

FÁBIO RIBEIRO BRAGA

**AÇÃO *IN VITRO* DE FUNGOS DAS ESPÉCIES *Duddingtonia flagrans*,
Monacrosporium sinense E *Pochonia chlamydosporia* SOBRE OVOS DE
Fasciola hepatica E *Schistosoma mansoni***

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
2008**

FÁBIO RIBEIRO BRAGA

**AÇÃO IN VITRO DE FUNGOS DAS ESPÉCIES *Duddingtonia flagrans*,
Monacrosporium sinense E *Pochonia chlamydosporia* SOBRE OVOS DE
Fasciola hepatica E *Schistosoma mansoni***

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: 19 de fevereiro de 2008.

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Co-orientador)

Prof. Artur Kanadani Campos
(Co-orientador)

Prof. Marcos Pezzi Guimarães

Prof. José Humberto de Queiroz

Prof. Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos, pela minha vida e por sempre estar ao meu lado em todos os meus caminhos e horas.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade única de crescimento profissional e pessoal.

Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálises da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela concessão da bolsa de estudo que viabilizou meus estudos e pesquisa.

Ao grande Professor *Jackson Victor de Araújo*, pela amizade, confiança depositada, ensinamentos, respeito e por acreditar que seria capaz de realizar este projeto. E acima de tudo, pelo grande exemplo a ser seguido e pela singular orientação.

A todos os professores, servidores e amigos do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Em especial a secretária *Rosinéia Aparecida da Cunha Andrade* por todo respeito, carinho, confiança e grande ajuda no decorrer dessa jornada.

Aos meus grandes amigos *José Geraldo de Oliveira (Tuim)* e *Ademir Alves*, pela ajuda, respeito, e por serem como verdadeiros pais durante a realização da minha pesquisa.

Aos meus pais *Ricardo Neves Braga* e *Angela Ribeiro Braga*, meu muito obrigado por sempre creditar a mim amor e respeito.

Aos eternos amigos da Pós-Graduação, por todos os momentos bons compartilhados e por terem proporcionado uma convivência maravilhosa em Viçosa, em especial aos amigos *Jair Duarte da Costa Junior*, *Lukiya Birungi Silva Campos Mata*, *Napoleão M. Argôlo Neto*, *Betânia Souza Monteiro*, *Juliana Milani Araujo*, *André Ricardo e Silva* e *Rogério Oliva Carvalho*.

Ao amigo *Artur Kanadani Campos*, pela ajuda decisiva.

À *Gracilene Maria Almeida Muniz Braga*, minha linda e maravilhosa esposa, pois sem ela não poderia chegar ao final dessa jornada. Agradeço pelo seu amor, carinho e compreensão que sempre me proporcionam dias melhores.

Ao Professor *Laércio dos Anjos Benjamin*, por toda ajuda e atenção.

Ao meu amigo e irmão *Evandro Silva Favarato*, e seus pais *Eurico* e *Penha*, por esses dez anos de amizade e confiança que me ajudaram nos momentos decisivos.

Aos meus cachorros, *Conan* e *Campeão*, que sempre foram um incentivo a mais para que me tornasse um Médico Veterinário.

BIOGRAFIA

FABIO RIBEIRO BRAGA, filho de Ricardo Neves Braga e Angela Ribeiro Braga, nasceu em 10 de Março de 1977, em Itabira, Minas Gerais.

Em Dezembro de 2002, graduou-se em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário de Vila Velha (UVV), Vila Velha – ES.

Em Novembro de 2006, concluiu o curso de Especialização (Pós-graduação *lato sensu*) em “Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais” no Centro Universitário de Vila Velha (UVV).

Em Maio de 2006 ingressou no Programa de Mestrado em Medicina Veterinária, no Departamento de Veterinária – UFV, submetendo-se à defesa de dissertação em fevereiro de 2008.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Breve histórico	3
2.2 Fungos nematófagos	6
2.3 Controle biológico	13
2.4 Helmintos.....	17
2.5 <i>Fasciola hepatica</i>	18
2.5.1 Ciclo biológico.....	19
2.5.2 Diagnóstico.....	20
2.5.3 Medidas de controle e tratamento.....	21
2.6 <i>Schistosoma mansoni</i>	22
2.6.1 Ciclo biológico.....	23
2.6.2 Diagnóstico.....	25
2.6.3 Medidas de controle e tratamento.....	25
2.7 <i>Duddingtonia flagrans</i>	28
2.8 <i>Monacrosporium sinense</i>	29
2.9 <i>Pochonia chlamydosporia</i>	30
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. HIPÓTESES.....	31
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
5.1 Obtenção dos isolados	32
5.2 Obtenção dos ovos de <i>Fasciola hepatica</i>	32
5.3 Obtenção de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i>	32
5.4 Ensaio experimentais.....	33
5.4.1 Ensaio experimental A	33
5.4.2 Ensaio experimental B	34
5.5 Análise estatística.....	35
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6.1 Ensaio experimental A	36
6.2 Ensaio experimental B.....	41
7. CONCLUSÕES.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
9. ANEXO.....	63

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Fasciola hepatica* e o grupo-controle sem fungos, aos sete dias de interação. **Pág. 37**
- Fig. 2** Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Fasciola hepatica* aos 14 dias de interação. **Pág. 37**
- Fig. 3** Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Fasciola hepatica* aos 21 dias de interação. **Pág. 38**
- Fig. 4** Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Schistosoma mansoni* aos sete dias de interação. **Pág. 42**
- Fig. 5** Percentuais da atividade ovicida e desvio-padrão (barra) dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Schistosoma mansoni* aos 14 dias de interação. **Pág. 42**
- Fig. 6** Percentuais da atividade ovicida e desvio-padrão (barra) dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) e o grupo controle sem fungos, sobre ovos de *Schistosoma mansoni* 21 dias de interação. **Pág. 43**
- Fig. 7** Conídios do fungo *Duddingtonia flagrans* (seta branca) aderidos ao ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 63**

- Fig. 8:** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 63**
- Fig. 9** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 63**
- Fig. 10** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 63**
- Fig. 11** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 63**
- Fig. 12** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 63**
- Fig. 13** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 63**
- Fig. 14** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovos de *Fasciola hepatica* (seta preta) iniciando o processo de rompimento, aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 64**
- Fig. 15** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovos de *Fasciola hepatica* (seta preta) iniciando o processo de expansão aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 64**
- Fig. 16** Ovos de *Fasciola hepatica* sem fungo (controle) (seta branca). Aos 21 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 64**
- Fig. 17** Ovos de *Fasciola hepatica* sem fungo (controle) (seta branca). Aos 21 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 64**
- Fig. 18** Ovos de *Fasciola hepatica* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia*, interação aos 21 dias (seta branca). Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 64**
- Fig. 19** Ovos de *Fasciola hepatica* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia*, interação aos 21 dias (seta branca). Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 64**

- Fig. 20** Ovos de *Fasciola hepatica* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia*, interação aos 21 dias (seta branca). Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 64**
- Fig. 21** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Schistosoma mansoni* (seta preta). Aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 65**
- Fig. 22** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Schistosoma mansoni* (seta preta). Aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 65**
- Fig. 23** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta preta) e ovo de *Schistosoma mansoni*. Aos sete dias de interação (seta preta). Microscopia eletrônica de varredura. **Pág. 65**
- Fig. 24** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta preta) e ovo de *Schistosoma mansoni*. Aos sete dias de interação (seta preta). Microscopia eletrônica de varredura. **Pág. 65**
- Fig. 25** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovos de *Schistosoma mansoni* (seta preta) iniciando o processo de expansão, aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 65**
- Fig. 26** Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovos de *Schistosoma mansoni* (seta preta) iniciando o processo de rompimento, aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 65**
- Fig. 27** Ovos de *Schistosoma mansoni* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia*, interação aos 21 dias (seta branca). Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 66**
- Fig. 28** Ovos de *Schistosoma mansoni* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia*, interação aos 21 dias (seta branca). Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 66**
- Fig. 29** Ovos de *Schistosoma mansoni* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia*, interação aos 21 dias (seta branca). Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 66**
- Fig. 30** Ovos de *Schistosoma mansoni* sem fungo (controle) (seta branca), aos 21 dias. Microscopia de luz - objetiva de 40x. **Pág. 66**

- Fig. 31** Ovo de *Schistosoma mansoni* (seta branca) e apressório (no detalhe - seta preta) de *Pochonia chlamydosporia*, aos sete dias de interação. Microscopia eletrônica de varredura. **Pág. 67**
- Fig. 32** Clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca). Microscopia eletrônica de varredura. **Pág. 67**

RESUMO

BRAGA, Fabio Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Ação *in vitro* de fungos das espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni*.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Co-orientadores: Artur Kanadani Campos e Laércio dos Anjos Benjamin.

Avaliou-se, em dois ensaios experimentais (A e B), a ação *in vitro* de quatro isolados de fungos nematófagos dos gêneros *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni*. Ovos de *F. hepatica* (ensaio A) e ovos de *S. mansoni* (ensaio B) foram vertidos em placas de Petri com ágar-água 2% com os isolados fúngicos crescidos, e em placas de Petri sem fungo como controle. Ao completarem sete, 14 e 21 dias, aproximadamente cem ovos foram removidos e classificados de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. No ensaio A, os fungos *D. flagrans* (AC001) e *M. sinense* (SF53) apresentaram resultados percentuais somente para o efeito do tipo 1 sobre os ovos de *F. hepatica*, porém sem apresentar diferença significativa ($p>0,01$) entre eles. O fungo *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) demonstrou resultados percentuais de atividade ovicida para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 sobre os ovos de *F. hepatica*, com efeito do tipo 3 de 12,8% (VC1) e 16,5% (VC4); 14,4% (VC1) e 18,7% (VC4), 20,2% (VC1) e 21,5% (VC4), respectivamente aos sete, 14 e 21 dias. Ao final do ensaio experimental A, não foi observada diferença na ação de VC1 e VC4 para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 ao longo dos três períodos estudados. No ensaio experimental B, os fungos *D. flagrans* (AC001) e *M. sinense* (SF53) apresentaram somente resultados percentuais para o efeito do tipo 1 sobre os ovos de *S. mansoni*, sem contudo apresentar diferença significativa ($p>0,01$) entre eles. *P. chlamydosporia* demonstrou atividade ovicida sobre ovos de *S. mansoni* com resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 apresentando um efeito do tipo 3 de 26,6% (VC1) e 17,2% (VC4); 25,6% (VC1) e 22,6% (VC4); 26,3% (VC1) e 23,0% (VC4)

respectivamente aos sete, 14 e 21 dias. Contudo ao final do ensaio experimental B, também não foi observada diferença na ação entre os isolados VC1 e VC4 para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3. Os resultados dos ensaios experimentais *in vitro* A e B demonstraram que *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) influenciou de forma negativa os ovos de *F. hepatica* e *S. mansoni*, e assim pode ser considerado como um potencial candidato a controlador biológico desses helmintos.

ABSTRACT

BRAGA, Fabio Ribeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2008. **Action *in vitro* of fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on eggs of *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni*.** Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-advisers: Artur Kanadani Campos and Laércio dos Anjos Benjamin.

The *in vitro* effects of four isolates of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) and *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4) on eggs of *Fasciola hepatica* and *Schistosoma mansoni* was evaluated in two assays (A and B). Eggs of *F. hepatica* (assay A) and *S. mansoni* (assay B) were incubated in Petri dishes with 2% water-agar inoculated with the grown fungal isolates and a control without fungus. After seven, 14 and 21 days post-inoculation, one hundred eggs were removed and classified according to the following parameters: type 1, lytic effect without morphological damage to eggshell; type 2, lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell; and type 3, lytic effect with morphological alteration of embryo and eggshell, with hyphal penetration and internal egg colonization. In assay A, *D. flagrans* (AC001) and *M. sinense* (SF53) showed results only for type-1 effect on *F. hepatica* eggs, but with no significant difference ($p>0.01$) between them. *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) showed percentage results for ovicidal activity of type-1, -2 and -3 effects on *F. hepatica* eggs, with type-3 effect of 12.8% (VC1) and 16.5% (VC4); 14.4% (VC1) and 18.7% (VC4), 20.1% (VC1) and 21.5% (VC4) at seven, 14 and 21 days respectively. At the end of assay A no difference was found in the action of VC1 and VC4 for type-1, -2 and -3 effects over the three studied periods. In assay B, *D. flagrans* (AC001) and *M. sinense* (SF53) showed percentage results only for type 1 effect on *S. mansoni* eggs, with no significant difference ($p>0.01$) between them. *P. chlamydosporia* showed ovicidal activity on *S. mansoni* eggs with percentage results for type-1, -2 and -3 effects showing type 3 effect of: 26.6% (VC1) and 17.2% (VC4); 25.6% (VC1) and 22.6% (VC4); 26.3% (VC1) and 23.0% (VC4) at seven, 14 and 21 days respectively. At the end of the assay B, no difference was found in the action between the isolates VC1 and VC4 for type-1, -2 and -3 effects as well. The results of the A and B *in vitro* assays showed that *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) negatively affected *F.*

hepatica and *S. mansoni* eggs and can therefore be used as biological control agent for these helminths.

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária, as helmintoses gastrintestinais ocupam lugar de destaque, uma vez que, são responsáveis por agir no desenvolvimento animal proporcionando retardo no crescimento, morte e gastos excessivos com o manejo (Araújo, 2006a).

No Brasil, grande parte da criação ainda é feita em regime de pasto, o que leva às constantes infecções por parasitos presentes nas pastagens. As perdas econômicas mundiais anuais causadas por helmintos parasitos gastrintestinais são estimadas em milhões de dólares, devido ao impacto que causam na produção de carne e leite e aos altos custos das medidas de controle (Anualpec, 2003).

A maioria dos animais é susceptível às infecções verminóticas, principalmente os mais jovens. Os vários prejuízos ocasionados por essas infecções estão relacionados com a queda na produção, retardo no crescimento do animal, custos com tratamento médico veterinário, com os recursos terapêuticos a serem empregados e, em algumas situações com os prejuízos advindos com a morte desses animais (Araújo, 2006a). Algumas dessas infecções verminóticas podem parasitar o homem que, em alguns casos, serve de hospedeiro acidental, como é o caso da fasciolose, ou como hospedeiro principal no caso da esquistossomose (Guimarães, 2005).

A fasciolose é uma zoonose de importância para a saúde pública, é causada pelo trematóide digenético *Fasciola hepatica*, que acomete o fígado e os canais biliares de muitas espécies de animais domésticos e mamíferos selvagens, ocasionando grande prejuízo econômico à pecuária mundial (Echevarria, 2004).

A esquistossomose mansônica é uma antropozoonose causada pelo trematóide digenético *Schistosoma mansoni*, que está entre os mais abundantes agentes de infecções em seres humanos, parasitando aproximadamente duzentos milhões de pessoas em todo o mundo (Loukas et al., 2007).

Atualmente, pesquisadores de todo mundo buscam medidas alternativas para o controle destas e de outras endoparasitoses de animais domésticos, visando à diminuição do emprego de quimioterápicos e, conseqüentemente, a redução dos níveis de poluentes no ambiente e nos produtos de origem animal (Mota et al., 2003). Dentre as diversas propostas que têm sido trabalhadas 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

gastrointestinais, e cuja ação se dá por meio de organismos vivos que atuam como antagonistas naturais no ambiente (Araújo et al., 2004b). Entre esses antagonistas estão os fungos nematófagos que possuem a capacidade predatória sobre os helmintos parasitos gastrointestinais de animais domésticos, destacando-se os fungos predadores dos gêneros *Duddingtonia* e *Monacrosporium* e o fungo ovicida do gênero *Verticillium* denominado recentemente de *Pochonia*, já comprovados como agentes em potencial para o controle biológico (Gams e Zaire, 2001; Ciarmela et al., 2002; Araújo et al., 2007).

Trabalhos realizados com *D. flagrans* e *M. sinense* relatam sua ação sobre larvas infectantes de helmintos parasitos gastrointestinais de animais domésticos com resultados promissores. Entretanto, existe uma carência de trabalhos desses fungos sobre ovos de helmintos. Por outro lado, a espécie *Pochonia chlamydosporia* tem sido utilizada com sucesso sobre ovos de helmintos parasitos gastrointestinais (Braga et al., 2007; Araújo et al., 2008).

Medidas alternativas de controle que sejam eficientes e não prejudiciais ao meio ambiente são de grande importância no combate à *F. hepatica* e ao *S. mansoni* no Brasil (Coelho et al., 2004; Echevarria, 2004).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Breve histórico

O primeiro fungo nematófago a ser estudado foi o *Arthrobotrys oligospora*, por Fresenius, em 1852, que, por ventura, nessa época não percebeu sua capacidade predatória, o que somente foi proposto por Zopf em 1888. Pouco então se conhecia a respeito desses fungos, até que em 1937 Drechsler publicou um extenso trabalho que continha informações bem detalhadas sobre algumas espécies que haviam sido descritas e mais 15 outras ainda desconhecidas (Mota et al., 2003).

Os trabalhos de Duddington, de 1950 a 1972, e Barron a partir de 1969, contribuíram para que fosse iniciado o desenvolvimento na área de controle biológico de helmintos, referindo-se em especial ao isolamento e descrição de novas espécies (Gray, 1988). A maioria das espécies de fungos descritas era antigamente classificada na classe *Fungi imperfecti* (com reprodução assexuada ou imperfeita), com divisão *Deuteromycetes*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Hyphomicetales* e família *Moliniaceae*. Mais recentemente, estágios de reprodução sexuada, dita “perfeita”, foram verificados em algumas espécies que estão sendo recolocadas como pertencentes à classe *Ascomycota* (Griffin, 1994; Mota et al., 2003).

Até a década de 60, grande parte dos fungos ainda era classificada como pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys* Corda, *Dactylaria* Saccardo, *Dactyella* Grove e *Trichothecium* Link; mas, posteriormente, vários novos gêneros foram descritos, incluindo *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis* (Araújo et al., 2004a).

No Brasil, as primeiras pesquisas com fungos nematófagos foram iniciadas com o isolamento de algumas espécies a partir de helmintos infectados (Alcântara e Azevedo, 1981) e, a partir disso, muitos trabalhos comprovando sua ação como agentes de biocontrole sobre helmintos e fitonematóides foram realizados com sucesso. Em estudo *in vitro*, Freire e Bridge (1985) demonstraram a capacidade predatória de duas espécies de fungos nematófagos ovicidas, *Paecilomyces lilacinus* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Meloidogyne incognita*, um fitonematóide, com taxas de infecção em torno de 50,7% e 43,7%, respectivamente.

Posteriormente, Carneiro (1987) trabalhando com um filtrado de isolado oportunista observou uma redução na taxa de eclosão de ovos de *Meloidogyne arenaria*.

Silva (1990) conseguiu isolar fungos endoparasitas na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso – Minas Gerais, demonstrando sua ocorrência, caracterização e potencial para o controle biológico.

Santos (1990) observou pronunciado efeito antagonista de *Monacrosporium ellypsosporum* sobre o fitonematóide *Meloidogyne incognita* Chitwood, raça 3. Mitsui e Sharma (1991) detectaram várias espécies de fungos como o *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Dactyella* em solos do cerrado do Distrito Federal.

Ferraz et al. (1992) e Maia e Ferraz (1993) deram prosseguimento a alguns levantamentos para a detecção de fungos nematófagos em solos brasileiros, encontrando *P. lilacinus*, conseguindo posteriormente o seu isolamento. No trabalho de Pria (1992), estudou-se o controle biológico de fungos nematófagos sobre fitonematóide, demonstrando a necessidade da combinação de isolados predadores e oportunistas. Santos et al. (1995) utilizando conídios de *A. oligospora* e *D. flagrans* reduziram o número de larvas de ciatostomíneos de eqüinos.

Araújo et al. (1992, 1993, 1994, 1995) desenvolveram 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 *P. lilacinus* sobre ovos de *Toxocara canis*. Araújo (1996) administrou dois milhões de conídios de um isolado de *A. robusta*, por via oral, duas vezes por semana, durante quatro meses em bezerros naturalmente infectados, conseguindo resultados promissores ($p < 0,05$) na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) com índices de redução em torno de 53,81 % e 70, 45 % de redução na recuperação de vermes durante a necropsia dos animais traçadores.

