881						
Graus de liberdade =	6						
(p) =	< 0.0001						

Comparações:	Diferença	(p)
Ranks 1 e 2 =	29.5	ns
Ranks 1 e 3 =	20	ns
Ranks 1 e 4 =	6.5	ns
Ranks 1 e 5 =	30.5	ns
Ranks 1 e 6 =	9.5	ns
Ranks 1 e 7 =	47	< 0.05
Ranks 2 e 3 =	9.5	ns
Ranks 2 e 4 =	23	ns
Ranks 2 e 5 =	1	ns
Ranks 2 e 6 =	20	ns
Ranks 2 e 7 =	76.5	< 0.05
Ranks 3 e 4 =	13.5	ns
Ranks 3 e 5 =	10.5	ns
Ranks 3 e 6 =	10.5	ns
Ranks 3 e 7 =	67	< 0.05
Ranks 4 e 5 =	24	ns
Ranks 4 e 6 =	3	ns
Ranks 4 e 7 =	53.5	< 0.05
Ranks 5 e 6 =	21	ns
Ranks 5 e 7 =	77.5	< 0.05
Ranks 6 e 7 =	56.5	< 0.05

Porcentagens de ovos de *Parascaris equorum* apresentando efeito tipo 3, após período de 21 dias de interação com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC1). Dados submetidos ao teste de Friedman (1 e 5% de probabilidade)

21 dias	EFEITO3						
	AA	AAQ	AELA	YPSSA	CMA	BDA	Control
	10	20	25	30	25	40	0
	35	25	35	15	25	30	0
	25	50	45	30	40	38	0
	25	45	44	35	30	15	0

10	55	35	30	30	25	0
30	50	20	25	20	10	0
60	30	40	30	65	60	0
55	25	31	45	60	45	0
73	60	60	20	70	68	0
55	45	50	50	50	65	0
58	50	57	50	40	25	0
48	0	66	50	50	39	0
30	10	60	30	35	50	0
20	10	60	25	20	30	0
35	5	50	50	20	50	0
40	10	40	30	20	65	0
20	35	0	20	45	60	0
35	10	30	20	60	40	0

	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -	- 6 -	- 7 -
Soma dos Ranks =	82.0000	65.5000	91.0000	73.5000	85.0000	88.0000	19.0000
Mediana =	35.0000	27.5000	42.0000	30.0000	37.5000	40.0000	0.0000
Média dos Ranks =	4.5556	3.6389	5.0556	4.0833	4.7222	4.8889	1.0556
Média dos valores =	36.8889	29.7222	41.5556	32.5000	39.1667	41.9444	0.0000
Desvio padrão =	17.9505	19.5141	16.8356	11.6632	16.8252	17.4406	0.0000
Friedman (Fr) =	44.5179						
Graus de liberdade =		6					
(p) =		< 0.0001					

Comparações:	Diferença	(p)
Ranks 1 e 2 =	16.5	ns
Ranks 1 e 3 =	9	ns
Ranks 1 e 4 =	8.5	ns
Ranks 1 e 5 =	3	ns
Ranks 1 e 6 =	6	ns
Ranks 1 e 7 =	63	< 0.05
Ranks 2 e 3 =	25.5	ns
Ranks 2 e 4 =	8	ns
Ranks 2 e 5 =	19.5	ns
Ranks 2 e 6 =	22.5	ns
Ranks 2 e 7 =	46.5	< 0.05
Ranks 3 e 4 =	17.5	ns
Ranks 3 e 5 =	6	ns
Ranks 3 e 6 =	3	ns
Ranks 3 e 7 =	72	< 0.05
Ranks 4 e 5 =	11.5	ns

Ranks 4 e 6 =	14.5	ns
Ranks 4 e 7 =	54.5	< 0.05
Ranks 5 e 6 =	3	ns
Ranks 5 e 7 =	66	< 0.05
Ranks 6 e 7 =	69	< 0.05

Porcentagens de ovos de *Parascaris equorum* apresentando efeito tipo 1, após período de 21 dias de interação com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC4). Dados submetidos ao teste de Friedman (1 e 5% de probabilidade)

