

LORENDANE MILLENA DE CARVALHO

**FUNGO NEMATÓFAGO *Arthrobotrys musiformis* COMO
CONTROLADOR BIOLÓGICO DE NEMATOIDES DE EQUINOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C331f
2014
Carvalho, Lorendane Millena de, 1988-
Fungo helmintófago *Pochonia chlamydosporia* no
controle biológico de *Parascaris equorum* / Lorendane
Millena de Carvalho. - Viçosa, MG, 2014.
x, 60f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador : Jackson Victor de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

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

CDD 22. ed. 632.6

LORENDANE MILLENA DE CARVALHO

**FUNGO NEMATÓFAGO *Arthrobotrys musiformis* COMO CONTROLADOR
BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES DE EQUINOS**

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

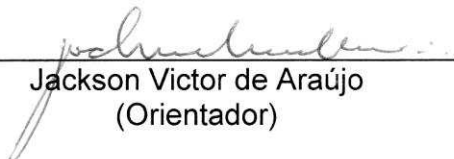
APROVADA: 12 de março de 2018.


Juliana Milani Araujo


Leandro Licursi de Oliveira


Rogério Oliva Carvalho


Artur Kanadani Campos


Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema do universo, causa primária de todas as coisas.

A Jesus, meu mestre, modelo e guia e à Nossa Senhora Aparecida, minha mãe de infinito amor.

Aos meus pais, Eliene e Firmino, pelo amor, incentivo e confiança em mim depositada.

Aos meus irmãos, Bruna e Gleidson, pelo amor, amizade e por serem sempre meus exemplos a serem seguidos.

À minha sobrinha Lara, pelo amor e por despertar em mim o desejo de ser uma pessoa melhor a cada dia.

Ao Renato, pelo companheirismo, carinho e pela compreensão nos momentos de ausência e correria durante essa etapa da minha formação.

Ao meu amigo e orientador, professor Jackson Victor de Araújo, pela oportunidade concedida e pela singular orientação.

Ao professor Artur Kanadani Campos, pela amizade, conselhos e ajuda durante a realização dos experimentos

Aos amigos do laboratório: Ademir, José Geraldo (Tuim), Aloizio Carlos (Calzinho), Samuel, Marisa, Isabela, Atilio, Wendeo e todos os demais amigos da pós-graduação, estagiários e funcionários do Departamento de Veterinária (DVT). Obrigada pela agradável convivência e pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho.

À Rosi, secretária do programa de pós-graduação do DVT, por toda a ajuda prestada.

Ao senhor Fernando e ao Cristian, amigos do setor de equideocultura da UFV, pela solicitude e ajuda na execução dos experimentos com os animais.

Aos animais utilizados nos experimentos, expresse meu eterno respeito e gratidão.

Aos meus animais, os que já se foram e os que hoje estão comigo. São o motivo pelo qual hoje sou médica veterinária.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Veterinária da UFV e ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade e por toda a estrutura oferecida.

Às agências de fomento, FAPEMIG e CNPq e CAPES, pela parceria e custeio dos materiais e equipamentos necessários para a execução dos experimentos e pela concessão da bolsa.

BIOGRAFIA

Loirendane Millena de Carvalho, filha de Firmino de Carvalho Filho e Eliene Braga de Carvalho, nasceu em 10 de março de 1988, em Pirapora, Minas Gerais. Em dezembro de 2005, concluiu o ensino médio no Colégio Genecista de Pirapora. No ano de 2007, iniciou sua graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Federal do Espírito Santo – Alegre, ES. No ano de 2009, transferiu-se para a Universidade Federal de Viçosa, onde concluiu sua graduação em Medicina Veterinária, em janeiro de 2012. Em março de 2012 ingressou no Mestrado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação no dia 20 de fevereiro de 2014. Em março de 2014 ingressou no Doutorado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese no dia 12 de março de 2018.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 A criação de equinos no Brasil e no mundo	4
2.2 O problema da verminose na equideocultura e a resistência parasitária	4
2.3 Controle biológico e fungos nematófagos.....	6
2.4 <i>Arthrobotrys musiformis</i>	7
REFERÊNCIAS	9
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. HIPÓTESES	14
CAPÍTULO 1: Fungo nematófago <i>Arthrobotrys musiformis</i> como controlador biológico de larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos	
1. Introdução	16
2. Material e métodos	17
3. Resultados	20
4. Discussão	22
Conclusão	24