A partir de então, em ensaios preliminares Araújo et al. (1998) testaram à viabilidade de um isolado de *A. robusta* em helmintos parasitos de bovinos, observando uma redução de 73,81% no OPG e 70,45% no número de vermes recuperados da necropsia dos animais, nos últimos três meses de experimento.

Posteriormente, Araújo et al. (1999) e Araújo e Sampaio (2000) conseguiram a passagem de fungos nematófagos do gênero *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* pelo trato gastrointestinal de bovinos e, com isso, o controle significativo da contaminação das pastagens por helmintos parasitos gastrintestinais nesses animais.

Em estudo mais amplo, contudo sobre fitonematóides, Mizobutsi et al. (2000) avaliaram cerca de 64 isolados de 25 espécies fúngicas quanto à capacidade predatória sobre ovos de *Heterodera glycines* e *Meloydogine javanica*, demonstrando em seus respectivos resultados taxas de infecção em torno de 82%.

Araújo (2001) registrou indícios da existência da interação entre lectinas encontradas na superfície das armadilhas de fungos do gênero *Arthrobotrys* com carboidratos de superfície de larvas de *Cooperia punctata*.

Assis e Araújo (2003) em trabalho com *M. sinense* e *M. appendiculatum* notaram redução do número médio de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperadas das placas de Petri e das coproculturas em torno de 70%, demonstrando a eficácia desses isolados frente a essa helmintose.

Castro et al. (2003) em trabalho *in vitro*, testaram o controle de larvas ciatostomíneos em distintas faixas de temperaturas, demonstrando o potencial dos fungos do gênero *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* com resultados de 86,3% e 95,59% respectivamente, para faixa máxima em torno de 30°C de temperatura.

Nos três últimos anos, outros trabalhos utilizando fungos nematófagos foram realizados e os resultados ainda demonstram a viabilidade do controle biológico frente às helmintoses gastrintestinais dos animais domésticos. Com o trabalho de Campos et al. (2004) foi verificada a capacidade predatória de fungos nematófagos do gênero *Monacrosporium* previamente submetidos a diferentes métodos de preservação, sobre larvas de *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp., observando que sua capacidade predatória não foi afetada, possibilitando, com isso um maior conhecimento sobre meios alternativos de preservação *in vitro*. Araújo et al. (2006b) testando a passagem do isolado fúngico *D. flagrans* em trato gastrintestinal de caprinos, observaram uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de larvas recuperadas de *Strongyloides papillosus* e *H. contortus* após os tratamentos com esse isolado em relação aos animais do grupo controle. Araújo et al. (2007) avaliaram a viabilidade de *M. thaumasium* sobre larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de caprinos em campo, no Semi-árido Cearense, observando que o grupo de animais tratados com esse fungo apresentou redução no OPG, menor carga parasitária e maior ganho de peso frente aos animais não tratados.

2. 2 Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos têm atraído a atenção de pesquisadores desde que sua função como predador de nematóides foi reconhecida no final do século XIX por Zopf, em 1888 (Gray,1988).

Uma grande abundância de antagonistas naturais dos helmintos, entre eles protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos já são descritos como controladores biológicos. Os fungos nematófagos 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 (Kerry, 2000; Ribeiro, 2003).

Fungos nematófagos compreendem diferentes tipos de fungos, são cosmopolitas, ocorrendo em solos naturais, solos agricultáveis e em todos os tipos de matéria orgânica em decomposição. No ambiente esses fungos são biologicamente muito importantes, desempenhando um papel na reciclagem de carbono, nitrogênio e outros elementos que são originados a partir da degradação do nematóide (Graminha, 2004).

Segundo Carter (1988), um fungo nematófago pode coexistir no ambiente sob duas formas: como um agente saprófita ou como um parasita. Além disso, ainda são descritos como organismos imóveis e possuidores de parede celular bem semelhante à parede celular dos vegetais, principalmente quanto à composição química e estrutural. Já em relação à sua suplementação, 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 (Waller e Faedo, 1996; Larsen et al.,1999).

De acordo com Barron (1977) e Mota et al. (2003), mais de 150 espécies de fungos nematófagos já foram catalogados. Esses fungos também são conhecidos como fungos destruidores de helmintos, mas por apresentarem características ovicidas podem também predação ovos de helmintos. Dessa forma, comportando-se como antagonistas naturais, são capazes de promover a captura, a morte ou mesmo a sua destruição, contribuindo para que os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade diminuam e se enfatize a necessidade da empregabilidade dos programas integrados de controle parasitário, seleção de animais mais resistentes e confecção de vacinas, associado ao controle biológico com a utilização desses fungos (Araújo et al., 1998, 2004a).

Os fungos nematófagos são divididos em três grupos: endoparasitas, predadores e oportunistas, que são parasitas de ovos, cistos e fêmeas. Essa divisão também equivale à sua morfologia e as características funcionais que estão associadas com a produção de estruturas especializadas para a captura de helmintos. Existe ainda um quarto grupo conhecido como fungos produtores de metabólitos tóxicos, que embora pouco estudados também são classificados como fungos nematófagos (Araújo et al., 2004b).

Os fungos endoparasitas persistem principalmente como esporos, mas algumas vezes como clamidósporos (esporos resistentes) que são liberados no momento da desintegração do nematóide. São encontrados em várias classes taxonômicas, sendo subdivididos em três grupos: que seguem: grupo I, correspondente às espécies que encistam, *Chytridiomyces* (*Catenaria* Sorokin) e *Oomycetes* (*Myzocyttium* Schenk, *Haptoglossa* Drechsler e *Lagenidium* Schenk). Grupo II correspondente às espécies produtoras de conídios adesivos, Deuteromycotina (*Verticillium* Nees, *Cephalosporium* Corda, *Drechmeria coniospora* Gans e Jansson, *Hirssutella rhossiliensis* Minter e Brady, *Harposporium subuliforme* Drechsler) e de *Zygomycotina* (*Meristacrum asterosporium* Drechsler, *Zygnemomyces* Miura e *Gonimochaete* Drechsler); e o grupo III correspondente às espécies que também produzem conídios adesivos referente à *Basidiomycotina* (Gray, 1988; Araújo et al., 2004a).

Apenas quatro espécies de fungos endoparasitas são cultivadas em laboratório: *Drechmeria coniospora*, *Hirssutella rhossiliensis*, *Nematoctonus concurrens* e *Nematoctonus haptocladus* (Jatala, 1986). Alguns trabalhos realizados por Kerry e Mullen (1981) e Jatala et al. (1979) demonstraram que a ação de fungos endoparasitas sobre os fitonematóides *Heterodera avenae* e *Meloidogyne* sp foi significativa, diminuindo suas populações.

Segundo Mota et al. (2003) e Araújo et al. (2004a) 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. Grande parte dos fungos endoparasitas é parasita obrigatório e por isso possuem uma faixa restrita de hospedeiros. Devido a esse fato, a sua utilização e produção *in vitro* é menor, pois tendem a ter mercados mais limitados e a ser onerosos quanto à sua produção em escala industrial. 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 (Ribeiro, 2003). De acordo com Stirling e West (1991), a dependência de água livre para a atividade dos fungos endoparasitas é o principal fator de limitação para a sua eficiência como controladores biológicos de organismos.

A grande maioria dos fungos nematófagos está incluída dentro do grupo dos predadores, e produzem até seis tipos de armadilhas: hifas adesivas não diferenciadas; ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, onde em algumas vezes podem se unir formando redes adesivas simples bidimensionais; nódulos adesivos; anéis constritores; e anéis não constritores. Entretanto, o tipo de armadilha mais encontrado em fungos predadores são as redes adesivas. A hifa é usada como armadilha e a presa é capturada por adesão (Mota et al. 2003). Este grupo de fungos é o mais estudado e, por conseguinte, o mais utilizado 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. Além disso, possuem a vantagem de apresentar maior potencial de industrialização (Larsen, 1999).

A divisão dos fungos predadores foi proposta por Cooke em 1963, baseando-se na velocidade de seu crescimento micelial. Dessa forma, os fungos de crescimento mais rápido formarão armadilhas tipo redes tridimensionais; já os fungos de crescimento intermediário formarão as armadilhas tipo nódulos; e aqueles com crescimento mais lento, formarão anéis constritores. Fungos formadores de redes são reconhecidos como os mais competitivos em relação à microbiota do solo (Mota et al., 2003).

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 de serem comercializados, principalmente pelo seu maior isolamento e facilidade de cultivo em laboratório (Gronvold et al., 1996).

Segundo Waller e Faedo (1993), o uso de fungos predadores de helmintos parasitos gastrintestinais auxilia o controle químico desses parasitos e deveria ser feito não somente em condições em que ocorrer previsão de maior infestação de pastagens por ovos e larvas de terceiro estágio, mas também quando houver melhores condições para o crescimento dos fungos no meio ambiente, prevenindo assim o parasitismo clínico e a consequente perda de produtividade.

Castro et al. (2003) mencionam que os fungos nematófagos vêm sendo pesquisados como uma alternativa viável e promissora para que possam ser utilizados no controle biológico das diversas espécies de helmintos parasitos gastrintestinais dos animais domésticos. Esses fungos apresentam fases saprofítica e parasítica; entretanto, a transição de uma para a outra ocorrerá no momento da formação de armadilhas, momento esse influenciado por fatores bióticos e abióticos.

Algumas espécies de predadores desenvolvem estruturas de captura com resultado de estímulos externos, enquanto outras as desenvolvem espontaneamente, sendo as mais dependentes de nematóides como fonte primária de nutrientes. As espécies formadoras espontâneas de armadilhas são mais abundantes em solo que dispõe de matéria orgânica (Gray, 1985).

Araújo et al. (1999) e Dimander et al. (2003) mencionam que dentre as espécies de predadores mais estudadas e utilizadas como controladores biológicos destacam-se os gêneros *Duddingtonia* e *Monacrosporium*.

Os gêneros *Duddingtonia* sp e *Monacrosporium* sp são produtores de redes tridimensionais. A forma de captura por fungos predadores é realizada por meio do desenvolvimento de um amplo sistema de hifas vegetativas e por estruturas de captura dispostas ao longo destas. Algumas dessas estruturas de captura são produzidas graças a estímulos externos, como quantidade e presença dos nematóides, motilidade, produção de substâncias deles derivadas, estresse fisiológico, e fatores biológicos como luminosidade, presença de água e estado nutricional do isolado fúngico predador, quando em cultivo em laboratório (Araújo et al., 2004b).

De acordo com Mota et al. (2003), uma ramificação lateral ereta cresce inicialmente da hifa vegetativa, que se curva e cresce em direção à hifa-mãe, sofrendo anastomose. Assim, quando uma outra hifa repetir esse processo por meio também de outra anastomose, acontecerá a formação da rede tridimensional.

Os fungos predadores produzem órgãos de captura em cultura pura, mas o processo de diferenciação das hifas em armadilhas ocorrerá dentro de 24 horas após a interação do fungo com o nematóide, e quanto maior a motilidade dos nematóides maior será a produção de armadilhas pelo fungo, visto que o estímulo será maior em solo com microbiota rica. Um fungo que produz armadilhas de maneira espontânea se sobressairá sobre uma espécie com produção de armadilhas não-espontâneas, uma vez que na grande maioria das vezes no solo as condições nutricionais estressantes são mais comuns para o seu desenvolvimento

(Araújo et al., 2004a; Gomes et al., 2001). A formação de armadilhas pode ser atribuída também aos esporos (Dackman e Nordbring-Hertz, 1992).

Nordbring-Hertz e Stahammar (1978) registraram em experimento *in vitro* que helmintos vivos foram capazes de induzir a formação de armadilhas mais rapidamente que extratos e peptídeos. O que se observa é que, durante esse processo de diferenciação, um número maior de armadilhas é produzido em comparação com o número de helmintos parasitos gastrintestinais presentes nas placas de Petri (Gronvold et al., 1996; Gomes et al., 1999).

Todavia, não se deve esquecer que a cutícula dos helmintos parasitos gastrintestinais é um órgão de extrema importância, 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, por isso penetrar esta barreira é essencial para qualquer processo infectante (Perry e Wright, 1998). De acordo com Barron (1977) o mecanismo pelo qual a cutícula do verme seria penetrada pelo fungo não estava bem elucidado, mas possivelmente este processo ocorreria de forma parcialmente mecânica e enzimática. Para Araújo (2001), a fase inicial de penetração está associada com o reconhecimento mediado por uma interação lectina-carboidrato. Dentro das diversas espécies existe uma variação da estrutura da cutícula; porém, com arranjo comum, que apresenta uma epicutícula externa, uma região cortical externa eletrônica-densa, uma camada subjacente e uma basal de aparência estriada. Apenas três principais categorias de proteínas têm sido identificadas como componentes da cutícula dos nematóides, sendo essas: 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) (Fetterer e Rhoads, 1993).

Sobre o grupo dos fungos oportunistas, a primeira determinação de sua capacidade ovicida sobre ovos de helmintos foi descrita por Lestan em 1970 (Kerry e Hidalgo, 2004).

Os fungos oportunistas além de parasitarem ovos, cistos e fêmeas de fitonematóides e de helmintos, são saprófitos e, por essa razão, não dependem da presença do parasita no solo para a sua sobrevivência, sendo por isso facilmente cultivados em laboratório. Suas hifas penetram a casca do ovo através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao

passar pela camada vitelínica e atravessa a camada quitínica e lipídica adjacente. Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina torna vacuolizada e a camada de lipídios torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior (Araújo et al. 2004a; Ciarmela et al., 2002).

É um grupo bastante promissor para ser empregado no controle biológico de helmintos, principalmente porque reduzem em cerca de 70 a 90% os níveis de ovos viáveis no solo (Ciarmela et al., 2000). Entretanto, muitas vezes o que impede sua plena eficácia é a estratégia desenvolvida pelos parasitos. A maioria desses helmintos parasitos gastrintestinais produz ovos que rapidamente darão origem a larvas, dificultando seu processo de interação com os ovos (Jansson e Nordbring-Hertz, 1988).

O parasitismo de ovos por fungos é um importante fenômeno biológico que tem nas espécies *Pochonia chlamydosporia* (syn. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), *Paecilomyces lilacinus* e *Dactyella ovoparasitica* seus principais representantes com significativa atividade ovicida (Lysek e Sterba, 1991).

Após um prolongado estudo de observação, Lysek (1976) estabeleceu um método qualitativo para classificar a atividade ovicida. Esse método primeiramente proposto sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, determina que, o mecanismo de ação de um fungo oportunista está baseado em três tipos básicos de atividade ovicida, com sete subtipos: (1) fisiológica, com efeito bioquímico sem danos morfológicos a casca do ovo, (2) efeito bioquímico lítico, com alteração morfológica progressiva da casca do ovo e danos ao embrião e (3) efeito lítico e morfológico, com penetração do ovo, ataque e morte ao embrião. Em reação à sua subdivisão segue-se: (1a) onde o fungo irá inibir o desenvolvimento embrionário com início da sua atividade ovicida, é reconhecido como um efeito temporário; (1b) os metabólitos do fungo proporcionarão um desenvolvimento anormal das larvas com número aberrante de cromossomos; (2a) ocorrerá a desintegração e remoção enzimática da casca do ovo, e após excessivas lesões dará início à fase de penetração e danos ao embrião; (2b) acontecerá uma mudança na permeabilidade da casca, modificação da barreira osmótica e por consequência vacuolização e desintegração do embrião; (3a) o micélio do fungo penetrará em apenas um local da casca intacta do ovo, e promoverá um ataque e cessamento no desenvolvimento do embrião; (3b) o micélio do fungo penetrará em vários locais da casca promovendo a destruição do embrião

e (3c) os fungos iniciarão o processo de ataque enzimático e conseqüentemente morte ao embrião.

A classificação da atividade ovicida atualmente foi simplificada e é estabelecida de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca, onde são visualizadas as 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 (Lysek e Nigenda, 1989; Lysek e Sterba, 1991).

Na maioria das vezes, se observa que o tipo de atividade ovicida encontrada sobre os ovos dos parasitos é uma mistura dos efeitos dos tipos 2 e 3, mas, 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 (Lysek e Chalupová, 1978; Lysek et al., 1982).

Os ovos nos estágios iniciais de desenvolvimento serão mais facilmente penetrados do que aqueles em estádios mais maduros, contendo formas juvenis. A eficiência do fungo parasita de ovos está relacionada ao estágio do ciclo de vida do hospedeiro em que corre o ataque, da agressividade e especificidade do fungo (La Mondia e Brodie 1984).

De acordo com Rodríguez-Kábana et al. (1984), em uma mesma espécie fúngica poderão ocorrer algumas variações no que se refere à sua capacidade predatória de ovos, e sendo assim, diferenças entre raças e biótipos serão decisivas na determinação de sua ação. Essas diferenças foram encontradas por alguns pesquisadores, principalmente em isolados de *P. lilacinus* parasitando ovos de *M. incognita*, onde foi observado que em 12 isolados dessa espécie apenas cinco exemplares mostraram ação predatória de forma uniforme (Carneiro e Gomes, 1993).

Ainda, de acordo com Mizobutsi et al. (2000), uma grande parte de espécies fúngicas já foi encontrada em ovos, fêmeas e cistos de nematóides de vida livre, porém, sua presença não significa propriamente que se trate de um parasito de ovos. Muitas vezes, necessita-se de alguns estudos de infecção sobre esses ovos para que seja comprovada a sua patogenicidade.

Alguns fungos ovicidas produzem metabólitos tóxicos que afetarão diretamente o embrião em desenvolvimento e a eclosão das larvas (Bittencourt et al., 1999; Monteiro et al., 1998). Em estudo para a verificação da taxa de eclosão

sobre ovos de *M. incognita*, os fungos *P. lilacinus* e *P. fumosoroseus* apresentaram níveis de redução de aproximadamente 90% (Carneiro e Gomes, 1993).

Os fungos ovicidas produzem enzimas quitinolíticas que estão potencialmente envolvidas no processo de infecção dos ovos, mas nem todos os fungos quitinolíticos infectam ovos (Kerry e Hidalgo, 2004). Segundo Dackman et al. (1989), a habilidade de uma espécie para parasitar ovos está diretamente relacionada com sua atividade enzimática lítica, podendo ser de natureza quitinolítica e proteolítica.

Basualdo et al. (2000) acreditam que o mecanismo de atuação desses fungos contra os ovos de helmintos esteja baseado na decomposição enzimática e na biossíntese de toxinas. Esses fungos são classificados de acordo com o seu modo de ação: no primeiro grupo, classifica-se aquele que se utiliza de seu próprio metabólito para agir de forma negativa sobre o embrião, não alterando o aspecto morfológico da parede do ovo; já no segundo grupo, o fungo penetrará ativamente no ovo através de hifas que atingirão o embrião (Lysek e Nigenda, 1989).

Segundo Araújo et al. (2004a), a hifa penetra no ovo através de pequenos poros existentes na camada vitelínica da casca, provocando com isso uma alteração na sua permeabilidade e, em consequência disso, uma expansão em seu volume com colonização do conteúdo do ovo. Alguns estudos ultra-estruturais em ovos e juvenis de *M. arenaria* demonstraram que o fungo ovicida penetra o ovo de forma direta, através de pequenos poros (aberturas) existentes na sua camada vitelínica (Freire e Bridge, 1985). Estas aberturas são produzidas pela pressão das hifas intumescidas, uma vez que em ovos de helmintos não existem aberturas naturais.

2.3 Controle biológico

Gronvold et al. (1996) definem o termo “controle biológico” como sendo a aplicação e utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente e que possam diminuir a um limiar aceitável determinada população de certo agente agressor que esteja causando perdas produtivas, tanto na pecuária como na agricultura. Na prática, o controle biológico não atuará sobre estádios internos de parasitos; mas, concentrarão suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estádios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais.

Segundo Freitas et al. (2006), os mecanismos de controle biológico são o parasitismo, a predação, a competição e a antibiose. Como regra de manutenção dos sistemas biológicos, toda população é regulada por antagonistas. Este processo

ocorre espontaneamente na natureza e não é dependente da interferência do homem. 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.

Os requerimentos mais importantes para o estabelecimento de um sistema de controle efetivo das helmintoses gastrintestinais englobam, principalmente, o conhecimento da epidemiologia dos helmintos e suas interações com os hospedeiros em um determinado ambiente. Contudo, na falta destas informações, poderá ocorrer utilização inadequada de tratamentos com anti-helmínticos causando o aparecimento de resistência (Araújo et al., 2004b). Os programas de controle parasitários eficientes devem estar baseados em informações sobre a disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos, viabilidade larvar e no uso de drogas anti-helmínticas sintéticas.