21 dias EFEITO1

AA	AAQ	AELA	YPSSA	CMA	BDA	Control
30	20	40	35	20	20	0
0	30	45	20	20	20	0
30	15	35	30	25	35	0
30	25	20	25	25	18	0
10	18	22	15	20	20	0
20	10	15	20	30	30	0
12	15	15	15	0	15	0
5	0	20	15	0	18	0
20	5	12	10	15	12	0
20	0	15	15	0	12	0
30	0	10	5	10	50	0
20	0	15	10	0	0	0
20	30	0	0	10	20	0
15	20	0	20	20	10	0
20	20	0	30	25	10	0
20	20	0	0	10	20	0
15	10	0	0	10	10	0
15	30	0	30	10	10	0

	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -	- 6 -	- 7 -
Soma dos Ranks =	90.5000	72.5000	77.0000	79.5000	74.0000	83.0000	27.5000
Mediana =	20.0000	16.5000	15.0000	15.0000	12.5000	18.0000	0.0000
Média dos Ranks =	5.0278	4.0278	4.2778	4.4167	4.1111	4.6111	1.5278
Média dos valores =	18.4444	14.8889	14.6667	16.3889	13.8889	18.3333	0.0000
Desvio padrão =	8.4729	10.6654	14.1546	10.9552	9.7853	11.2092	0.0000
Friedman (Fr) =	30.1071						
Graus de liberdade =		6					
(p) =		< 0.0001					

Comparações:	Diferença	(p)
Ranks 1 e 2 =	18	ns
Ranks 1 e 3 =	13.5	ns
Ranks 1 e 4 =	11	ns
Ranks 1 e 5 =	16.5	ns
Ranks 1 e 6 =	7.5	ns
Ranks 1 e 7 =	63	< 0.05
Ranks 2 e 3 =	4.5	ns
Ranks 2 e 4 =	7	ns
Ranks 2 e 5 =	1.5	ns
Ranks 2 e 6 =	10.5	ns
Ranks 2 e 7 =	45	< 0.05
Ranks 3 e 4 =	2.5	ns
Ranks 3 e 5 =	3	ns
Ranks 3 e 6 =	6	ns
Ranks 3 e 7 =	49.5	< 0.05
Ranks 4 e 5 =	5.5	ns
Ranks 4 e 6 =	3.5	ns
Ranks 4 e 7 =	52	< 0.05
Ranks 5 e 6 =	9	ns
Ranks 5 e 7 =	46.5	< 0.05
Ranks 6 e 7 =	55.5	< 0.05

Porcentagens de ovos de *Parascaris equorum* apresentando efeito tipo 2, após período de 21 dias de interação com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC4). Dados submetidos ao teste de Friedman (1 e 5% de probabilidade)

21 dias	EFEITO2						
	AA	AAQ	AELA	YPSSA	CMA	BDA	Control
	30	35	10	20	35	30	0
	40	40	10	25	15	35	0
	40	30	10	15	30	15	0
	30	10	35	30	10	32	0
	20	30	32	30	30	15	0
	30	50	35	30	10	30	0
	12	50	15	20	50	30	0
	25	40	10	40	50	40	0
	30	50	15	30	40	25	0
	15	60	10	20	50	26	0
	20	50	25	18	30	10	0
	40	60	25	40	30	50	0
	30	15	40	50	30	40	0