Referências	25
CAPÍTULO 2: Avaliação da influência da dose de esporos do fungo nematófago <i>Arthrobotrys musiformis</i> na redução de larvas infectantes de estrongilídeos em fezes de equinos	
1. Introdução	30
2. Material e métodos	31
3. Resultados	36
4. Discussão	41
Conclusão	43
Referências	44
5. CONCLUSÕES GERAIS	47
ANEXO	49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Médias* e desvios-padrão (\pm) de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos predadas durante três dias de incubação com diferentes concentrações de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144)

Tabela 2: Médias* e desvios-padrão (\pm) de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos não predadas do quarto ao sexto dia de incubação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144).

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1: Médias e desvios-padrão (I) do número de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos não predadas ao final de sete dias de interação com o fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144), recuperadas pelo método de Baermann-Moraes. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0.01$) dos grupos tratados em comparação ao grupo controle, demonstrado pelo teste de Tukey.

CAPÍTULO 2

Figura 1: Médias e desvios-padrão (I) do número de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos não predadas ao final de 7 dias de interação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144), recuperadas pelo método de Baermann-Moraes. Letras diferentes demonstram diferença estatística ($p < 0.01$) os grupos tratados e o grupo controle, pelo teste de Tukey. (Número de L3 de ciatostomíneos/ número de conídios de *A. musiformis* por grupo: C1= 500/1000; C10: 500/10.000; C30: 500/30.000; Controle: 500 L3 de ciatostomíneos, sem adição de conídios).

Figura 2: Estruturas do fungo *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) e sua interação com larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos. (A) Conídio germinando. (B-C) armadilhas do tipo rede adesiva tridimensional, formadas por diferenciação ao longo das hifas do fungo. (D-E) Larvas de ciatostomíneos capturadas pelas armadilhas do fungo *A. musiformis*. Setas pretas indicam armadilhas formadas para captura de larvas. Setas brancas indicam conídios do fungo.

Figura 3: Médias* e desvios-padrão (I) de larvas infectantes (L3) de estrongilídeos parasitos de equinos, recuperadas de coproculturas pelo método de Baermann-Moraes, após 15 dias de interação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis*. (Número de conídios por grama de fezes: TC1= 100/g; TC2= 1000/g; TC3= 2000/g; TC4= 10.000/g; TC5= 15.000/g; Controle= sem adição de conídios).

Figura 4: Médias* e desvios-padrão (I) de larvas infectantes (L3) de estrongilídeos parasitos de equinos recuperadas, pelo método de Baermann-Moraes, de bolos fecais depositados em pastagem, após interação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis*, durante um período de 15 dias. (Número de conídios por grama de fezes: TP1= 100/g; TP2= 500/g; TP3= 1000/g; Controle= sem adição de conídios).