Waller (2005) menciona que o controle das helmintoses gastrintestinais dos animais domésticos é feito principalmente por meio da utilização de anti-helmínticos, que agirão sobre as formas parasitárias estabelecidas no hospedeiro. Porém, este método apresenta algumas desvantagens. Além disso, 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.

O método mais comum de controle de helmintos é através 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. Isso se deve ao seu uso continuado com múltiplas classes químicas que, na maioria das vezes, contribuem para que as pastagens estejam contaminadas por nematóides (Waller e Faedo, 1993; Suarez, 2002). Segundo Gamarro e Castanys (1993), a resistência adquirida às classes químicas de anti-helmínticos é atualmente um dos problemas mais graves enfrentados no tratamento das infecções helmínticas. Gárate et al. (1993)

mencionam ainda que, devido à baixa mortalidade e à alta morbidade provocada pelas infecções helmínticas, o seu interesse no desenvolvimento de maiores pesquisas está focado apenas em seu controle e tratamento, apesar de sua grande prevalência. Além disso, a produção de vacinas continua sendo um objetivo a longo prazo, pois muito são os fatores limitantes.

Dessa forma, os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade enfatizam sempre a necessidade da implantação de programas integrados de controle parasitário, que visem assegurar a saúde dos organismos vivos e ambientes menos contaminados (Mota et al., 2003). A maioria dos estudos sobre o controle biológico das helmintoses tem envolvido apenas utilização de fungos nematófagos predadores sobre larvas infectantes (L₃) de helmintos parasitos gastrintestinais (Waller et al., 1994; Mendoza-De-Gives et al., 1999).

Todavia, o controle biológico sobre ovos de helmintos é uma alternativa muito promissora e que vem se destacando atualmente. Além disso, fungos que impedem a evolução de ovos provavelmente são mais promissores como agentes de biocontrole, pois quando comparados aos fungos predadores e endoparasitas, seu efeito na redução de uma população de helmintos será bem mais acentuado. Por outro lado, existe uma carência de trabalhos que demonstrem a viabilidade dos fungos ovicidas frente aos diversos gêneros de helmintos. Alguns poucos trabalhos *in vitro* mencionados na literatura, relatam sua capacidade predatória sobre ovos ao longo de distintos intervalos de dias, demonstrando sua influencia negativa na viabilidade desses ovos (Ciarmela et al., 2002; Braga et al., 2007).

Jatala (1986) menciona 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, Essa afirmação é corroborada por Kerry (2000), que propõe que a maior parte da população de helmintos encontrados no ambiente está sob a forma juvenil e ovos e não como estágio adulto, o que favorece a ação predatória desses fungos ovicidas.

A resistência à passagem pelo trato gastrintestinal é uma característica importante em fungos nematófagos, quando se deseja o desenvolvimento de formulações de uso oral que permitam o controle de L₃ no ambiente (Araújo et al., 1999). Segundo Kerry (2000), algumas espécies ovicidas produzem clamidósporos e, portanto, poderiam ser empregados no controle das populações de helmintos parasitos gastrintestinais.

A administração de fungos nematófagos aos animais domésticos é considerada uma proposta promissora, pois o emprego desses fungos 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 (Barger, 1999; Mota et al., 2003).

A habilidade dos fungos nematófagos em colonizar a rizosfera tem sido apontada como uma característica importante de um agente de biocontrole (Pearsson et al., 1995). O sucesso para o estabelecimento desses fungos no solo dependerá basicamente de uma fonte alimentar que possa lhes garantir vantagens competitivas na microbiota existente (Kerry et al., 1984). Esses fungos são bastante comuns em solos naturais e em todo o tipo de material orgânico. Porém, sua atividade e quantidade no solo algumas vezes são incertas, já que necessitam de uma fonte primária de nutrição (Jaffee et al., 1996).

Segundo Faedo et al. (2002), para que um fungo seja efetivo como controlador biológico, esse deverá estar presente e ativo nas fezes, no solo e ambiente do mesmo tempo que as formas pré-parasitárias. Por outro lado, a baixa competitividade com fungos saprófitas no ambiente e a pequena produção de armadilhas são alguns fatores atribuídos como parte do insucesso de seu emprego. O fungo será mais promissor em solo fértil do que em fezes frescas (Juniper, 1957). Por isso, é necessária uma seleção de fungos nematófagos que possam atravessar o trato gastrintestinal dos animais, mantendo suas qualidades de crescimento e predação nos ovos e as fases pré-parasitárias nas fezes (Gronvold et al., 1996).

A aplicação de fungos no biocontrole de helmintos parasitos gastrintestinais vem auxiliar o controle químico. Ela deveria ser feita não só em condições em que ocorrer previsão de maior infestação de pastagens por ovos e larvas, mas também quando houver melhores condições para o crescimento dos fungos no meio ambiente. Essas ações previnem, com isso, o parasitismo clínico e a perda de produtividade, fornecendo uma quantidade de larvas suficientes aos animais para provocar o desenvolvimento de uma imunidade adquirida naturalmente (Waller e Faedo, 1993; Graminha et al., 2004).

2.4 Helmintos

Os helmintos constituem um vasto grupo de animais, onde estão incluídas as espécies de vida livre e aquelas de vida parasitária (Melo e Guimarães, 2005).

Segundo Almeida e Aires (1999), os helmintos de interesse médico veterinário são divididos em dois filios: o filo *Nemathelminthes* (“vermes redondos”) que engloba a classe Nematoda, e o filo *Platyhelminthes* (“vermes chatos”) formado pelas classes Trematoda e Cestoda. Entretanto, segundo estudos mais recentes, os representantes desse último filo foram distribuídos em três classes: Turbellaria, Trematoda e Cestoda ou quatro classes (Turbellaria, Monogenea, Trematoda e Cestoda) (Melo e Guimarães, 2005).

Os efeitos das infecções helmínticas nos animais são os mais variados, podendo ser resumidos basicamente em: danos à mucosa do abomaso e intestino, anemia, competição com o animal por minerais e outros nutrientes (Mcaulifee, 1977).

Em seres humanos, as infecções helmínticas são consideradas como uma das principais causas de morbidade nos escolares dos países em desenvolvimento, atingindo índices de até 90%. Sua presença está associada, quase sempre, ao baixo desenvolvimento econômico, carência de saneamento básico e falta de higiene. Na sua fase adulta, podem estar localizados em diferentes órgãos de acordo com a sua biologia ou podem migrar por diversos órgãos durante seu ciclo evolutivo. Sua distribuição, apesar de cosmopolita, concentra-se mais em ambientes pobres, com menor higiene (Santos et al., 2002).

Dentre os vários representantes do filo *Platyhelminthes* de interesse médico veterinário estão as espécies pertencentes à classe Trematoda, que parasitam o trato gastrointestinal dos mamíferos (Soulsby, 1982). Essa classe é composta por três grandes ordens de parasitos: Aspidogastrea, Monogenea e Digenea, sendo essa última a mais importante por abrigar parasitos que infectam seres humanos (Melo e Guimarães, 2005).

A ordem Digenea é assim denominada porque seus membros têm ciclo evolutivo indireto, com gerações assexuadas e sexuadas parasitando hospedeiros alternados. Possuem órgãos de fixação comumente representados pelas ventosas oral e ventral, essa última podendo também ser denominada de acetábulo. Seus representantes podem ser hermafroditas (monóicos) ou apresentarem sexo separado (dióicos) e a sua fertilização é do tipo cruzada. A ocorrência da autofertilização poderá também acontecer. Poucas são as espécies vivíparas na

ordem Digenea. Nessa ordem, além de outras espécies de interesse médico veterinário encontram-se a *Fasciola hepatica* e o *Schistosoma mansoni*, parasitas do sistema porta-hepático dos mamíferos (Soulsby, 1982; Melo e Guimarães, 2005).

2.5 *Fasciola hepatica*

Tem-se conhecimento da *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) desde o século IX, citado como a causa da “doença do fígado de ovinos” no 1º Tratado de Saúde Animal do Mundo Árabe. Estudos paleoparasitológicos referem-se à presença de *F. hepatica* em seres humanos e em animais datados de 4.500 anos (Dittmar e Teegn, 2003). Atualmente, encontra-se distribuída em toda a América Latina e em várias partes do mundo, e no Brasil foi reconhecida somente em 1921 por Lutz. Nos últimos tempos, vem sendo citada como importante causa de perdas econômicas na pecuária das mais diferentes regiões do planeta acarretando alta mortalidade e considerável redução na produção de carne, leite e lã, e por causar a fasciolose hepática nos animais e em seres humanos (Mas-Coma et al., 1999; Echevarria, 2004). É uma importante e comum parasitose nos ruminantes domésticos em todo o mundo (Girão e Ueno, 1985; Serra-Freire et al., 1995).

De acordo com Guimarães (2005) e Bowman et al. (2006), os adultos de *F. hepatica* são habitantes dos ductos biliares de ruminantes e de outros mamíferos. Echevarria (2004) discorre que a importância dessa doença atualmente se deve principalmente às perdas associadas com as condenações de fígados, mortalidade, redução da produção de carne, lã e leite, às infecções bacterianas secundárias, além da interferência com a fertilidade e aos altos custos com drogas fasciolicidas, fatos esses que influenciam diretamente na economia do país. Historicamente, nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais, vêm sendo reportada a incidência de fasciolose bovina, notadamente em sua forma crônica, a partir de dados de propriedades, matadouros e pó meio de exames coprológicos. A ocorrência de focos de fasciolose hepática em alguns estados do Brasil tem sido registrada com relativa freqüência (Serra-Freire, 1995; Gomes et al., 2002).

Scherer et al. (1999) mencionam que a presença desse helminto é um fator que pode limitar a criação de ruminantes domésticos em várias regiões do mundo, informação essa corroborada por Echevarria (2004).

Segundo Pille (1999) e Echevarria (2004) a fasciolose é uma doença cuja epidemiologia está associada fortemente à temperatura e disponibilidade de água.

Além disso, ela deve ser sempre considerada quando da investigação de causas como anemia, emagrecimento ou mortalidade de bovinos e ovinos pastejando áreas favoráveis à presença de *F. hepatica*. Sabe-se, contudo, que a epidemiologia da fasciolose está vinculada aos fatores climáticos, de manejo, topográficos, de pressão de pastejo, pela presença de hospedeiros que atuam como agentes facilitadores de sua disseminação, pela maior disponibilidade de metacercárias e pela presença dos ovos desse trematoda nas pastagens (Mattos et al., 1977).

Em adição, a fasciolose também é uma zoonose que até recentemente era considerada como doença de caráter secundário. *F. hepatica* raramente é responsável por doenças em seres humanos, sendo sua infecção acidental. Por outro lado, sabe-se que as áreas de alta prevalência de fasciolose humana não coincidem com aquelas em que tal enfermidade constitui um problema veterinário relevante (Pelegriani et al., 2007). Em seres humanos, ainda se desconhece a intensidade dessa parasitose, entretanto, a diferença para os outros hospedeiros vertebrados está no número de ovos expulsos nas fezes do ser humano que é em torno de dois por grama de fezes (Bendezú et al., 1982).

A importância da doença humana na saúde pública aumentou nos últimos anos. Em apenas 25 anos, 7.071 casos foram descritos em 51 países de todos os continentes, sendo que o maior número de casos (3286) foi constatado no continente americano. Na maioria das vezes, os achados são acidentais e estão distribuídos pelos Estados Unidos (1 caso), México (33), Cuba (782), Costa Rica (13), Porto Rico (18), Venezuela (11), Peru (1.210), Bolívia (1.021), Chile (45), Argentina (13), Uruguai com (95) casos (Esteban et al., 1998).

No Brasil, casos da doença foram descritos em seres humanos nos estados do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Bahia, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Pile et al., 2000; Mezzari et al., 2000; Farinazzo et al., 2001).

Segundo Mas-Coma et al. (1999), estima-se que possam existir até 17 milhões de pessoas infectadas com *F. hepatica* no mundo.

2.5.1 Ciclo Biológico

O ciclo biológico da *F. hepatica* é do tipo heteroxênico, o que demonstra a necessidade de um hospedeiro intermediário que normalmente é um molusco Pulmonata do gênero *Lymnaea*. Os parasitos adultos alojados nos ductos biliares colocam ovos operculados que podem variar em número de 20.000 a 50.000 por dia.

Estes saem através da bile para o intestino, de onde serão eliminados junto às fezes do hospedeiro vertebrado. E encontrando temperaturas médias adequadas que variam de 25° a 30°C, os ovos irão eclodir liberando os miracídios que buscarão os hospedeiros intermediários. Essa eclosão acontece em torno de 21 dias no verão, mas pode chegar a 90 dias no outono e na primavera. A presença de água e luz são fatores de extrema importância para que ocorra a eclosão do ovo, e caso o miracídio não encontre o hospedeiro intermediário, morrerá em poucas horas (Echevarria, 2004; Guimarães, 2005). A partir da penetração no caramujo do gênero *Lymnaea*, o miracídio perderá sua cobertura ciliada, migrando então para a gônada ou para a glândula digestiva (referida como o hepato-pâncreas) e formará um esporocisto. Se não encontrar esse caramujo dentro de 24 horas, o miracídio esgotará seus estoques de energia e morrerá. Cada miracídio formará um esporocisto, que por sua vez dará origem a cinco ou oito rédias. Estas crescem até que estourem a parede do esporocisto e são, dessa forma, liberadas para os tecidos do caramujo. As rédias, que possuem abertura oral e órgãos digestivos, abrem seu caminho pelos tecidos do hospedeiro invertebrado. Como o esporocisto, a rédia fica repleta de células germinativas, dando origem a rédias de segunda geração e, cada bolsa germinativa presente nas rédias de segunda geração dará origem a outro tipo de larva, a cercária (Guimarães, 2005; Bowman et al., 2006). Contudo, segundo Guimarães (2005), durante esse último evento surge a possibilidade de infecção dos mamíferos que pastam e também do ser humano, uma vez que ao sair do molusco as cercárias nadarão por alguns minutos e a seguir perderão a sua cauda, encistam-se, originando aí a metacercária que pode estar presente na água e nas verduras.

De acordo com Bowman et al. (2006), a partir da ingestão da metacercária ocorrerá o rompimento de sua parede cística no intestino delgado do hospedeiro. Agora, o trematóide jovem passa a ser denominado de “marita”, que penetrará no intestino e cruzará o espaço peritoneal invadindo o fígado. Então, após várias semanas de migração pelo parênquima hepático, os adultos penetrarão nos ductos biliares e, com o seu amadurecimento, começarão a postura dos ovos. Esse período ocorre a partir de um mês e meio pós-infecção.

2.5.2 Diagnóstico

Segundo Echevarria (2004), deve-se considerar a fasciolose a partir da investigação das causas de morbidade ou mortalidade de ruminantes domésticos que estejam pastejando em áreas onde existe *F. hepatica*. Em alguns casos, a

presença dos parasitos adultos ou imaturos pode ser facilmente detectada no fígado a partir da investigação em animais mortos.

No Brasil, os métodos de diagnóstico da fasciolose nos animais ainda se encontram restritos a exames coproscópicos. Este fato deve-se à não-existência de estudos que possam avaliar a resistência de hospedeiros vertebrados naturais ou mesmo de modelos de laboratório. Nas fases aguda e subaguda da doença não são detectados ovos nas fezes; porém, neste período já houve a instalação da lesão hepática. Sendo assim, nestas fases, o diagnóstico efetivo só poderá ser fornecido pelos achados de necropsia com a presença das formas imaturas no parênquima hepático. Já a fasciolose crônica pode ser diagnosticada pela presença de ovos nas fezes, usando-se para isto técnicas baseadas no princípio de sedimentação ou no de tamisagem progressiva. Deste modo, assinala-se o método mais seguro de diagnóstico da fasciolose crônica a recuperação de ovos nas fezes. Para a efetivação desse método, foram desenvolvidas diferentes técnicas de sedimentação; entretanto, os ovos só são encontrados nas fezes em torno de 90 a 120 dias após ingestão da metacercária, quando os parasitos atingem os canais biliares (Ueno e Gonçalves, 1998; Scherer et al., 1999; Echevarria, 2004).

Segundo Guimarães (2005), no ser humano, o diagnóstico clínico é difícil de ser feito. Os exames laboratoriais incluem a pesquisa de ovos nas fezes ou na bile. Mas, como a produção de ovos no ser humano é pequena, deve-se ater para o cuidado de resultados falso-negativos, mesmo quando se comprova a presença do parasito. O diagnóstico sorológico oferece maior confiabilidade, mesmo não possuindo uma sensibilidade muito alta, e sendo assim deve-se atentar para os resultados cruzados. Esse mesmo autor cita, ainda que, os métodos sorológicos mais indicados para o diagnóstico da fasciolose são intradermorreação, imunofluorescência, reação de fixação de complemento e ELISA.

2.5.3 Medidas de controle e tratamento

O controle efetivo da fasciolose nos animais domésticos inclui um bom conhecimento da epidemiologia da doença por meio de dados meteorológicos, o conhecimento do comportamento dos moluscos presentes no local e o nível de infecção dos animais nas diversas estações do ano (Fuentes et al., 2001). O uso de anti-helmínticos com ação fasciolicida que sejam de fácil aplicação, que não deixem resíduos na carne e leite e que sejam altamente eficazes contra formas adultas e imaturas de *F. hepatica* ainda têm sido requeridos como elemento fundamental no

tratamento. Atualmente, têm sido descritas as drogas rafoxanida, closantel e triclabendazole. Ainda é necessário o conhecimento sobre a epidemiologia do parasito, uma vez que o pico de produção de metacercárias ocorre durante as estações do verão e outono. Entretanto, nos casos de fasciolose crônica, como já existem lesões hepáticas consolidadas, como nos bovinos, a imunidade já está estabelecida, não ocorrendo com isso uma resposta efetiva aos tratamentos (Echevarria et al., 1979).

Em seres humanos, o tratamento da fasciolose hepática tem sido referido como clínico ou invasivo. O tratamento clínico, ainda em fase quase experimental, baseia-se na utilização de fármacos como o bitionol ou triclabendazol, com relatos promissores de alguns autores, inclusive com regressão das lesões hepáticas (Queiroz et al., 2002; Carrada-Bravo, 2003).

Assim como nas helmintoses gastrintestinais dos animais domésticos, a resistência de *F. hepatica* às drogas fasciolicidas tem sido detectada. Este fato então deixa bem claro que o controle de *F. hepatica* deve obrigatoriamente incluir medidas alternativas que visem a diminuição das formas adultas e imaturas, diminuindo o risco de novas infecções para animais, além do risco iminente de populações das áreas rurais (Echevarria, 2004; Marcos et al., 2007).

2.6 *Schistosoma mansoni*

A esquistossomose é endêmica em 74 países, sendo estimado que aproximadamente 200 milhões de pessoas encontram-se infectadas e outras 500 a 600 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão de doença (World Health Organization, 2002). É a mais importante doença causada por helmintos em termos de morbidade e mortalidade, e atualmente já é considerada uma pandemia (King et al., 2005). As espécies *S. japonicum*, *S. mekongi*, *S. haematobium*, *S. intercalatum* e *S. mansoni* completam o ciclo no homem causando sérios problemas de saúde pública. A doença é determinada pelas fases: pré-postural, aguda e crônica. Tradicionalmente no Brasil, a esquistossomose mansônica é considerada como endemia rural, com crescente número de casos notificados em grandes cidades. A espécie *S. mansoni* é a única que é endêmica no Brasil, onde se estima 6,3 milhões de infectados e 26 milhões de habitantes expostos ao risco da infecção, pois residem em áreas endêmicas como os estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Pernambuco e Alagoas (Katz e Peixoto, 2000).

Além dos dados de prevalência, ressalta-se o número de internações e óbitos devido à esquistossomose divulgados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o Brasil. Segundo Katz e Peixoto (2000), as observações dos dados hospitalares mostram que houve uma redução do número de internações a partir da década de 1990, com um decréscimo de aproximadamente 1.500 casos da doença confirmados em 1998. Contudo, a literatura discorre que a mortalidade ainda é bastante expressiva, uma vez que 4.391 pessoas morreram no Brasil entre 1990 e 1997 devido à esquistossomose.