	40	30	30	30	30	30	0
	30	30	50	40	30	40	0
	35	30	30	50	25	35	0
	40	30	50	50	50	40	0
	40	40	20	15	40	50	0
	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -	- 6 -	- 7 -
Soma dos Ranks =	78.0000	92.0000	71.0000	80.5000	82.5000	82.0000	18.0000
Mediana =	30.0000	37.5000	25.0000	30.0000	30.0000	31.0000	0.0000
Média dos Ranks =	4.3333	5.1111	3.9444	4.4722	4.5833	4.5556	1.0000
Média dos valores =	30.3889	37.7778	25.1111	30.7222	32.5000	31.8333	0.0000
Desvio padrão =	9.0628	13.8503	13.5555	11.9055	12.7475	11.0733	0.0000
Friedman (Fr) =	43.2798						
Graus de liberdade =	6						
(p) =	< 0.0001						
Comparações:	Diferença	(p)					
Ranks 1 e 2 =	14	ns					
Ranks 1 e 3 =	7	ns					
Ranks 1 e 4 =	2.5	ns					
Ranks 1 e 5 =	4.5	ns					
Ranks 1 e 6 =	4	ns					
Ranks 1 e 7 =	60	< 0.05					
Ranks 2 e 3 =	21	ns					
Ranks 2 e 4 =	11.5	ns					
Ranks 2 e 5 =	9.5	ns					
Ranks 2 e 6 =	10	ns					
Ranks 2 e 7 =	74	< 0.05					
Ranks 3 e 4 =	9.5	ns					
Ranks 3 e 5 =	11.5	ns					
Ranks 3 e 6 =	11	ns					
Ranks 3 e 7 =	53	< 0.05					
Ranks 4 e 5 =	2	ns					
Ranks 4 e 6 =	1.5	ns					
Ranks 4 e 7 =	62.5	< 0.05					
Ranks 5 e 6 =	0.5	ns					
Ranks 5 e 7 =	64.5	< 0.05					
Ranks 6 e 7 =	64	< 0.05					

Porcentagens de ovos de *Parascaris equorum* apresentando efeito tipo 3, após período de 21 dias de interação com o fungo *Pochonia chlamydosporia* (isolado VC4). Dados submetidos ao teste de Friedman (1 e 5% de probabilidade)

21 dias	EFEITO3						
	AA	AAQ	AELA	YPSSA	CMA	BDA	Control
	40	30	20	30	10	35	0
	40	20	15	25	35	20	0
	30	40	30	15	25	25	0
	20	60	30	25	20	25	0
	30	37	28	30	20	35	0
	30	30	35	35	30	30	0
	66	35	60	55	30	45	0
	60	60	55	40	50	37	0
	35	45	68	35	45	53	0
	55	40	60	60	50	52	0
	50	50	53	72	55	0	0
	25	40	55	25	50	50	0
	30	5	60	50	60	30	0
	30	20	70	50	40	55	0
	40	35	50	30	40	45	0
	35	20	70	50	60	35	0
	40	50	50	50	25	40	0
	40	20	70	50	30	35	0

	- 1 -	- 2 -	- 3 -	- 4 -	- 5 -	- 6 -	- 7 -
Soma dos Ranks =	80.0000	73.0000	103.0000	82.5000	70.5000	76.5000	18.5000
Mediana =	37.5000	36.0000	54.0000	37.5000	37.5000	35.0000	0.0000
Média dos Ranks =	4.4444	4.0556	5.7222	4.5833	3.9167	4.2500	1.0278
Média dos valores =	38.6667	35.3889	48.8333	40.3889	37.5000	35.9444	0.0000
Desvio padrão =	12.2330	14.8052	17.9747	14.9436	14.7778	13.6143	0.0000
Friedman (Fr) =	47.8690						
Graus de liberdade =		6					
(p) =		< 0.0001					
Comparações:	Diferença (p)						
Ranks 1 e 2 =		7	ns				
Ranks 1 e 3 =		23	ns				

Ranks 1 e 4 =	2.5	ns
Ranks 1 e 5 =	9.5	ns
Ranks 1 e 6 =	3.5	ns
Ranks 1 e 7 =	61.5	< 0.05
Ranks 2 e 3 =	30	ns
Ranks 2 e 4 =	9.5	ns
Ranks 2 e 5 =	2.5	ns
Ranks 2 e 6 =	3.5	ns
Ranks 2 e 7 =	54.5	< 0.05
Ranks 3 e 4 =	20.5	ns
Ranks 3 e 5 =	32.5	ns
Ranks 3 e 6 =	26.5	ns
Ranks 3 e 7 =	84.5	< 0.05
Ranks 4 e 5 =	12	ns
Ranks 4 e 6 =	6	ns
Ranks 4 e 7 =	64	< 0.05
Ranks 5 e 6 =	6	ns
Ranks 5 e 7 =	52	< 0.05
Ranks 6 e 7 =	58	< 0.05