RESUMO

CARVALHO, Lorendane Millena, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2018. **Fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* como controlador biológico de nematoides de equinos.** Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Arthrobotrys musiformis é um fungo formador de armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais, capazes de capturar e preda larvas infectantes (L3) de nematoides. Nos equinos, os nematoides gastrintestinais podem levar a condições patológicas que interferem no desenvolvimento corporal e podem, inclusive, levar os animais a óbito. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) no controle de L3 de nematoides estrongilídeos que acometem equinos. Inicialmente foi analisado a capacidade do isolado A144 de passar pelo trato gastrintestinal de equinos e manter a sua atividade predatória sobre larvas infectantes de ciatostomíneos. Coletas de fezes foram feitas 12h, 24, 36, 48 e 72h após a administração de péletes contendo micélio fúngico. Os péletes recuperados na última coleta foram colocados em placas de Petri contendo meio ágar-ágar 2% para germinarem, e larvas infectantes de ciatostomíneos foram adicionadas, para avaliar a atividade do fungo sobre essas. Paralelamente, placas contendo o isolado A144 crescido a partir de colônias mantidas em laboratório também receberam L3 de ciatostomíneos e ao final de sete dias de interação, foram obtidos os percentuais de redução de 96.61% e 96.18% dos grupos contendo o fungo mantido em laboratório e o fungo recuperados dos péletes, respectivamente, demonstrando que o fungo é capaz de passar pelo trato gastrintestinal de equinos e manter a sua capacidade predatória. Diferentes doses de conídios do isolado A144 foram avaliadas em placas, em coproculturas e em bolos fecais depositados em pastagem e o que se observou é que a redução de L3 nas dosagens de conídios testadas apresentou pouca variação entre elas, mas todas apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle. As doses iniciais de esporos avaliadas neste trabalho não foram determinantes na capacidade do isolado A144 em reduzir o número de larvas infectantes de estrongilídeos, tanto em condições controladas, quanto

em condições à campo. O isolado A144 do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* é capaz de manter sua viabilidade após passagem pelo trato gastrointestinal de equinos e preda larvas infectantes de estrogilídeos. Os resultados encontrados indicam que o fungo *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) é uma alternativa para o controle das fases de vida livre dos estrogilídeos nematoides de equinos.

ABSTRACT

CARVALHO, Lorendane Millena, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2018. **Nematophagous fungus *Arthrobotrys musiformis* as a biological controller of equine nematodes.** Adviser: Jackson Victor de Araújo.

Arthrobotrys musiformis is a trap-forming fungus of three-dimensional adhesive nets, capable of capturing and predating infective (L3) nematode larvae. In horses, gastrointestinal nematodes can cause pathological conditions that interfere with body development and can even cause death. The objective of this work was to evaluate the efficacy of the nematophagous fungus *Arthrobotrys musiformis* (isolate A144) in the control of L3 of strongylid nematodes of horses. Initially, the ability of the isolate A144 to pass through the gastrointestinal tract of horses and to maintain its predatory activity on infective Cyathostomin larvae was analyzed. The mycelium of the fungus was incorporated into pellets of sodium alginate and administered orally, in a single dose, to horses. Fecal collections were performed 12h, 24, 36, 48 and 72h after administration of pellets. Pellets recovered in the last collection were placed in Petri dishes containing 2% agar-agar medium to germinate, and infective larvae of cyathostomins were added to evaluate fungus activity on them. In parallel, plaques containing the A144 isolate grown from colonies kept in the laboratory also received L3 from cyathostomins and at the end of seven days of interaction, reduction rates of 96.61% and 96.18% of the L3 in group containing the fungus were kept in the laboratory and the fungus recovered from the pellets, respectively, demonstrating that the fungus is able to pass through the gastrointestinal tract of horses and maintain its predatory capacity. Different doses of conidia of isolate A144 were evaluated in plaques, coprocultures and fecal pats deposited on pasture and was observed that the reduction of L3 in the dosages of conidia tested showed little variation among them, but all presented a statistically significant difference when compared to the control group. The initial doses of spores evaluated in this work were not determinant in the ability of isolate A144 to reduce the number of infectious larvae of strongyles under both controlled and field conditions. The A144 isolate of the nematophagous fungus *Arthrobotrys musiformis* is able to

maintain its viability after passage through the gastrointestinal tract of horses and predate infectious larvae of strongyles. The results indicate that the fungus *Arthrobotrys musiformis* (isolate A144) is an alternative to the control of free life stages of equine nematodes strongyles.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A criação de equinos no Brasil tem uma importante participação na economia do país, seja pelos empregos diretos que essa gera, seja pelos empregos indiretos gerados nas indústrias de medicamentos, insumos, etc (CNA, 2004).