Segundo dados do Ministério da Saúde de 2003, o Estado de Minas Gerais é a maior área endêmica no Brasil, com uma prevalência estimada em 7,1 % da população e transmissão confirmada em 523 municípios do Estado. Em Belo Horizonte (MG), por exemplo, há focos naturais de infecção pelo *S. mansoni* com grande número de casos identificados nas últimas décadas (Martin et al., 2003). No Estado da Bahia, utilizando dados secundários de quatro décadas, Barreto e Carmo (1994) encontraram prevalência média de 15,6% no ano de 1950 e de 9,5% em 1994. Em trabalho recente com escolares residentes na cidade de Salvador, no Estado da Bahia, Guimarães e Tavares-Neto (2006) determinaram a prevalência de esquistossomose em torno de 30,2% das crianças estudadas.

No Estado de Pernambuco, Barbosa et al. (1996) associaram a urbanização da esquistossomose como decorrência da migração de pessoas procedentes de áreas rurais ou de pequenas localidades na busca por trabalho nas cidades de maior porte.

2.6.1 Ciclo biológico

S. mansoni possui ciclo biológico complexo e para completar seu desenvolvimento, necessita de um hospedeiro definitivo, geralmente o homem, e um hospedeiro intermediário, que são algumas espécies de molusco do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, segundo Paraense (1972), apesar de ter sido identificado dez diferentes espécies de *Biomphalaria*, somente três espécies (*Biomphalaria tenagophila*, *B. straminea* e *B. glabrata*) foram encontradas naturalmente infectadas, portanto estão envolvidas na transmissão da esquistossomose. Cinco anos é a vida média do *S. mansoni*; embora alguns casais possam viver mais de 30 anos eliminando os ovos. O processo de penetração dos miracídios nos moluscos tem duração entre 10 e 15 minutos, e durante esse evento apenas 30% dos miracídios conseguirão penetrar e evoluir. Alguns autores sugerem existir uma atração

miracidiana com relação aos moluscos. Contudo, isso poderia ser decorrente da detecção de substâncias denominadas de miraxone, que são produzidas e liberadas pelos moluscos, difundidas no meio aquático, e posteriormente detectadas através de terminações sensoriais da papila apical ou *terabratorium* presente no miracídio (Melo e Coelho, 2005).

Segundo Coelho et al. (2004), a taxa parasitária nos moluscos pelos miracídios é notavelmente influenciada pelas altas médias de temperatura; em temperaturas médias de 26°C, cerca de 80% dos moluscos serão infectados.

Dentro do molusco, o miracídio de *S. mansoni* passará por uma série de ciclos de reprodução assexuada, transformando-se em um saco com parede cuticular contendo a geração de células germinativas denominada de esporocisto. O desenvolvimento do *S. mansoni* no molusco envolverá duas gerações de esporocistos: 1º geração aparecerá em dois a três dias após a penetração do miracídio, onde cada esporocisto de 1º geração dará origem a 400 esporocistos de 2º geração. Essa geração seguinte aparecerá a partir do 14º dia de infecção contendo cerca de 50 a 100 células germinativas. As células germinativas do esporocisto de 2º geração originarão as cercárias que, em temperatura média de 26°C, escaparão do esporocisto (Freitas, 1982). O ser humano se infectará pela penetração das cercárias de forma ativa na pele ou nas mucosas, por ocasião dos banhos ou trabalhos na águas. Após alcançar as camadas mais profundas da pele, as larvas, aqui denominadas de esquitossômulos, migram pelos pulmões, maturam e se reproduzem no sistema porta-hepático. A fêmea de *S. mansoni* poderá ovipor cerca de 400 ovos por dia na parede de capilares e vênulas. Parte dos ovos maduros fica retida nos tecidos do hospedeiro, principalmente fígado e intestino, sendo o principal responsável pelo desenvolvimento das formas sintomáticas graves. O restante dos ovos é eliminado no ambiente juntamente com fezes contaminadas e, em contato com a água, as larvas presentes dentro dos ovos do parasito (miracídios) eclodem e nadam ativamente à procura do hospedeiro intermediário para nova penetração. Esse evento é estimulado por temperaturas altas, luminosidade e oxigenação da água (Melo e Coelho, 2005).

2.6.2 Diagnóstico

Freitas (1982) e Melo e Coelho (2005) mencionam que a esquistossomose pode ser uma suspeita clínica, mas o diagnóstico definitivo só poderá ser estabelecido mediante ao exame laboratorial, fato este decorrente da apresentação do quadro clínico e dos dados epidemiológicos. Dessa forma, o diagnóstico conclusivo será confirmado pelos exames laboratoriais, que incluem métodos diretos (exames de fezes, biópsia retal e ultra-sonografia) e métodos indiretos (intradermorreação, reações de fixação do complemento, reação de hemaglutinação indireta, radioimunoensaio, ELISA, e pesquisa de anticorpos circulantes). Destes, o exame de fezes, pela sua simplicidade e objetividade é o principal método de diagnóstico para essa doença e atualmente é amplamente difundido nos exames de rotina (Rey, 2001).

Ainda segundo Rey (2001), os ovos de *S. mansoni* são grandes e bem característicos, e sendo assim dispensam outros recursos para a sua visualização além do uso da microscopia de luz. Do ponto de vista laboratorial, algumas dificuldades podem ser encontradas mediante a utilização desse método, com destaque para (a) a ausência de ovos no período inicial da doença, (b) ausência de ovos após a medicação e (c) escassez ou inconstância da eliminação de ovos que pode vir a ocorrer nas infecções leves e nos casos mais antigos. Contudo, a repetição do exame de fezes é requerida nos casos (a e b) em intervalos razoáveis, e no caso (c) apenas em dias distintos, de forma freqüente ou mesmo utilizando-se de um maior volume de fezes.

2.6.3 Medidas de controle e tratamento

Barbosa e Coimbra (1992) discorrem que os programas regionais e em nível nacional têm sido postos em prática em vários países onde essa doença é endêmica. Algumas características são peculiares a estes programas, uma vez que enfatizam medidas específicas de controle e, mais recentemente, tentativas no sentido de integrar estas medidas. Todavia, estes programas procuraram incorporar obras de saneamento básico, como ações educacionais e a participação da comunidade, ou mesmo a integração com os serviços locais de saúde. Contudo, a maioria das ações de controle envolvidas nestes programas não está sendo avaliada em toda a sua extensão. Dessa forma, as principais medidas para o controle da esquistossomose consistem no diagnóstico e tratamento das pessoas infectadas, no controle do hospedeiro intermediário, no saneamento básico e no esclarecimento da

população que reside nas áreas endêmicas (World Health Organization, 2002). Os programas de controle da esquistossomose como o implantado no Brasil desde Fundação Nacional de Saúde (2002), baseiam-se na notificação obrigatória, no diagnóstico e tratamento específico das pessoas infectadas em áreas endêmicas, resultando na redução significativa da mortalidade e morbidade associada a essa infecção. Entretanto, este tipo de programa tem sido constantemente questionado, devido ao fato de não ser tão eficiente no controle da transmissão do parasito (Disch et al., 2002). A presença do hospedeiro intermediário em regiões onde existem pessoas infectadas e condições de saneamento básico precárias é um risco em potencial para a instalação de novos focos ou ampliação das áreas de transmissão (Paraense, 2001). De acordo com Souza et al. (2001), a distribuição real das espécies ainda não está bem esclarecida, sendo dificultada pela grande extensão territorial e pela escassez de recursos humanos.

Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2005), o controle da esquistossomose nas áreas endêmicas do Brasil depende de conhecimentos técnicos e científicos, que são obtidos por meio de pesquisas realizadas tanto no âmbito local quanto no global. Os órgãos de saúde encarregados de planejar e programar as estratégias de vigilância e controle em nosso país vêm, há décadas, incorporando os novos conhecimentos e adequando-os às peculiaridades de cada área.

Por outro lado, o controle dos hospedeiros intermediários consiste na pesquisa de coleções hídricas, para determinação do seu potencial de transmissão, tratamento químico de criadouros de importância epidemiológica, e de modificação permanente das condições de transmissão. As operações de malacologia são de natureza complementar e têm sua indicação nas seguintes situações: investigação e controle de focos, levantamento de áreas ainda não trabalhadas, e áreas bem delimitadas com importante prevalência. As ações de saneamento ambiental são reconhecidas como as de maior eficácia para a modificação, em caráter permanente, das condições de transmissão da esquistossomose (Fundação Nacional de Saúde, 2002). Ainda, para uma melhor adequação das medidas preventivas, esse órgão determina que sejam conhecidas as espécies, a sua densidade nos criadouros e as taxas de infecção natural.

O tratamento da esquistossomose tem como base não apenas promover a cura da doença ou diminuir a carga parasitária dos pacientes humanos, mas impedir sua evolução para formas graves. Estudos mostram que a quimioterapia pode

reduzir também a hepatoesplenomegalia, e dentre os tratamentos preconizados para a esquistossomose, está a utilização de terapêutica clínica. As drogas mais eficazes são a oxamniquine e o praziquantel (Melo e Coelho, 2005). Acredita-se, também, que mesmo nos casos de fibrose intensa do fígado, há reabsorção de fibras colágenas e, portanto, diminuição da hipertensão porta (Petroianu, 2003). Atualmente, outras drogas, vêm sendo estudadas na terapêutica contra a esquistossomose, atuando principalmente na ovipostura das fêmeas do verme (Araújo et al., 2002).

Katz (1999) ressalta que o controle da esquistossomose deve ser considerado sob dois pontos de vista: o da morbidade e o da transmissão. No que diz respeito ao controle da morbidade que visa diminuir o aparecimento de casos da forma grave, esse autor menciona que o diagnóstico e o tratamento serão suficientes. Mas o controle da transmissão é o ideal a ser buscado, pois se busca interromper o ciclo evolutivo do parasito. Portanto, apenas o tratamento das populações infectadas não seria satisfatório, e obras de saneamento seriam então necessárias, tais como a engenharia sanitária, que possibilitará o aporte hídrico adequado para as casas e a correta eliminação dos dejetos. Além disso, outra medida importante é a educação para saúde, fazendo com que as pessoas que residem em zonas endêmicas modifiquem o seu comportamento (Katz, 1980).

No combate ao *S. mansoni* as ações convergem sempre para a diminuição da carga parasitária das pessoas infectadas, impedindo com isso, a evolução para formas graves, bem como combate aos moluscos vetores. Todavia, medidas alternativas de controle do hospedeiro intermediário e das fases do ciclo biológico desse parasito que sejam eficientes e são de grande valia para o controle da esquistossomose no Brasil. Além disso, a produção de vacina contra a esquistossomose é necessária, uma vez que a quimioterapia atual oferece algumas desvantagens para o paciente, principalmente em se tratando da sua ineficácia (Coelho et al., 2004; King et al., 2005).

2.7 *Duddingtonia flagrans*

O gênero *Duddingtonia* é caracterizado por produzir vários conídios na extremidade dos conidióforos. A presença do helminto induz à produção de armadilhas. Durante o processo de envelhecimento aumenta sua produção de clamidósporos. Estes conídios apresentam formato que pode variar de elíptico a ovóide com septo mediano (Mota et al., 2003). *D. flagrans* é a espécie de fungo mais promissora empregada no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos, realiza predação de helmintos por meio de hifas adesivas simples, e produz conídios com 25-50 µm de comprimento por 10-15 µm de largura. Seus esporos podem ser de dois tipos: conídios com paredes delgadas em conidióforos eretos em número limitado, ou esporos de paredes grossas mais resistentes - clamidósporos. Faedo et al. (2000) mencionam que *D. flagrans* afeta predominantemente helmintos cujos ovos possuem estágio de desenvolvimento curto, mas podem sobreviver ocasionalmente por longos períodos afetando também nematóides cujos ovos eclodem após 12-16 semanas, pois enquanto a larva reside no ovo, esse fungo é incapaz de capturá-las.

De acordo com Sanyal et al. (2004) e Terril et al. (2004), *D. flagrans* é utilizado com sucesso no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos devido a grande produção de clamidósporos que são altamente resistentes a condições adversas, formados principalmente em condições de crescimento desfavoráveis, o que o torna um potencial controlador biológico. Segundo Faedo et al. (2002), os clamidósporos formados são capazes de germinar, colonizar o bolo fecal e proporcionar a destruição das L₃ infectantes que estão emergindo, determinando com isso uma interrupção no ciclo de vida do parasito.

Administrado como esporo (clamidósporo) a ruminantes *D. flagrans* demonstra habilidade de reduzir eficientemente (acima de 90%) o desenvolvimento larval de um grande número de helmintos nas fezes (Kahn et al., 2007). Em experimento para se determinar os efeitos do fornecimento de *D. flagrans* crescidos em grãos de cevada a ovinos, observou-se redução significativa na contagem do número de ovos por grama de fezes (Knox e Faedo, 2001).

No solo, *D. flagrans* pode ser encontrado até 30 cm da superfície. Sua localização está diretamente ligada com a infiltração de seus clamidósporos na terra pela água da chuva, e via ação de outros animais como minhocas e artrópodes (Knox et al., 2002). Nas fezes do hospedeiro e na pastagem, *D. flagrans* demonstrou ser promissor na captura e formação de armadilhas para nematóides (Peña et al.,

2002; Fontenot et al., 2003; Paraud et al., 2007). Dias et al. (2007), trabalhando com formulação peletizada desse fungo em bovinos, observaram níveis de redução do OPG ($p < 0,05$) em comparação ao grupo-controle demonstrando sua viabilidade para o controle de helmintos parasitos gastrintestinais.

2.8 *Monacrosporium sinense*

Os fungos do gênero *Monacrosporium* foram classificados por Cooke e Dickson como pertencentes à subdivisão *Deuteromycotina*. As espécies desse gênero são caracterizadas por produzirem apenas um conídio na extremidade do conidióforo. Os conídios são hialinos, fusiformes, com dois a quatro septos transversais. A predação ocorre por meio de nódulos e redes tridimensionais adesivas ou anéis constritores, suas hifas são septadas e ramificadas (Castro, 2000; Araújo e Ribeiro, 2003). Espécies do fungo predador de helmintos *Monacrosporium* spp. têm eficácia comprovada sobre fitonematóides, nematóides de vida livre e helmintos parasitas de bovinos, caprinos e eqüinos (Araújo et al., 1992; Melo et al., 2003). A atividade *in vitro* de um isolado de *M. ellypsosporum* sobre larvas de *H. placei* foi avaliada por Araújo et al. (1992), que observaram uma alta eficácia no controle das larvas infectantes. Mota et al. (2000), avaliaram a eficácia predatória *in vitro* de um isolado de *A. robusta* e um de *M. thaumasium* sobre larvas infectantes de *H. contortus* de caprinos, observando que os dois isolados foram capazes de predação as larvas, entretanto o isolado de *Monacrosporium* mostrou-se mais eficiente.

A espécie *M. sinense* preda larvas de helmintos através de redes adesivas, produzindo conídios que medem entre 25- 30 μm de comprimento por 15-18 μm de largura e clamidósporos com 20- 24 μm de comprimento por 17- 27 μm de largura (Campos et al., 2007).

Segundo Araújo et al. (2004a), *M. sinense* tem sido alvo de estudos que confirmam sua capacidade predatória sobre helmintos. Araújo et al. (2004b), observaram que o tratamento dos animais com os peletes de *M. thaumasium* diminuiu a contaminação da pastagem, reduzindo o OPG dos animais em até 100%, o que tornou os tratamentos anti-helmínticos desnecessários. Em trabalho recente Araújo et al. (2007) avaliaram a viabilidade de *M. thaumasium* através de formulação peletizada no controle de larvas infectantes de caprinos no Semi-Árido Cearense observando que animais tratados com péletes uma vez por semana apresentaram redução no OPG, além de menor carga parasitária e maior ganho de peso.

2.9 *Pochonia chlamydosporia*

O gênero *Pochonia* é um dos mais estudados no controle de helmintos potencialmente nocivos à agricultura e, atualmente, vem se destacando também no combate a seus ovos. O fungo *P. chlamydosporia*, foi encontrado no Alabama, Estados Unidos, em 1981 parasitando ovos e fêmeas de *Meloydogine* sp, sendo considerado como um dos agentes mais promissores para o manejo e controle dos problemas causado por fitonematóides. É também empregado com sucesso na redução da taxa de eclosão de ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lysek, 1976; Hidalgo et al., 2000). Essa espécie, uma das mais promissoras desse gênero, é um deuteromyceto parasito facultativo de ovos de nematóides formadores de cistos em raízes e galhas, possuindo ampla distribuição. Caracteriza-se por seu rápido crescimento, produzindo colônias com 15-40 µm de diâmetro. Seus conídios possuem formato variando de elíptico, globoso e algumas vezes bacilar, possui conidióforo pequeno e hifas diferenciadas, que em algumas situações podem ser eretas. No passado, era conhecido como *V. chlamydosporium* (Gams e Zaire, 2001).

De acordo com Mauchline et al (2003), *P. chlamydosporia* tem sido implicado como supressor de vários gêneros de helmintos. Essa espécie parasita ovos de helmintos através de estruturas conhecidas como apressórios, formados a partir de hifas indiferenciadas quando em contato com esses ovos. Além disso, Morton et al. (2003) sugerem a existência de uma protease serino-alcalina, denominada como VCP1, que parcialmente tem sido considerada como um dos elementos que caracterizam seu mecanismo de ação. Os ovos parasitados dilatam-se graças a alterações ultra-estruturais e, posteriormente ocorre um enfraquecimento da camada vitelínica por ação de enzimas, como proteases, quitinases e enzimas hidrolíticas, que removem a membrana vitelínica mais externa e degradam a quitina (Kerry, 2000). *P. chlamydosporia* tem importantes características que são requeridas para que um fungo seja um efetivo agente controle biológico, eficiência na redução das populações de helmintos, longevidade no solo e produção de clamidósporos (Terril et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a ação *in vitro* dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a ação ovicida do fungo *P. chlamydosporia*, isolados VC1 e VC4, como um fungo a ser utilizado no controle biológico de ovos de *F. hepatica* e de *S. mansoni*.
- Demonstrar em qual intervalo de tempo a ação dos isolados foi maior e quais foram os percentuais de atividade ovicida observados.

4. HIPÓTESES

- Os fungos *D. flagrans* AC001 e *M. sinense* SF53 terão ação *in vitro* sobre os ovos de *F. hepatica* e *S. mansoni*.
- Apenas o fungo *P. chlamydosporia* VC1 e VC4 demonstrará atividade ovicida sobre os ovos de *F. hepatica* e *S. mansoni*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos isolados

Quatro isolados de fungos nematófagos, sendo um de *D. flagrans* (AC 001), um de *M. sinense* (SF 53) e dois de *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4), foram mantidos em tubos de ensaio a 4° C contendo corn-meal-ágar 2% no escuro, durante 10 dias. Esses isolados estavam previamente armazenados no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Discos de cultura de 4 mm de diâmetro foram extraídos de culturas fúngicas mantidos nos tubos de ensaio contendo CMA 2% e transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 20 mL de batata-dextrose-ágar 2%, e mantidos a 25°C no escuro durante 10 dias. Após o crescimento dos isolados, novos discos de cultura de 4 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9,0cm diâmetro contendo 20 mL de ágar-água 2 % durante 10 dias.

5.2 Obtenção dos ovos de *Fasciola hepatica*

Os ovos de *F. hepatica* foram obtidos a partir da dissecação de exemplares adultos, colhidos de fígados de bovinos naturalmente contaminados destinados para o consumo humano em frigorífico localizado no município de Atilio Vivacqua no estado do Espírito Santo.

5.3 Obtenção de ovos de *Schistosoma mansoni*

Os ovos foram obtidos utilizando-se a técnica de Pellegrino (1957) com algumas modificações. Os camundongos foram infectados com 100-120 cercárias de *S. mansoni* e posteriormente foram eutanasiados, seguindo todos os procedimentos recomendados pelo Manual de Conduta no Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão, DVT/UFV. A eutanásia ocorreu entre a sétima e oitava semanas pós-infecção. Os fígados repletos de ovos do parasito foram removidos e mantidos a -20° C até o momento de serem processados. Para obtenção dos ovos de *S. mansoni*, os fígados de camundongos foram descongelados e homogeneizados em solução salina concentrada (NaCl 1,7%) e gelada, durante 5 minutos. O homogenato foi decantado por 1 h a 4°C para permitir a sedimentação dos ovos, e o sobrenadante foi retirado. O sedimento contendo os ovos foi ressuspensionado novamente em NaCl 1,7% e o procedimento foi repetido várias vezes até obter-se um sobrenadante transparente. Em seguida, o sedimento contendo os

ovos foi ressuspensão em NaCl 1,7% a frio sendo posteriormente filtrada em uma tela de Kato (porosidade de 0,09 mm). A suspensão de ovos recolhida após a filtração foi centrifugada (80g/10 minutos a 4° C), e o sobrenadante juntamente com a camada superior do pelete que contém a maior parte da contaminação tecidual foi retirada com auxílio de uma pipeta de Pasteur. O sedimento escuro contendo os ovos do parasito foi novamente ressuspensão em NaCl 1,7% a frio e o procedimento repetido até obtenção de um pelete de ovos puro, que foi armazenada a -20° C.

5.4 Ensaios Experimentais

O presente trabalho constituiu-se de dois ensaios experimentais *in vitro*, realizados em etapas distintas, e denominados de A e B. No ensaio A, avaliou-se a ação dos isolados fúngicos *D. flagrans*, *M. sinense* e *P. chlamydosporia* sobre ovos de *F. hepatica* nos períodos de sete, 14 e 21 dias, e no ensaio B, testou-se a ação *D. flagrans*, *M. sinense* e *P. chlamydosporia* sobre ovos de *S. mansoni* nos mesmos períodos de interação.

5.4.1 Ensaio experimental A

Ovos de *F. hepatica* foram analisados morfológicamente quanto a sua integridade por meio de microscopia de luz em objetiva de 10x e foram vertidos sobre a superfície das placas de Petri contendo apenas o meio AA2% com isolados fúngicos crescidos por 10 dias e sem fungo (controle), sendo feitas vinte e cinco repetições para cada grupo. Nos tratamentos, cada placa de Petri continha mil ovos de *F. hepatica* com apenas um dos isolados fúngicos e mil ovos sem fungo (controle). Nos períodos de sete, 14 e 21 dias, cerca de cem ovos foram retirados de cada placa contendo o isolado e do controle segundo a técnica descrita por Araújo et al. (1995) e, colocados em lâminas de vidro com uma gota de azul de Amam 1%. Após isso, os ovos foram avaliados por meio de microscopia de luz em objetiva de 40x de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek et al. (1982): tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca; e tipo 3 efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo.

5.4.2 Ensaio experimental B

Ovos de *S. mansoni* foram analisados morfológicamente por meio de microscopia de luz em objetiva de 10x. Na seqüência foram vertidos sobre a superfície das placas de Petri contendo apenas o meio AA2% com isolados fúngicos crescidos por 10 dias e sem fungo (controle), sendo feitas vinte e cinco repetições para cada grupo. Nos tratamentos cada placa de Petri continha mil ovos de *S. mansoni* com apenas um dos isolados fúngicos e mil ovos sem os isolados fúngicos (controle). Nos períodos de sete, 14 e 21 dias, cerca de cem ovos foram retirados de cada placa contendo o isolado e do controle sem fungos segundo a técnica de Araújo et al. (1995) e, colocados em lâminas de vidro com uma gota de azul de Amam 1%. Após isso, foram avaliados por meio de microscopia de luz em objetiva de 40x e por microscopia eletrônica de varredura de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek et al. (1982): efeito do tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. Discos de cultura dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) foram transferidos para placas de Petri descartáveis de 60 mm x 10 mm cuja superfície do meio foi coberta com uma membrana de diálise. A membrana de diálise foi cortada em discos de 6 cm de diâmetro os quais foram colocados em frascos Erlenmeyer contendo água destilada. O material foi autoclavado a 121°C por 15 min. Posteriormente, foram retirados dos Erlenmeyers com auxílio de uma pinça e colocados sobre a superfície de AA 2% de forma que as margens da membrana cobrissem toda a superfície do agar e as bordas ficassem aderidas à margem das placas. Feito isto, as placas foram incubadas, no escuro, à temperatura de 25°C, por sete dias (Nordbring-Hertz, 1978). Após o crescimento micelial em toda a superfície do meio os discos de cultura repicados foram retirados e em seguida, aproximadamente 1.000 ovos de *S. mansoni* foram vertidos sobre as membranas nas placas. Placas contendo AA 2% sem fungo, em que foram adicionados os mesmos números de ovos, foram utilizadas como controle.

Após os períodos de sete, 14 e 21 dias de observação, retalhos de membrana de diálise com amostras de ovos, foram cortados com uma lâmina de bisturi, coletados com pinça de ponta fina e fixados em glutaraldeído a 2,5% em 0,05

M de tampão fosfato, pH 7,4 por 24h, lavadas seis vezes no mesmo tampão, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 2% e desidratadas através da passagem do material em série de álcool etílico (30, 50, 60, 70, 95 e 100%). O material foi seco em secador de ponto crítico BALZERS utilizando dióxido de carbono, recoberto com ouro em metalizador e elétron-micrografados em microscópio eletrônico de varredura LEO a 10-15 kV (Guimarães e Caldeira, 1997), no Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálises, localizado na Universidade Federal de Viçosa.

5.5 Análise estatística

Os dados dos ensaios experimentais A e B ao longo dos intervalos foram submetidos ao teste não paramétrico de *Friedman* com 1% de probabilidade (Ayres et al., 2003). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software Bioestat 2.0.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O controle biológico mediante utilização de fungos nematófagos tem potencial para se tornar uma importante estratégia de controle dos helmintos parasitos gastrintestinais em animais domésticos. Fungos nematófagos predadores possuem capacidade predatória sobre L₃ de helmintos parasitos gastrintestinais em animais domésticos, com destaque para os gêneros *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (Araújo et al., 2004a). Fungos nematófagos ovicidas também possuem potencial para o biocontrole de helmintos parasitos gastrintestinais e, dentro desse grupo, destaca-se o gênero *Pochonia* (Lysek et al., 1982; Mizobutsi et al., 2000).

Embora vários trabalhos demonstrem a ação de fungos predadores e ovicidas no biocontrole das helmintoses gastrintestinais, não existe nenhum trabalho demonstrando sua ação sobre ovos de trematodas (Braga et al., 2007).

Nesse trabalho foi comprovada a ação de isolados ovicidas sobre ovos *F. hepatica* e *S. mansoni*, verificando-se também que os isolados predadores foram capazes de interagir com os ovos desses trematodas durante os ensaios experimentais A e B.

6.1 Ensaio experimental A

Nas figuras 1, 2 e 3 e nas tabelas 1, 2 e 3 estão apresentados os resultados percentuais da ação dos diversos fungos sobre ovos de *Fasciola hepatica* aos sete, 14 e 21 dias de interação.

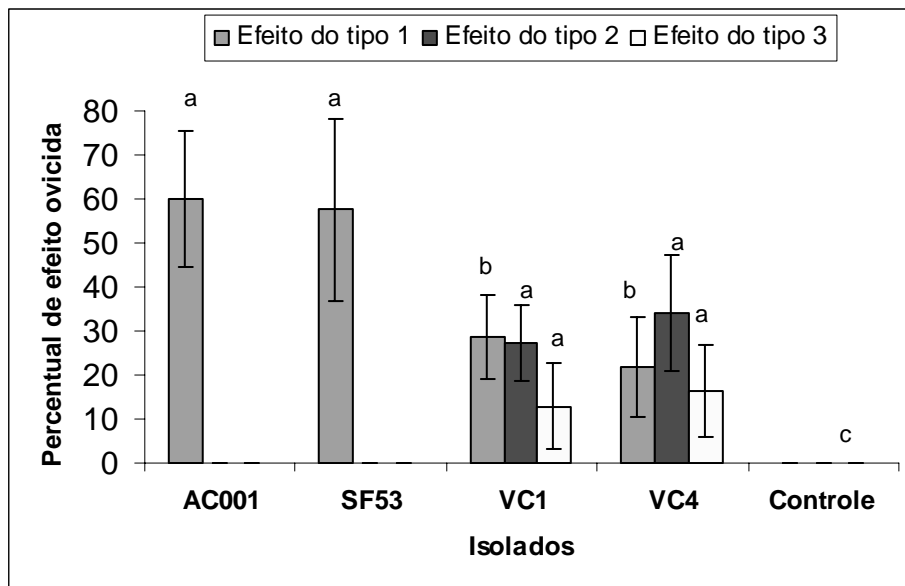


Figura 1 – Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Fasciola hepatica* e o grupo-controle sem fungos, aos sete dias de interação. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p > 0,01$) - Teste de Friedman.

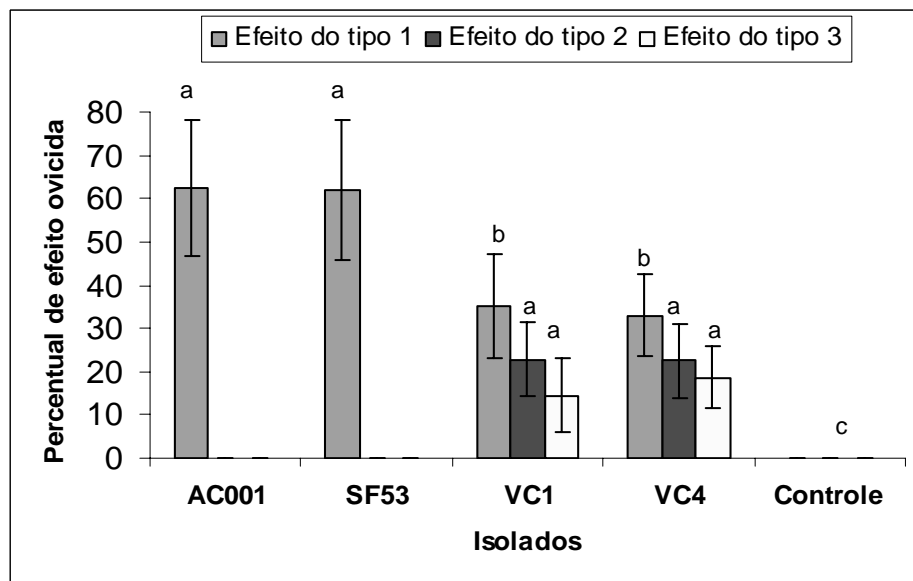


Figura 2 – Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Fasciola hepatica* e o grupo-controle sem fungos, aos 14 dias de interação. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p > 0,01$) - Teste de Friedman.

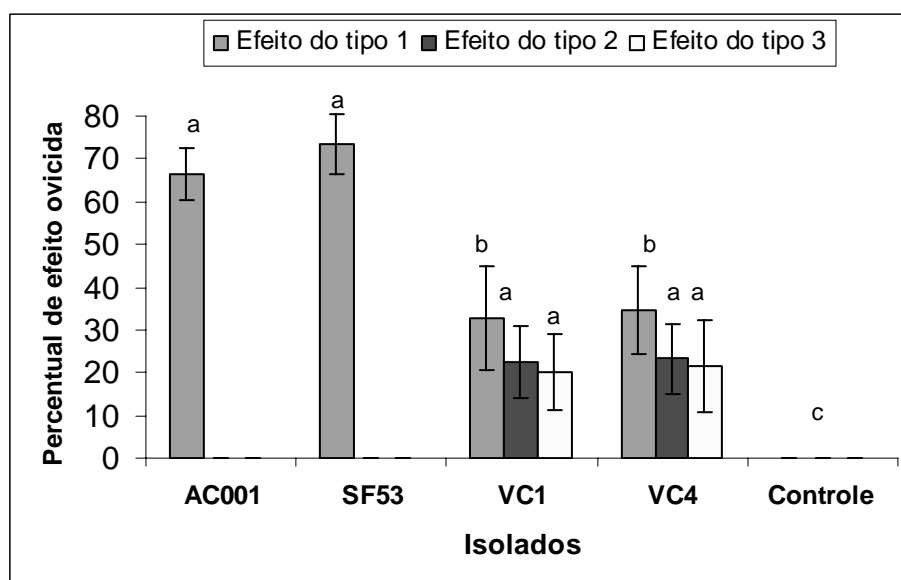


Figura 3 – Percentuais da atividade ovicida e desvio padrão (barra) dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Fasciola hepatica* e o grupo-controle sem fungos, aos 21 dias de interação. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p > 0,01$) - Teste de Friedman.

O isolado AC001 do fungo *D. flagrans* apresentou resultados percentuais para o efeito do tipo 1, com valores de 60,1%; 62,3% e 66,5% sobre os ovos de *F. hepatica* aos sete, 14 e 21 dias de experimento, respectivamente. Efeitos dos tipos 2 e 3, para esse isolado não foram observados nos períodos estudados. Foram observados também conídios de AC001 aderidos à casca do ovo de *F. hepatica* somente aos 14 dias de interação (Figura 7).

Para o isolado SF53 do fungo *M. sinense*, os resultados percentuais encontrados foram semelhantes aos resultados de AC001 aos sete, 14 e 21 dias. O isolado SF53 demonstrou apenas o efeito do tipo 1 a partir do sétimo dia de observação, com valores de 57,5%; 62,0% e 73,5% respectivamente aos sete, 14 e 21 dias.

Comparando-se a ação de AC001 e SF53 sobre os ovos de *F. hepatica*, observou-se que não houve diferença entre os percentuais obtidos para o efeito do tipo 1, demonstrando que ambos isolados tiveram a mesma ação sobre os ovos nos mesmos intervalos.

Os resultados percentuais obtidos no ensaio experimental A para os efeitos dos tipos 1 e 2 de AC001 e SF53 sobre os ovos de *F. hepatica* podem ser comparados com três outros trabalhos. Araújo et al. (1995) utilizando os isolados predadores I-31 e I-40 sobre ovos de *Toxocara canis* ao longo de um intervalo de

sete dias registraram valores percentuais semelhantes aos apresentados pelos isolados predadores utilizados. Do mesmo modo Braga et al. (2007), utilizando os isolados AC001 e NF34a sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* ao longo de sete, 10 e 14 dias registraram resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1 e 2 semelhantes aos demonstrados por AC001 e SF53 durante o ensaio experimental A. Com o trabalho de Araújo et al. (2008) foi demonstrado que os isolados AC001 e SF53 conseguem interagir com os ovos, embora não apresentem os efeitos dos tipos 2 e 3. Essas comparações demonstram que isolados predadores podem interagir com ovos de diferentes gêneros de helmintos. A análise de todos os trabalhos indicam que esses fungos não possuem atividade ovicida, considerada por Lysek et al. (1982) como sendo o efeito do tipo 3. Esse fato pode ter sido ocasionado pela distinta composição da casca dos diferentes tipos de ovos.

Os gêneros *Duddingtonia* e *Monacrosporium* são reconhecidos apenas como predadores, e têm nas espécies *D. flagrans* e *M. sinense* sua capacidade predatória já bastante discutida e comprovada no controle de larvas infectantes de helmintos gastrintestinais (Araújo et al., 2007; Dias et al., 2007). Todavia, a capacidade predatória dessas espécies nunca tinha sido testada sobre ovos de *F. hepatica*, e no presente trabalho sua ação foi avaliada utilizando-se a metodologia sugerida por Lysek et al. (1982) para a classificação de fungos ovicidas. Nos três períodos estudados (sete, 14 e 21 dias) foi observado apenas efeito do tipo 1 para as duas espécies, que é um efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde as hifas são observadas apenas aderidas a casca do ovo, sem qualquer prejuízo a este ou ao embrião, não sendo então sugerida atividade ovicida.

Já os isolados VC1 e VC4 do fungo *P. chlamydo sporia* apresentaram resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 nos três intervalos estudados. Segundo Lysek et al. (1978, 1982), um fungo é caracterizado como ovicida se durante o processo de infecção dos ovos apresentar o efeito tipo 3. No presente experimento, o isolado VC1 demonstrou esse tipo de efeito no sétimo dia de observação, com resultados percentuais de 12,8%; 14,4% e 20,2% aos sete, 14 e 21 dias, respectivamente. Da mesma maneira, o isolado VC4 apresentou resultados percentuais para o efeito do tipo 3 de 16,5%; 18,7% e 21,5% para os mesmos intervalos estudados.

No ensaio experimental A, o isolado VC1 do fungo *P. chlamydo sporia* apresentou também resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1 e 2.

Demonstrando resultados percentuais para o efeito do tipo 1 com os seguintes valores: 28,6%; 35,3% e 32,7% aos sete, 14 e 21 dias respectivamente. Para o efeito do tipo 2, VC1 apresentou: 27,1%; 22,8% e 22,5%. Já o isolado VC4 demonstrou como resultados percentuais para o efeito do tipo 1 de 21,7%, 33,0% e 34,6%, e para o efeito do tipo 2: 34,2%, 22,5% e 23,2% aos sete, 14 e 21 dias, respectivamente.

Não foi observada diferença ($p>0,01$) entre a ação de VC1 e VC4 para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 durante o ensaio experimental A, não havendo dessa forma distinção no modo de interação desses isolados com os ovos de *F. hepatica*. Essa informação é importante do ponto de vista de se testar apenas um dos isolados de *P. chlamydosporia* já que ambos se comportaram da mesma maneira sobre ovos de *F. hepatica* ao longo do ensaio experimental A.

Segundo Burger e Stoye (1978), os ovos de *F. hepatica* apesar de serem encontrados em menor frequência nas fezes de ruminantes, apresentam grande capacidade de resistência e evolução, mesmo em condições desfavoráveis. Mentz et al. (2004) demonstraram que ovos de *F. hepatica* podem ser viáveis por um período de até 42 dias. No ensaio experimental A, demonstrou-se que a ação dos isolados VC1 e VC4 do fungo *P. chlamydosporia* se manteve ao longo de 21 dias, sendo responsável pela destruição dos ovos e influência negativa sobre sua viabilidade. Freitas (1982) relata que apenas os ovos que são arrastados para a água encontram condição para o desenvolvimento embrionário. Dessa forma, por meio dos resultados percentuais obtidos no ensaio experimental A, sugere-se a empregabilidade de *P. chlamydosporia* como uma alternativa de controle biológico dos ovos presentes nas fezes, partindo-se do princípio que sua ação será no ambiente fecal, onde estará parte destes ovos.

Com a utilização de microscopia de luz, foram observadas hifas dos isolados VC1 e VC4 colonizando a superfície e o interior dos ovos aos sete dias de interação (Figuras 8-13), demonstrando precocidade na ação desses isolados sobre os ovos. De acordo com Araújo et al. (2004a), as armadilhas dos fungos nematófagos predadores são formadas na presença dos helmintos parasitos gastrintestinais em um período de até 24 horas. Contudo, nenhuma informação deste tipo é sugerida na literatura para fungos parasitos de ovos. As figuras 14 e 15 demonstram a penetração das hifas de *P. chlamydosporia* nos ovos de *F. hepatica* iniciando o seu processo de expansão que, de acordo com Lysek et al. (1982), se deve à ação mecânica que esse fungo produz sobre os ovos parasitados. Nas figuras 16 e 17

observam-se ovos de *F. hepatica* sem fungo (controle) demonstrando a integridade desses ovos aos 21 dias. Nas figuras 18, 19 e 20, é demonstrada a destruição dos ovos de *F. hepatica* aos 21 dias de interação com *P. chlamydosporia*, conferindo efeito do tipo 3 (rompimento e lise dos ovos).

Braga et al. (2007) comprovaram que a ação de *P. chlamydosporia* sobre ovos de *A. lumbricoides* foi maior quando comparada a *D. flagrans* (AC001) e *M. thaumasium* (NF34) nos períodos de sete, 10 e 14 dias de interação, observando que VC1 e VC4 apresentaram resultados percentuais para o efeito do tipo 3 de 20% e 18%; 25% e 22%; 30% e 26% respectivamente, enquanto AC001 e SF53 não apresentaram esse tipo de efeito. Da mesma forma, Araújo et al. (2008) comprovaram que os isolados VC1 e VC4 também demonstraram maior percentual de efeito do tipo 3 sobre ovos de *A. suum* que foram de 13,3% e 17,3%; 13,9% e 17,9%; 19,0% e 20,0% respectivamente, em comparação com AC001 e SF53 nos mesmos intervalos estudados e que apresentaram esse tipo de efeito. No presente trabalho os resultados percentuais para o efeito do tipo 3 dos isolados VC1 e VC4 foram maiores sobre os ovos de *F. hepatica* em relação ao efeito dos mesmos sobre os ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum*. Esses resultados sugerem existir alguma diferença no processo de interação entre o fungo *P. chlamydosporia* e os diferentes tipos de ovos. Segundo Silva e Massara (2005) e Bowman et al. (2006) os ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum* possuem cápsula espessa constituída de quitina e proteína, fato que não ocorre nos ovos de *F. hepatica*. Essa informação demonstra que *P. chlamydosporia* possui ação enzimática e mecânica durante o processo de interação sobre ovos, e ovos desprovidos de cápsula espessa sofreriam maiores prejuízos quando em contato com o fungo.

6.2 Ensaio experimental B

Nas figuras 4, 5 e 6 estão apresentados os resultados percentuais dos diversos fungos sobre os ovos de *Shistosoma mansoni* aos sete, 14 e 21 dias de interação.

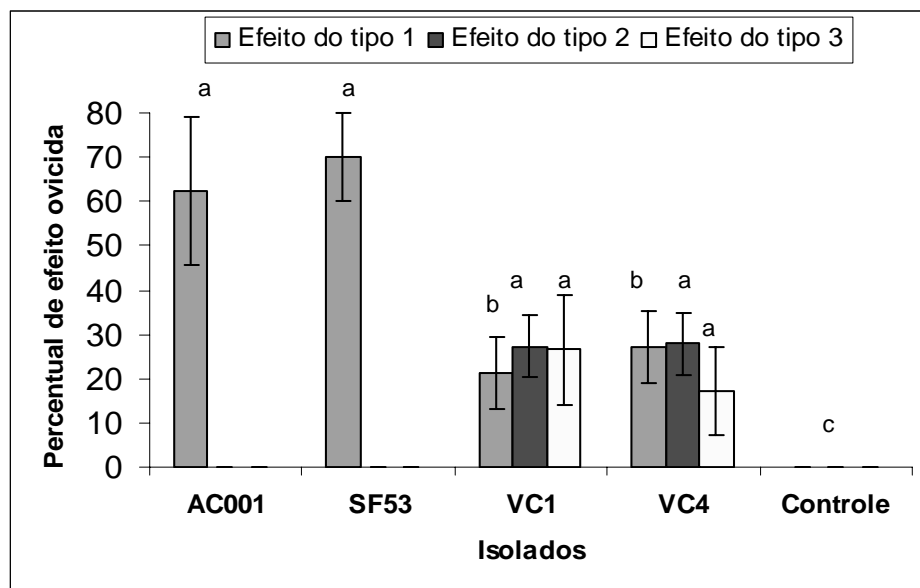


Figura 4 – Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Schistosoma mansoni* e o grupo-controle sem fungos, aos sete dias de interação. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p > 0,01$) - Teste de Friedman.

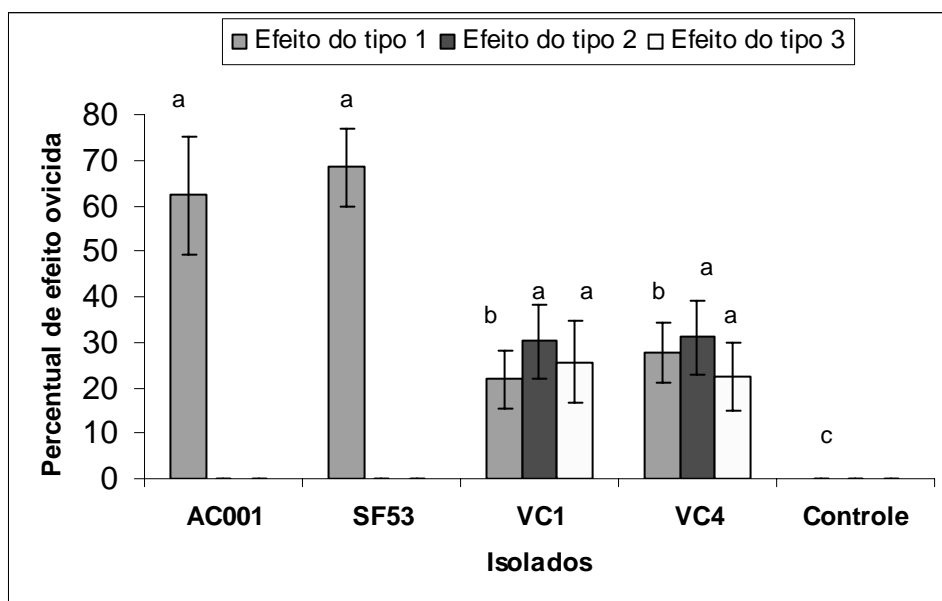


Figura 5 – Percentuais da atividade ovicida e desvios-padrão (barra) dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Schistosoma mansoni* e o grupo-controle sem fungos, aos 14 dias de interação. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p > 0,01$) - Teste de Friedman.

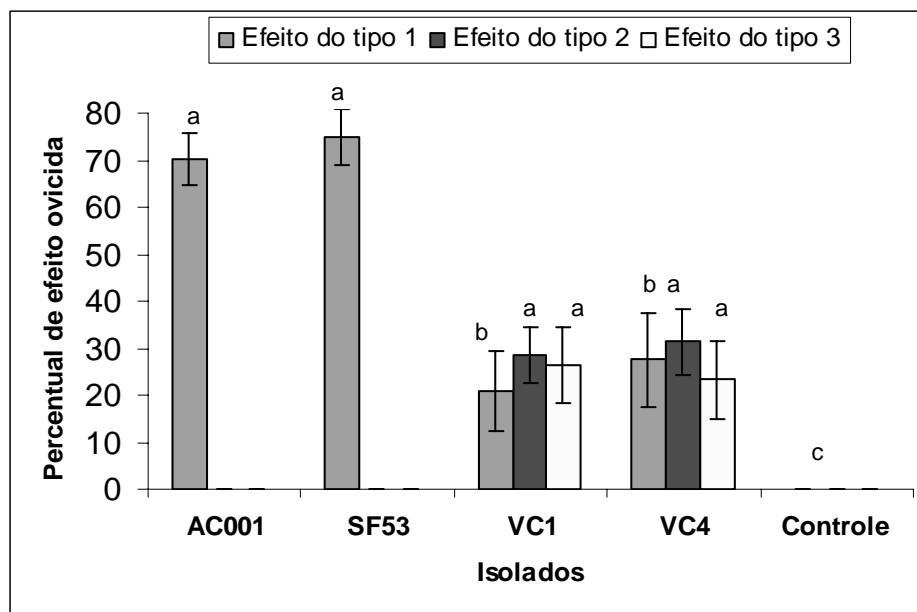


Figura 6 – Percentuais da atividade ovicida e desvio-padrão (barra) dos fungos nematófagos, *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Schistosoma mansoni* e o grupo-controle sem fungos, aos 21 dias de interação. Valores seguidos de letras iguais minúsculas não diferem ($p > 0,01$) - Teste de Friedman.

O isolado AC001 do fungo *D. flagrans* apresentou resultados percentuais de 62,4%; 62,2% e 70,2% para o efeito do tipo 1 sobre os ovos de *S. mansoni* aos sete, 14 e 21 dias, respectivamente.

Para os efeitos dos tipos 2 e 3, o isolado AC001 não apresentou nenhum resultado, demonstrando que não houve prejuízo aos ovos. Dessa forma, não pôde ser classificado como um fungo ovicida (Lysek et al., 1982).

Como no ensaio experimental A, o isolado AC001 apresentou pelo menos um tipo de efeito, o tipo 1, sobre os ovos de *S. mansoni* e, embora não tenham sido demonstrados resultados percentuais para os efeitos dos tipos 2 e 3 aos sete, 14 e 21 dias, não se pode descartar possíveis danos que possam ter ocorrido a esses ovos. De acordo Morgan-Jones et al. (1983), o ideal seria realizar a administração desses ovos aos animais após esse prévio contato de 21 dias a fim de se comprovar se houve ou não inviabilidade dos ovos e do futuro embrião.

Para o isolado SF53 do fungo *M. sinense*, os resultados percentuais encontrados foram bem semelhantes aos apresentados pelo isolado AC001, isto é, se observou o efeito do tipo 1, já partir do sétimo dia com os seguintes resultados percentuais: 70,2%; 68,4% e 74,8%. Isso demonstra também que também *M.*

sinense não é um fungo ovicida, pois de acordo com Lysek et al. (1982) esse fungo não demonstrou o efeito do tipo 3.

Comparando-se a ação de AC001 com SF53 sobre os ovos de *S. mansoni*, observou-se que não houve diferença ($p > 0,01$) para o efeito tipo 1, demonstrando que ambos tiveram a mesma ação.

Os resultados percentuais dos isolados AC001 e SF53 ao longo do ensaio experimental B também podem ser comparados com os trabalhos de Araújo et al. (1995) e Braga et al. (2007). Esses autores demonstraram resultados percentuais de efeito do tipo 1 bem parecidos sobre os ovos de *T. canis* e *A. lumbricoides* com os apresentados, trabalhando com os isolados predadores AC001, I-31 e NF34a.

A capacidade predatória de *D. flagrans* (AC001) e *M. sinense* (SF53) já está bastante discutida e comprovada sobre L₃ de helmintos parasitos gastrintestinais de animais domésticos (Terril et al., 2004; Araújo et al., 2007). Todavia, sua capacidade ovicida nunca foi testada sobre ovos de *S. mansoni*. Sobre ovos de *A. suum*, esses isolados demonstraram apenas efeito do tipo 1 aos sete, 14 e 21 dias. Nos três intervalos estudados (sete, 14 e 21 dias) foi observado apenas o efeito do tipo 1, com efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde as hifas são observadas apenas aderidas e, por isso, não provocam necessariamente a destruição dos ovos.

Araújo et al. (1995) discorrem, ainda, que para uma resposta mais efetiva dos fungos predadores *A. robusta* e *A. conoides* sobre ovos de helmintos parasitos gastrintestinais de animais domésticos, talvez o tempo de contato entre fungos e ovos deveria ser maior, já que durante o seu trabalho esses autores utilizaram um intervalo de sete dias e, ao longo desse tempo, os autores observaram resultados apenas para o efeito do tipo 1 sobre os ovos de *T. canis*.

Durante o ensaio experimental B, o isolado VC1 do fungo *P. chlamydosporia* apresentou resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 aos sete, 14 e 21 de interação respectivamente. A condição ovicida de um fungo é a apresentação do efeito tipo 3 sobre os ovos parasitados e, durante o ensaio B, o isolado VC1 apresentou percentuais para o efeito do tipo 3 no sétimo dia de interação, com valores de 26,6%; 25,6% e 26,3% aos sete, 14 e 21 dias, respectivamente. Para o efeito do tipo 1, VC1 apresentou 21,2%; 21,8% e 20,8% e para o efeito do tipo 2 os valores foram de 27,2%; 30,2% e 28,6% respectivamente.

O isolado VC4 também apresentou resultados percentuais para o efeito do tipo 3, com os seguintes valores: 17,2%; 22,6% e 23,0%. Para o efeito do tipo 1: 27,0; 27,6% e 27,6% e para o efeito do tipo 2 os seguintes resultados: 27,8%; 31,0% e 31,4% aos sete, 14 e 21 dias respectivamente.

Não foi observada diferença ($p > 0,01$) na ação entre VC1 e VC4 para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 aos sete, 14 e 21 dias do ensaio experimental B, demonstrando que não houve diferença no modo de interação desses isolados sobre os ovos de *S. mansoni*. Essa informação é importante do ponto de vista de se trabalhar com apenas um desses isolados de *P. chlamydosporia* já que ambos se comportaram da mesma maneira sobre ovos de *S. mansoni*.

De acordo com Melo e Coelho (2005) e Freitas (1982), os ovos de *S. mansoni* são postos um de cada vez pela fêmea e ainda não estão embrionados, necessitando de seis dias na intimidade dos tecidos do hospedeiro para completar o desenvolvimento do embrião em seu interior. Ainda, de acordo com Freitas (1982), Faust e Hofmann mencionam que, um único miracídio pode originar até 300.000 cercárias que emergem diariamente dos moluscos, durante semanas ou meses. Os ovos saem nas fezes já embrionados e, para Freitas (1982), sua sobrevivência no ambiente fecal é de no máximo de 16 dias, e sua média de sobrevivência em matéria fecal sólida está em torno de 4 a 5 dias. No ensaio experimental B, ao longo de 21 dias, *P. chlamydosporia* manteve sua ação sobre ovos de *S. mansoni* causando sua destruição. Sugere-se, então, a possibilidade do emprego de *P. chlamydosporia* como uma alternativa de controle biológico sobre ovos viáveis no ambiente fecal, evitando com isso sua eclosão, e conseqüentemente o desenvolvimento de novas cercárias.

Com auxílio de microscopia de luz, foram observadas hifas dos isolados VC1 e VC4 colonizando a superfície e o interior dos ovos aos sete dias de interação (Figuras 21- 24) demonstrando interação em curto intervalo de tempo. As figuras 25 e 26 demonstram a penetração das hifas de *P. chlamydosporia* nos ovos de *S. mansoni*, iniciando o processo expansão no 14^o dia de interação. Nesse contexto, de acordo com Gams e Zaire (2001), estão envolvidas as ações mecânica e enzimática desse fungo. Nas figuras 27 a 29 é demonstrado o rompimento dos ovos de *S. mansoni* aos 21 dias de interação, o que de acordo com Lysek et al. (1982), caracteriza o efeito do tipo 3. Os ovos de *S. mansoni* sem fungo (controle) no 21^o dia são apresentados na figura 30.

O primeiro modo de atividade mecânica mencionado de um fungo ovicida é o apressório, estrutura que penetra o ovo (Lysek, 1978). Segundo Stirling e West (1991), o efeito direto do parasitismo desse fungo sobre o desenvolvimento do embrião é através da sua ação enzimática sobre a casca do ovo, o que aumenta a permeabilidade e facilita a passagem de toxinas. Para que um fungo seja considerado como um agente de biocontrole, esse deve ser resistente à passagem pelo trato gastrintestinal de animais domésticos, assim como a espécie *D. flagrans* que produz clamidósporos. Durante o ensaio experimental B, com a realização da técnica de microscopia eletrônica de varredura foi visualizado o apressório do fungo *P. chlamydosporia* (Figura 31), e os clamidósporos de *P. chlamydosporia* (Figura 32).

No presente ensaio, os resultados percentuais do efeito do tipo 3 para os isolados VC1 e VC4 sobre os ovos de *S. mansoni* também foram semelhantes aos encontrados por Braga et al. (2007) e Araújo et al. (2008) sobre ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum*. No 21º dia de observação, o percentual médio de ovos destruídos correspondeu a 24,6% e 19,5% respectivamente, equiparando-se com os resultados do trabalho citado.

Seguindo a metodologia sugerida por Araújo et al. (1995), os ensaios experimentais A e B foram propostos com maior intervalo de tempo para permitir o contato entre os fungos e os ovos de *F. hepatica* e *S. mansoni*, a fim de se observar um possível efeito do tipo 3 dos isolados predadores sobre os ovos.

Contudo, no 21º dia apenas hifas e conídios dos isolados AC001 e SF53 foram visualizados colonizando a superfície dos ovos, caracterizando assim o efeito do tipo 1, sem nenhuma visualização de hifas em seu interior. Para os isolados VC1 e VC4, tanto hifas aderidas à superfície quanto no interior dos ovos foram observadas e, posteriormente, observou-se rompimento dos ovos. Dessa forma, ficou caracterizado o efeito do tipo 3 (Lysek et al., 1982).

A análise estatística revelou diferença ($p < 0,01$) entre a ação dos isolados AC001 e SF53 em relação a VC1 e VC4 aos sete, 14 e 21 dias de interação, demonstrando que a ação desses isolados é promissora.

A ação de *P. chlamydosporia* durante os ensaios experimentais A e B. Pôde ser comparada ao trabalho de Mizobutsi et al. (2000), que avaliaram a ação de sessenta e quatro isolados fúngicos, dentre os quais o fungo *P. chlamydosporia* atuando sobre ovos de *M. javanica*, comprovando que a atividade ovicida desse

fungo em relação aos demais fungos utilizados foi superior, o mesmo fato ocorrendo nos ensaios experimentais A e B do presente estudo.

7. CONCLUSÕES

1- *Duddingtonia flagrans* (AC001) e *Monacrosporium sinense* (SF53) não são fungos promissores a serem utilizados no controle biológico de ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni*.

2- A atividade ovicida de *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre os ovos de *F. hepatica* e *S. mansoni in vitro* foi comprovada por meio da apresentação do efeito do tipo 3, e quando confrontado com os demais fungos demonstrou ser capaz de manter todos os tipos de efeitos ao longo dos intervalos de sete, 14 e 21 dias.

3- A ação dos isolados VC1 e VC4 do fungo *Pochonia chlamydosporia*, sobre ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni* aconteceu no sétimo dia de interação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, V.S.B.; AZEVEDO, J.L. Isolamento e seleção de fungos predadores de nematóides. **Revista Agrícola**, v.56, n.1, p.135-146, 1981.

ALMEIDA, M.A.O.; AYRES, M.C.C. Considerações gerais sobre os anti-helmínticos. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERANADI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2^a. Ed., Guanabara Koogan, 1999. p. 437-443.

ANUALPEC: Anuário estatístico da produção animal. São Paulo: **FNP Consultoria e Comércio**. 2003. 380p

ASSIS, R.C.L.; ARAÚJO, J.V. Avaliação da viabilidade de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* em predação de ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrointestinal de eqüinos em formulação de alginato de sódio. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.3, p.109-113, 2003.

AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. Belém: **Sociedade civil mamirauá: Brasília CNPq**. 2003. 290p.

ARAÚJO, J.V. **Interação entre larvas infectantes de *Cooperia punctata* e fungos predadores do gênero *Arthrobotrys*, caracterização de isolados de *Arthrobotrys* e seu uso no controle biológico de nematódeos parasitos gastrintestinais de bovinos**. Belo Horizonte: UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, 1996. 110p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

ARAÚJO, J.V. Inibição de captura de larvas infectantes de *Cooperia punctata* por fungos do gênero *Arthrobotrys*, utilizando carboidratos e lectinas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.10, n.1, p. 7-11, 2001.

ARAÚJO, J.V. **Diagnóstico das helmintoses**. Universidade Federal de Viçosa, 2006a, p.9-46 (Caderno Didático, 113).

ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitol Research**, v.102, p. 787-790, 2008.

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.

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.; RODRIGUES, M.L.A.; SILVA, W.W.; VIEIRA, L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1177-1181, 2007.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAGALHÃES, A.C.M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.44 n.6, p.521-526, 1992.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. **The Journal of the Helminthology**, v.67, n.2, p.136-138, 1993.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Biological control *in vitro* of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.46, n.3, p.194-204, 1994.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.1, p.32-42, 1995.

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

ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.R. Atividade predatória sobre larvas de trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.2, p.76-81, 2003.

ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, W.M. Effects of temperature, mineral salt and passage through gastrointestinal tract of calves on alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*-a nematode – trapping fungus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.9, n.1, p.55-60, 2000.

ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.2, p. 65-71, 2004b.

ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.2, p.76-79, 2006b.

ARAÚJO, N.; KOHN, A.; OLIVEIRA, A.A.; KATZ, N. *Schistosoma mansoni*: the action of lovastatin on the murine model. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.1, p. 35-38, 2002.

- BARBOSA, F.S.; COIMBRA, J.R.C.E. A. Alternative approaches in schistosomiasis control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.86, supl. 4, p.215-220, 1992.
- BARBOSA, C.S.; SOLVA, C.B.; BARBOSA, F.S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 6, n.2, p. 609-619, 1996.
- BARGER, I.A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. **International Journal for Parasitology**, v.29, p.41-47, 1999.
- BARRETO, M.L.; CARMO, E.H. Esquistossomose mansônica no Estado da Bahia, Brasil: tendências históricas e medidas de controle. **Cadernos de Saúde Pública** v.10, n.1, p. 425-439, 1994.
- BARRON, G.L. (Ed.) **The nematode-destroying fungi**. Canadá: Canadian Biological Publications, 1977. p.140.
- BASUALDO, J.A.; CIARMELA, M.L.; SARMIENTO, P.L.; MINVIELLE, M.C. Biological activity of *Paecilomyces lilacinus* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v.86, n.1, p.854-859, 2000.
- BENDEZÚ, P.; FRAME, A.; HILLYER, C. Human fascioliasis in corozal, Puerto Rico. **Journal of Parasitology**, v. 68, p. 297-299, 1982.
- BITTENCOURT, V.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopla* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p. 351-354, 1999.
- BOWMAN, D.D.; LYNN, R.C.; EBERHARD, M.L.; ALACARAZ. Helmitos. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8ª Ed., Manole, Rio de Janeiro, 2006. p.115-130.
- BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O.; MACIEL, A.S.; 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**, v. 40, n.3, p.356-358, 2007.
- BURGER, H.J.; STOYE, M. Parasitological problems associated with recycling of animal excretions. In: Kelly, W.R. Animal and human hazards associated with the utilization of animal effluents. **Office for the Official Publications of the European Communities**, Luxembourg, 1978. p.24-84.
- CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; GRANDA, J.R.; GUIMARÃES, M.P. Viabilidade de formulação peletizada do fungo nematófago *Monacrosporium sinense*, no controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de bezerros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.1, p.14-20, 2007.
- CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A.; ARAÚJO, J.V.; CECON, P.R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação e fungos predadores de nematóides

- Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. **Ciência Rural**, v.24, n.2, p. 465-469, 2004.
- CARNEIRO, R.M.G.D. Efeitos do filtrado de cultura de *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson, 1974 na eclosão de larvas de *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889), Chitwood, 1949. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, n.0, p.151, 1987.
- CARNEIRO, R.M.G.G.; GOMES, C.B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.7, n.1, p.66-75, 1993.
- CARRADA-BRAVO, T. Fascioliasis: diagnosis, epidemiology and treatment. **Revista de Gastroenterologia do México**, v.68, n.2, p.135-142, 2003.
- CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988. p.237-237.
- CASTRO, A.A. **Avaliação de fungos Deuteromycetos sobre larvas as fases pré-parasíticas de Cyathostominae (Nematode – Strongyloidea)**. Seropédica: UFRRJ, 2000. 115p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.
- CASTRO, A.A.; OLIVEIRA, C.R.C.; ANJOS, D.H.S.; ORNELLAS, E.I.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, I.B. M.; RODRIGUES, M. L.A. 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**, v.12, n.2, p. 53-57, 2003.
- CIARMELA, M.L.; BASUALDO, F.; BASUALDO, J.A. Biological control of *Paecilomyces lilacinus* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v.86, n.1, p.854-859, 2000.
- CIARMELA, M.L.; LORI, M.G.; BASULADO, J.A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.251-257, 2002.
- COELHO, P.M.; CARVALHO, O.S.; ANDRADE, Z.A.; MARTINS-SOUSA R.L.; ROSA, F.M.; BARBOSA, L.; PEREIRA, C.A.; CALDEIRA, R.L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; GODARD, A.L.; MOREIRA, L.A.; OLIVEIRA, G.C.; FRANCO, G.R.; TELES H.M.; NEGRAO-CORREA, D. *Biomphalaria tenagophila/Schistosoma mansoni* interaction: premises for a new approach to biological control of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, supl. 5, p.109-111, 2004.
- CORAL, R.P.; MASTALIR, E.T.; PINTO, MASTALIR, F. *Fasciola hepatica* removal from common duct through choledocoscopy. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v.34, n.1, p.69-71, 2007.
- DACKMAN, C.; NORDBRING-HERSTZ, B. Conidial traps-a new survival structure of nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. **Mycology Research**, v.96, n.1, p.194-198, 1992.

DACKMAN, C.; CHET, I.; NORDBRING-HERTZ, B. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii* infection and enzymatic activity. **FEMS Microbiology Ecology**, v.62, n.1, p.151-156, 1989.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; BRAGA, F.R.; FOSNSECA, T.A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodioses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.10.1007, 2007.

DIMANDER, S.O.; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v. 111, n. 2-3, p. 192-209, 2003.

DITTMAR, K.; TEEGN, W.R. The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archaeological site in the Saaleunstrut valley, Germany. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, suplemento I, p.141-143, 2003.

DISCH, J.; KATZ, N.; PEREIRA, S. Y.; DE GOUVEA, V. L.; ANDRADE, M. O.; RABELLO, A. Factors associated with *Schistosoma mansoni* infection 5 years after selective treatment in a low endemic area in Brazil. **Acta Tropical**, v.81, n.2, p.133-42, 2002

DOS SANTOS, H.A.; BARÇANTE, J.M.P.; RIBEIRO, V.M.; DIAS, S.R.C.; OLIVEIRA JÚNIOR, S.D.; BARÇANTE, T.A.; LIMA, W.S. 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.

ECHEVARRIA, F. Fasciolose. In: XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses, 2004, Ouro Preto. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, n.0, p. 100-102, 2004.

ECHEVARRIA, F.A.M.; PINHEIRO, A.C.; ALVES-BRANCO, F. Tratamento de fasciolose crônica em bovinos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.14, p.185-189, 1979.

ESTEBAN, J.G.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. Geographical distribution, diagnosis and treatment of human fascioliasis: a review. **Research and reviews in Parasitology**, v. 58, p. 13-48, 1998.

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**, v.23, n.1, p.64-70, 2002.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; THAMSBORG, S. Effect of different times of administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on the transmission of ovine parasitic nematodes on pasture – a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.55-65, 2000.

FARINAZZO, R.J.M.; IGREJA, R.P.; HUGGINS, D.W. **Fasciolíase hepática**. In: Batista RS, Gomes AP, Igreja RP, Huggins DW (eds) Medicina Tropical. Abordagem atual das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Editora Cultura Médica, Rio de Janeiro, p.287-290, 2001.

FAVRE, T.C.; XIMENES, R.A.A.; GALVÃO, A.F.; PEREIRA, A.P.B.; WANDERLEY, T.N.; BARBOSA, C.S.; PIERRE, O.S. Reliability of current estimates of schistosomiasis prevalence in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, Suplemento 1, p.73-78, 2006.

FETTERER, R.H.; RHOADS, M.L. Biochemistry of the nematode cuticle: relevance to parasitic nematodes of livestock. **Veterinary Parasitology**, v.46, n.1-4, p.103-111, 1993.

FERRAZ, S.; MAIA, A.S.; MUCHOVEJ, J.J. Detecção, isolamento, identificação e avaliação in vitro da capacidade predatória de fungos nematófagos em solos brasileiros. **Nematologia Brasileira**, v.16, n.1-2, p.85, 1992.

FONTENOT, M.E.; MILLER, J.E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.3-4, p.203-213, 2003.

FREITAS, M.G. **Helmintologia veterinária**. 4ª. Ed., Gráfica Rabelo, Belo Horizonte, 1982. p.5-35.

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

FREIRE, F.C.O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juvenis of meloidogyne incognita by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, n.3, p.557-596, 1985.

FUENTES, M.V.; MALONE, J.B.; MAS-COMA. Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. **Acta Tropica**, v.79, n.1, p.87-95, 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE 2002. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5ª. Ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2002

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.

GAMS, W.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v.73, n.3-4, p. 329-337, 2001.

GÁRATE, T.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E. Antígenos de helmintos parasitos em proteccion y patologia. In: LÓPEZ, L.R.; LÓPEZ, M.C. **Parasitologia Molecular**. Conselho Superior de Investigações Científicas, Madrid, 1993. 287-303p.

GIRÃO, E. S.; UENO, H. Técnica das quatro tamises para o diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, n.8, p. 905-912, 1985.

GOMES, A.P.S.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.C.F. Differential in vitro pathogenicity of the genus *Monacrosporium* for phytonematodes, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, n.1, p.79-83, 1999.

GOMES, F.F.; OLIVEIRA, F.C.R.; PILE, E.A.; LOPES, C.W.G. Estabelecimento de foco de fasciolose hepática em propriedade de Campos dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.2, p.53-58, 2002.

GOMES, A.P.S.; RAMOS, M.L.; VASCONCELLOS, R.S.; JENSEN, J.R.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; ARAÚJO, J.V. In vitro activity of Brazilian strains of the predatory fungi *Arthrobotrys* spp. On free-living nematodes and infective larvae of *Haemonchus placei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.6, p. 873-876, 2001.

GUIMARÃES, M. P. *Fasciola hepatica*. In: NEVES, D.P. Parasitologia Humana. Atheneu. 9ª.Ed. 2005. p. 238-243.

GUIMARÃES, M.P.; CALDEIRA, M.C.M. Scanning electron microscopy of *Haemonchus similis* (Nematoda: Trichostrongylidae) parasite of cattle. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.2, p.39-141, 1997.

GUIMARÃES, I.C.S.; TAVERES-NETO, J. Transmissão da esquistossomose em crianças de um bairro de Salvador, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.5, p.451-455, 2006.

GRAMINHA, E.B.N. **Isolamento e atividade predatória de fungos nematófagos sobre nematóides gastrintestinais de ovinos da micro região de Jaboticabal-SP**. Jaboticabal: UNESP, 2004. 72p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, 2004.

GRAY, N.F. Ecology of nematode trapping fungi: effect on soil moisture, organic matter, distribution. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, n.1, p.449-507, 1985.

GRAY, N.F. Fungi attacking vermiform nematodes. In: POINAR, O.G.; BORNE, J.H. (Eds). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 3- 38.

GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. Wiley-Liss, New York, 1994. p. 1- 458.

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**, v. 64, n.1-2, p.47-64. 1996.

HIDALGO, L.; BOURNE, J.M.; KERRY, B.R.; RODRIGUEZ-KÁBANA, M.G. Nematophagous *Verticillium* spp. In soils infested with *Meloidogyne* spp in Cuba:

- isolated and screening. **International Journal of Pest Management**, v. 46, n.1, p. 277-284, 2000.
- JAFEE, B.A.; STORNG, D.R.; MULDOON, A.E. Nematode-trapping fungi of the a natural scrubland: tests for food chain involvement. **Mycologia**, v.88, n.4, p.444-564, 1996.
- JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection mechanisms in the fungus nematode system. In: POINAR, G.O.; JANSSON, H.B. **Diseases of nematode**, v. II. CRC Press, Boca Raton, 1988. p.1-72.
- JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, n.0, p.453-89, 1986.
- JATALA, P.; KALTENBACH, R.; BOCAMGEM, M. Biological control of *Meloydogine incognita* acrita and *Globodera pallida* on potatos. **Journal of Nematology**, v.11, n.1, p.303, 1979.
- JUNIPER, A.J. Dung as a source of predacious fungi. **Transaction British Mycological Society**, v.40, n.2, p.346-348, 1957.
- KAHN, L.P.; NORMAN, T.M.; WALKDEN-BROWN, S.W.; CRAMPTON, A.; O'CONOR, L.J. Trapping efficacy of *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* at temperatures existing at lambing in Australia. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n.1-2, p.83-89, 2007.
- KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n.6, p.705-711, 1999.
- KATZ N. Experiências com quimioterapia em grande escala no controle da esquistossomose no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 22, p.40-51, 1980.
- KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Analise critica da estimativa do numero de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, p. 303-308. 2000.
- KERRY, B.R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, n.1, p.323-441, 2000.
- KERRY, B.R.; HIDALGO, L. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated controle of root-knot nematode on organically grown vegetable crops in Cuba: **IOBC Bulletin**. (2004). En prensa.
- KERRY, B.R.; MULLEN, L.A. Fungal parasites of some plant parasitic nematodes. **Nematropica**, v. 11, p.187-189, 1981.
- KERRY, B.R.; SIMON, A.; ROVIRA, A.D. 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**, v.105, p.509-516, 1984.

KING, C.H.; DICKMAN, K.; TISCH, D.J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, v. 365, n. 9470, p. 561–1569, 2005.

KNOX, M.R.; FAEDO, M. Biological control of field infections of nematode parasites of young sheep with *Duddingtonia flagrans* and effects of spore in take on efficacy. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.2, p.155-160, 2001.

KNOX, M.R.; JOSH, P.F.; ANDERSON, L.J. Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. **Biological Control**, v.24, n.1, p.176-182, 2002.

LA MONDIA, J.A.; BRODIE, B.B. An observation chamber for evaluating potential biocontrol agents of *Globodera rostochiensis*. **Journal of Nematology**, v.16, p.112-15, 1984.

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

LOUKAS, A.; TRAIN, M.; PEARSON, M.S. Schistosome membrane proteins as vaccines. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.1, p.257-263, 2007.

LYSEK, H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. **Acta University Palackianae Olomueensis**. v.76, n.1, p.9-13, 1976.

LYSEK, H.; CHALUPOVÁ, V. Quantitative determination of activity of ovicidal fung. **Acta Univesity Palackianae Olomucensis** (in the Press), 1978.

LYSEK, H.; FASSATIOVÁ, O.; PINEDA, N.C.; HERNÁNDEZ, N.LORENZO. Ovicidal fungi in soils f Cuba. **Folia Parasitologica**, v.29, p.265-270, 1982.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de autodeshelimintización del suelo. **Salud Pública de México**, v.31, n.6, p.763-771, 1989.

LYSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamyosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v.38, p.255-259, 1991.

MAIA, A.S.; FERRAZ, S. Detecção e isolamento de fungos nematófagos de solos brasileiros. In: XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE NEMATOLOGIA, Jaboticabal, instituição, 1993, p.68.

McAULIFFE, P.R. The importance of worms to sheep and cattle. **Worm Control Seminar held at Hamilton Pastoral Research Station**, October 1-3, 1977.

MAS-COMA, M.S.; ESTEBAN, J.G.; BARGUES, M.D. Epidemiology of human fascioliasis: a review and proposed new classification. **Bulletin of the World Health Organization**, v.77, n.1, p.340-346, 1999.

MATTOS, M.J.; UENO, H.; GONÇALVES.; ALMEIDA, J.E.M. Ocorrência estacional e Biotecnologia de *Lymnaea columella* Say, 1817 (Mollusca, Lymnaeidae) em habitat

natural no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.6, p.248-250.

MAUCLINE, T.H.; KERRY, B.R.; HIRSCH, P. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. **Mycological Research**, v.108, n.2, p.161-169, 2003.

MARCOS, L.; ROMANI, L.; FLORÊNCIO, L.; TERASHIMA, A.; CANALES, M.; NESTARES, J.; HUAYANAY, L.; GOTUZZO, E. Hyperendemic and meso endemic zones of *Fasciola* infection surroundings urban Lima: a emerging disease. **Revista de Gastroenterologia del Peru**, v.27, n.1, p.31-36, 2007.

MARTIN, J.E.; AMORIM, A.; SCHALL, V.T. Acute schistosomiasis outbreak in the metropolitan area of Belo-Horizonte, Minas Gerais: alert about the risk of unnoticed transmission increased by growing rural tourism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, n.6, p.745-750, 2003.

MELO, A.L.; GUIMARAES, M.P. Helmitos. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 11^a. Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.185-191.

MELO, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V.; MELO, A.C.F.L. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. **Ciência Rural**, v.33, n.1, p.169-171, 2003.

MELO, A.L.; COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. 11^a Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005. p.193-211.

MENDOZA-DE-GIVES, P.; DAVIES, K.G.; CLARK, S.J.; BEHNKE, J.M. Predatory behavior of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v.119, p.95-104, 1999.

MENTZ, M.B.; WIEST, J.M.; GONÇALVES, P.C. Viabilidade de ovos de *Fasciola hepatica* de bovinos em sistema de biodigestão anaeróbia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.4, p.550-554, 2004.

MEZZARI, A.; ANTUNES, H.B.B.; COELHO, N.; CAUDURO, P.F.; BRODT, T.C. Fasciolíase humana no Brasil diagnosticada por colangiografia endoscópica retrógrada. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 36, p.93-95, 2000.

MITSUI, Y.; SHARMA, R.D. **Ocorrência de fungos parasitas de fitonematóides nos solos de cerrados do Distrito Federal**. In: Reunião Brasileira sobre controle biológico de doenças de plantas. Campinas, SP, 1991.

MIZOBUTSI, E.H.; FERRAZ, S.; RIBEIRO, R.C.F. Avaliação do parasitismo de diversos isolados fúngicos em ovos de *Heterodera glycines* e *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v. 24, n.2, p.167-172, 2000.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisople* e *Beauveria bassiana* em ovos

- de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.461-466, 1998.
- MORGAN-JONES, G.; WHITE, J.F.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Phytonematode pathology: ultrastructural studies. I parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs by *Verticillium chlamydosporium*. **Nematopica**, v.13, n.2, p. 245-260, 1983.
- 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**, v.107, n.1, p.38-46, 2003.
- MOTA, M.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V. Atividade predatória de fungos *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. **Ciência Animal**, v.10, n.1, p.37-41, 2000.
- MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.
- NORDBRNG-HERTZ, B.; STAHAMMAR, C.M. Capture of nematode by *Arthrobotrys oligospora* an electron microscope study. **Canadian Journal of Botanic**, v.56, p.1297-1307, 1978.
- PARAENSE, W L. Fauna planorbídica do Brasil. In: **Introdução à geografia médica do Brasil**. LACAZ, C. S.; BARUZZI, G. R; SIQUEIRA, J. R. W. Editora Universidade de São Paulo, v.10, p.213-239, 1972.
- PARAENSE, W. L. The Schistosome vectors in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v, 96, p.7-16, 2001.
- PARAUD, C.; PORS, I.; CHARTIER, C. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to control nematode parasites of first-season grazing goats in France. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.3, p.305-315, 2007.
- PEARSSON, Y.; ERLAND, S.; JANSSON, H.B. Identification of *Arthrobotrys* species using RFLP analysis of PCR amplified rDNA. **Nematologica**, v.41, p.329-332, 1995.
- PELLEGRINO, J. Diagnóstico da esquistossomose pela reação intradérmica. **Revista Brasileira de Doenças Tropicais**, v.9, n.0, p.105, 1957.
- PEÑA, M.T.; MILLER, J.E.; FONTENOT, M.E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* in feces of sheep. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.259-265, 2002.
- PERRY, R.M.; WRIGHT, D.J. **The physiology and biochemistry of free-living and plant parasitic nematodes**. CABI Publishing, Wallingford, 1998. 464 p.
- PETROIANU, A. Tratamento cirúrgico da hipertensão porta na esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p.253-265, 2003.

PILE, E.; GAZETA, G.; SANTOS, J.A.A.; COELHO, B.; SERRA-FREIRE, N.M. Ocorrência de fascioliasis humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, p.413-414, 2000.

PILLE, E.; LESSA, S.S.; SCHERER, P.O.; SANTOS, J.A.A.; VASCONCELOS, M.C. Ocorrência de fasciolosis bovina em Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil. **Parasitologia al Dia**, v.23, n.1, p.123-124, 1999.

PRIA, D.M. **Controle biológico de *Meloidogyne incognita*, Raça 3, pelos fungos *Verticillium chlamydosporium* e espécies de *Monacrosporium*, isolados ou combinados**. Viçosa: UFV, 1992. 79p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1992.

QUEIROZ, V. S.; LUTZ, E.; LEITE, C. L.; CÍRIO, S.M. Fasciola hepatica (Trematoda, Fasciolidae): estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná. **Acta Biológica Paranaense**, v. 31, p.99-111, 2002.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª. Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001. p.426-441.

RIBEIRO, R.R. **Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos**. Viçosa: UFV, 2003. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; GINTIS, B.A. Effectiveness of species of *Gliocladium*, *Paecilomyces*, and *Verticillium* for control of *Meloidogyne* in field soil. **Nematropica**, v.14, p.155-170, 1984.

SANTOS, M.A. **Deteção, identificação e avaliação do potencial antagonista de fungos nematófagos presentes em solos do Brasil**. Viçosa: UFV, 1990. 97p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1990.

SANTOS, C.P.; CHARLES, T.P.; RODRIGUES, M.L.A. Atividade predatória de *Arthrobotrys oligospora* e *Duddingtonia flagrans* em estádios pré-parasitários de ciatostomíneos em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.4, p.113, 1995.

SANYAL, P.K.; CHAUAN, J.B.; MUKHOPADHYAYA. Implications of fungicidal effects benzimidazole compounds of *Duddingtonia flagrans* in integrated nematode parasite management in livestock. **Veterinary Research Communications**, v.28, n.4, p.375-385, 2004.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

SCHERER, P.O.; PILE, E. A.; SERRA-FREIRE, N.M.; SCHAFFER, G.V. Uso da técnica de punção-biópsia para o diagnóstico histopatológico da fasciolose ovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.36, n.4, p.12-15, 1999.

SERRA-FREIRE, N.M.; BORDIN, E.L.; LESSA, C.S.S.; SCHERER, P.O.; FARIAS, M.T.; MALACCO, A.; TSCHUMI, J.A. Reinvestigação sobre a distribuição da *Fasciola hepatica* no Brasil. **A Hora Veterinária**. Edição extra, n.1, p.19-21, 1995.

SILVA, J.F.V. **Fungos endoparasitas de nematóides na região de Lavras e São Sebastião do Paraíso: ocorrência, caracterização e potencial para o controle biológico**. Lavras: UFLA, 1990. 63p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Universidade Federal de Lavras, 1990.

SILVA, A.V.M.; MASSARA, C.L. *Ascaris lumbricoides*. In: Neves, D.P. **Parasitologia Humana**. 11^a Ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005. p.253-259.

SOULSBY, E.J.L. **Helminths, arthropods ad protozoa of domesticated animals**. 7^a. Ed. Baillière Tindall, London, 1982. 806p.

SOUZA, C.P.; CALDEIRA, R.L.; DRUMMOND, S. C.; MELO, A.L.; GUIMARÃES, C.T.; SOARES, D.M.; CARVALHO, O.S.; Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n.3, p.293-302, 2001.

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

TERRIL, T.H.; LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HSTED, S.; MILLER, J.E.; KAPLAN, R.M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.285-296, 2004.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. Salvador: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p.

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

WALLER, P.J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science Technology**, v.126, n.3-4, 277-289, 2005.

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

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The prospect for biological control of the free living stages of nematode parasite of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 26, p.915-925, 1996.

WALLER, P.J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENESSY, D.R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v.51, n. 3-4, p.289-299, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**, n.115. Geneva, 2002.

9. ANEXO

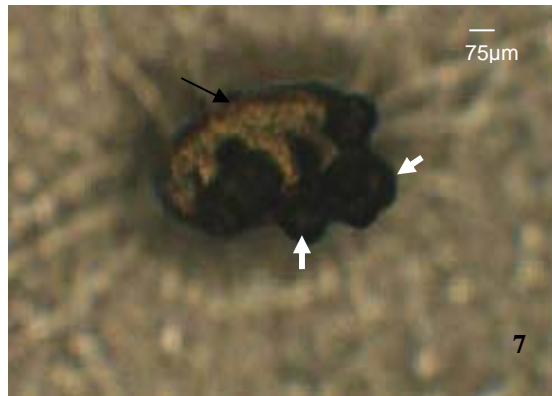
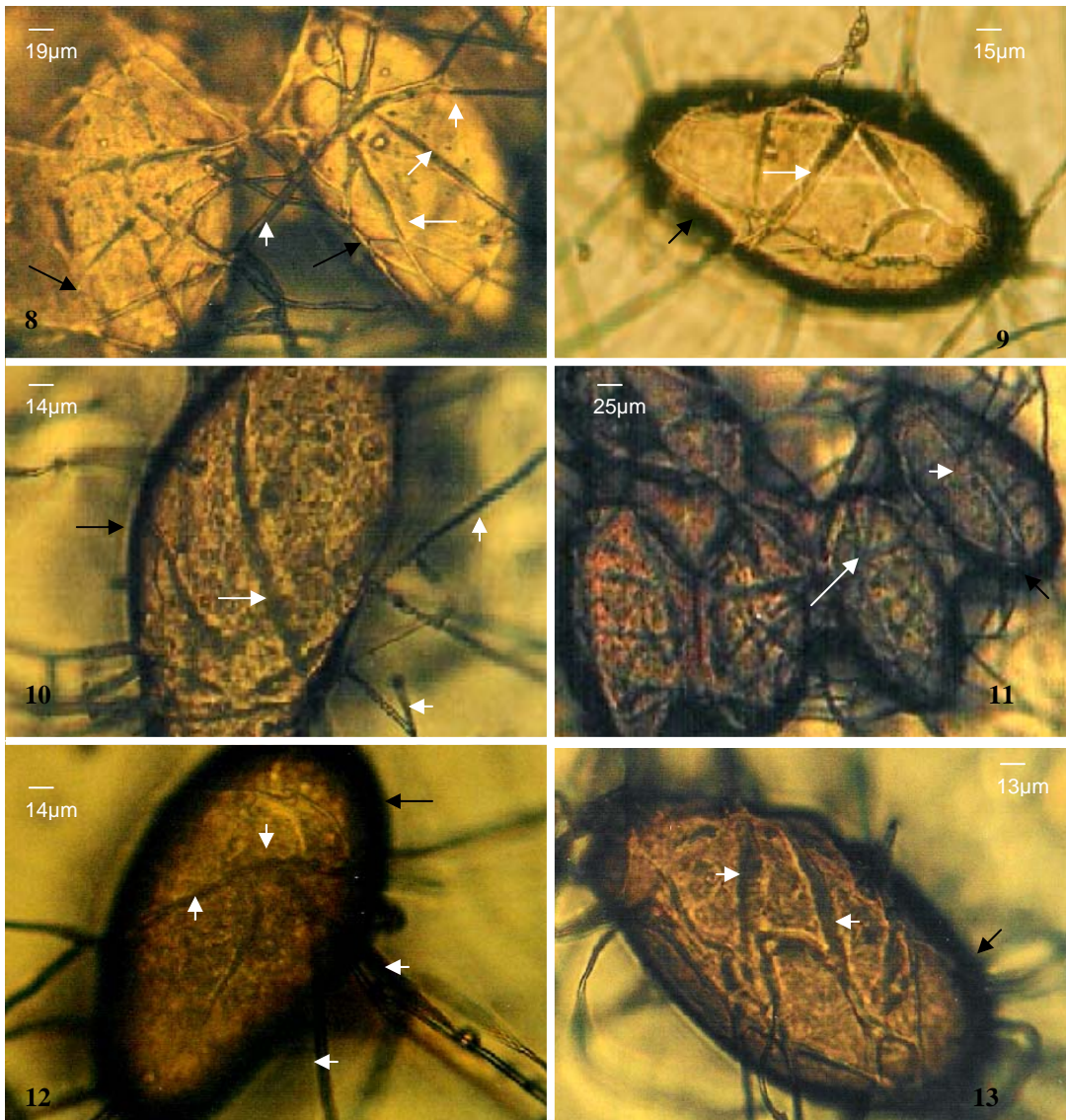
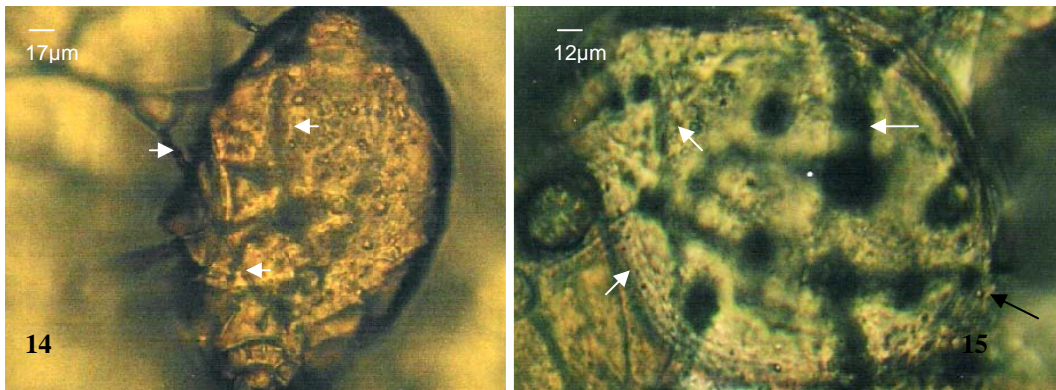


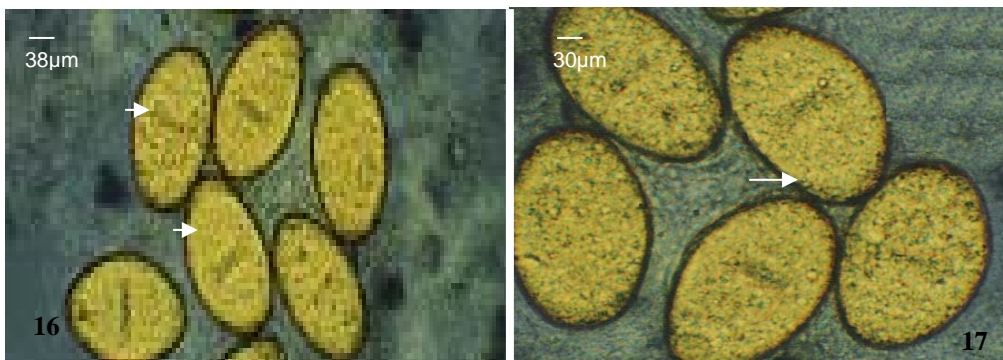
Figura 7 – Conídios do fungo *Duddingtonia flagrans* (seta branca) aderidos ao ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x.



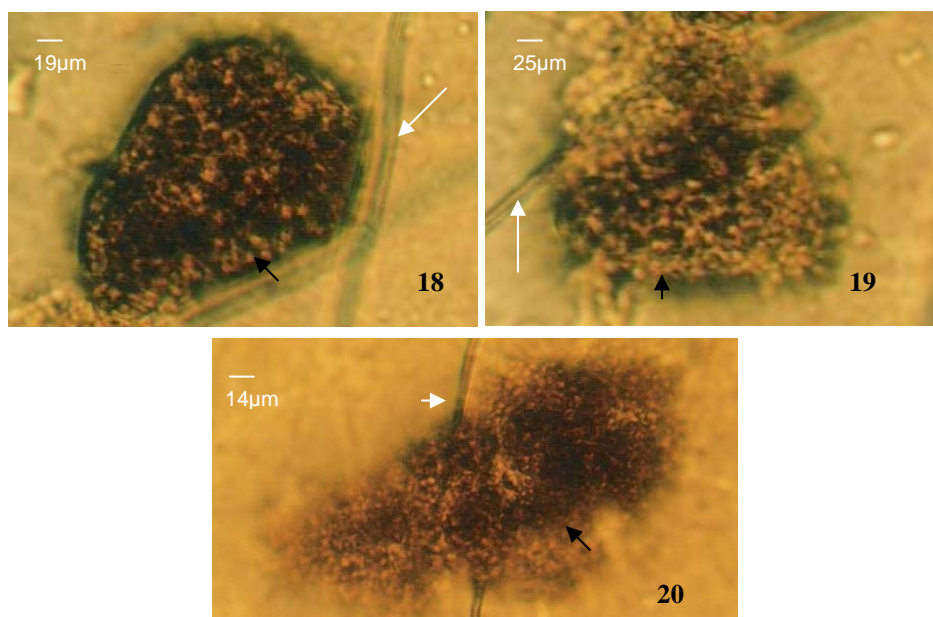
Figuras 8-13 - Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Fasciola hepatica* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x.



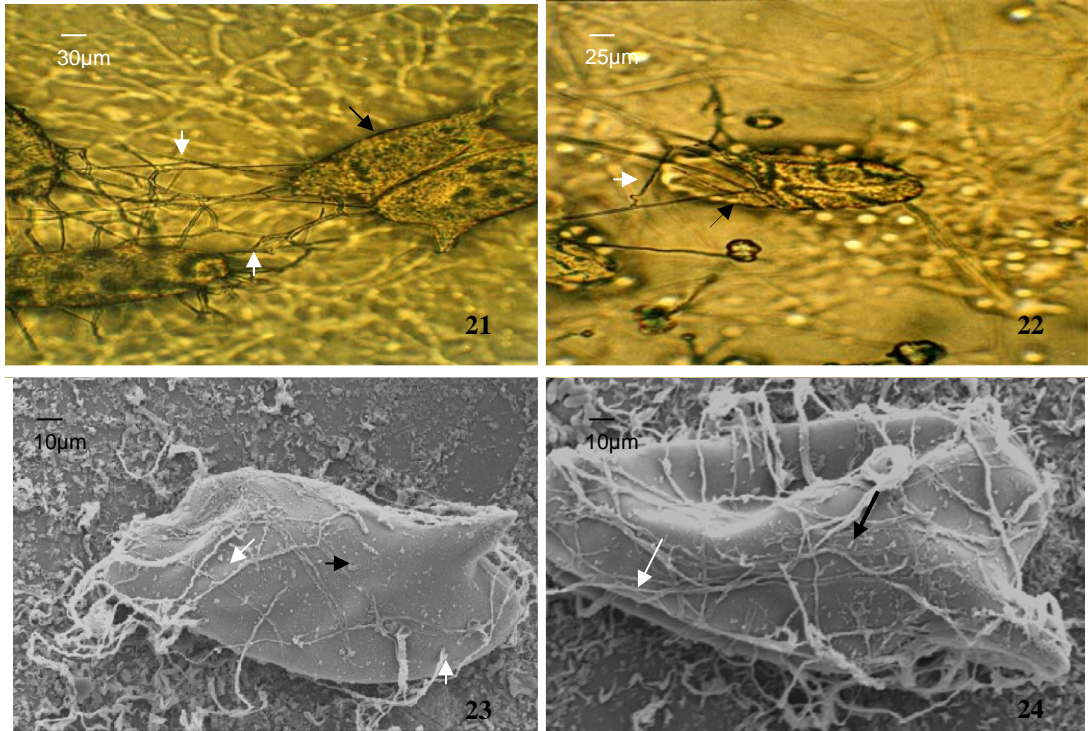
Figuras 14 e 15 - Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovos de *Fasciola hepatica* (seta preta) iniciando o processo de expansão, aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x.



Figuras 16 e 17 - Ovos de *Fasciola hepatica* sem fungo (controle) (seta branca), aos 21 dias de cultura. Microscopia de luz - objetiva de 40x.

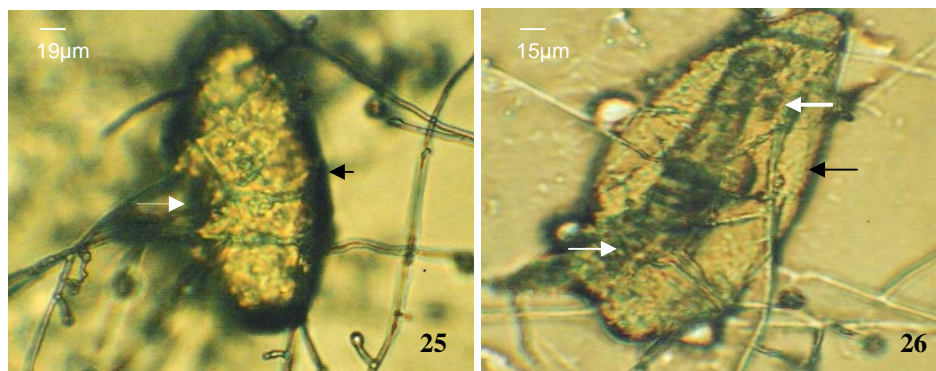


Figuras 18-20 - Ovos de *Fasciola hepatica* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia*, aos 21 dias de interação (seta branca). Microscopia de luz - objetiva de 40x.

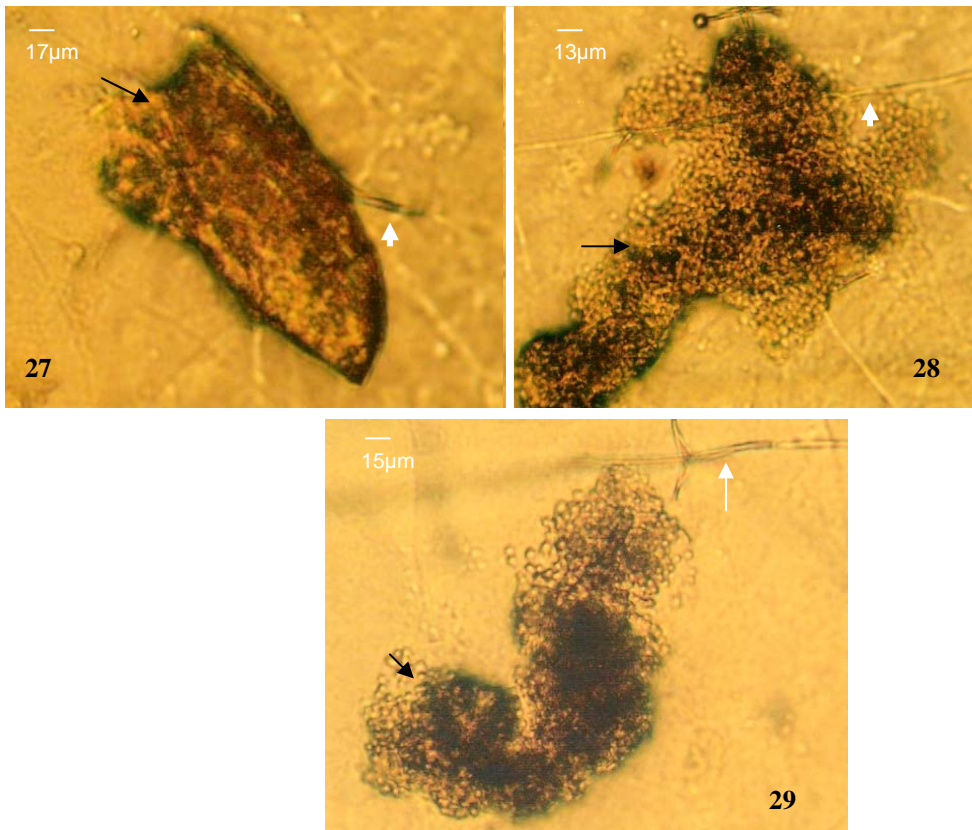


Figuras 21 e 22 - Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovo de *Schistosoma mansoni* (seta preta), aos sete dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x.

Figuras 23 e 24 Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta preta) e ovo de *Schistosoma mansoni*, aos sete dias de interação (seta preta). Microscopia eletrônica de varredura.



Figuras 25 e 26 - Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) e ovos de *Schistosoma mansoni* (seta preta) iniciando o processo de expansão, aos 14 dias de interação. Microscopia de luz - objetiva de 40x.



Figuras 27-29 - Ovos de *Schistosoma mansoni* destruídos (seta preta) e hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca), aos 21 dias de interação. Microscopia de luz – objetiva de 40x.



Figura 30 - Ovos de *Schistosoma mansoni* sem fungo (controle) (seta branca), aos 21 dias. Microscopia de luz - objetiva de 40x.

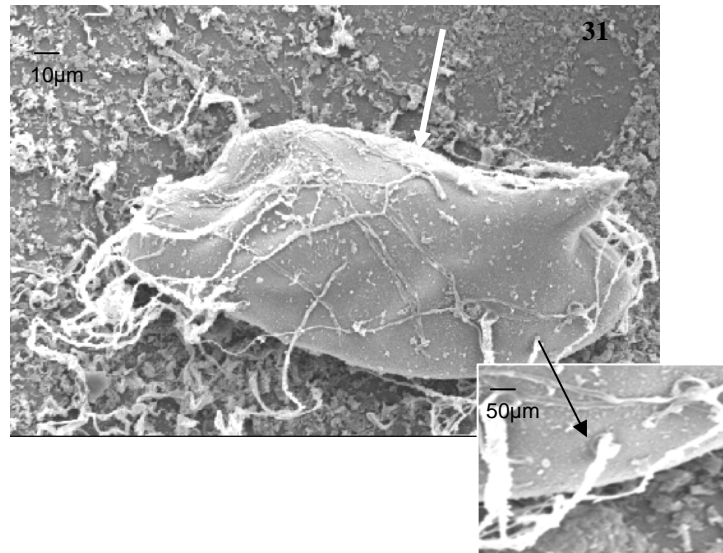


Figura 31 - Ovo de *Schistosoma mansoni* (seta branca) e apressório (no detalhe - seta preta) de *Pochonia chlamydosporia*, aos sete dias de interação. Microscopia eletrônica de varredura.

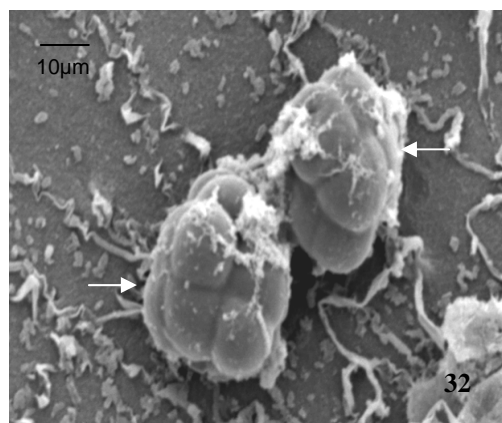


Figura 32 - Clamidósporos de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca). Microscopia eletrônica de varredura.