Estima-se que o número de equinos no Brasil gire em torno de 5 milhões de animais, o que permite o país ocupar a 4ª posição no ranking dos países com maiores rebanhos equinos no mundo, atrás somente de Estados Unidos, China e México. Dentre os estados brasileiros, Minas Gerais detém aproximadamente 14% do total de animais do país (IBGE, 2013; MAPA, 2016).

O complexo do agronegócio cavalo no Brasil movimenta aproximadamente 54 milhões de reais somente com o segmento de medicamentos veterinários (CNA, 2004). De acordo com dados do sindicato nacional da indústria de produtos para a saúde animal (SINDAN, 2014), os antiparasitários representam 25% do total de produtos veterinários comercializados no Brasil.

Com relação às parasitoses, essas representam um problema de distribuição mundial, ao qual não se pode atribuir somente os prejuízos financeiros, mas também as perdas decorrentes aos danos causados à saúde dos animais. Dentre os nematoides de equinos, os pequenos e grandes strongilídeos apresentam grande importância em função da prevalência de infecções por esses parasitos, os quais podem gerar condições patológicas,

retardo no desenvolvimento corporal e até a morte de animais severamente infectados (BUZZATI, et al., 2017).

Para contornar esse problema, a conduta mais comum dos proprietários e criadores de equinos é recorrer ao uso de produtos químicos antiparasitários. Contudo, essa alternativa muitas vezes tem apresentado resultados insatisfatórios, uma vez que a ocorrência de desenvolvimento de resistência, por parte dos parasitos, aos antiparasitários disponíveis comercialmente, tem sido relatada com frequência em diversos países, incluindo o Brasil (KAPLAN, 2004; MOLENTO, 2005).

A resistência às bases antiparasitárias é um evento no qual observa-se a perda da eficiência de uma determinada droga contra parasitos (eficiência inferior a 95%), quando essa droga é utilizada em condições semelhantes após um determinado período de tempo (CONDER & CAMPBELL (1995 apud MOLENTO, 2005)). Para tentar contornar esse problema, a pesquisa e o desenvolvimento de métodos alternativos de controle parasitário faz-se necessário para auxiliar o controle químico, na tentativa de retardar o desenvolvimento da resistência aos antiparasitários (MOLENTO, et al., 2013).

Dentre os métodos alternativos para o controle das parasitoses gastrintestinais, o controle biológico, por meio da utilização de fungos nematófagos, destaca-se em função dos resultados apresentados em pesquisas realizadas em diversos países. Sua ação está baseada na redução das formas parasitárias infectantes presentes no ambiente (ovos ou larvas) as quais são destruídas pelos fungos, propiciando, assim, um ambiente menos contaminado para a criação animal (BRAGA & ARAÚJO, 2014).

O modo de ação dos fungos nematófagos está baseado na ação enzimática associada a uma ação física de captura e/ou invasão, com posterior destruição dos ovos ou larvas. Os fungos utilizados para o controle biológico são inofensivos para o meio ambiente, uma vez que são saprófitas, de origem do solo. Assim, não há uma introdução de organismos estranhos e nocivos ao microambiente (MOTA et al., 2003)

Os gêneros de fungos nematófagos mais estudados no controle biológico de parasitos de interesse veterinário no Brasil são: *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Pochonia*, sendo os três primeiros conhecidos por sua ação predatória sobre larvas e o último com ação sobre ovos de helmintos (BRAGA & ARAÚJO, 2014).

O gênero *Arthrobotrys* já foi amplamente estudado em diversos países, em função do potencial das espécies pertencentes a esse gênero apresentarem potencial de predação de larvas de fitonematóides e também de larvas infectantes de nematoides parasitos de animais. Com relação à utilização desses fungos contra larvas de parasitos de interesse veterinário, as espécies *A. robusta*, *A. conoides*, *A. cladodes*, *A. oligospora*, e *A. musiformis* já demonstraram resultados positivos em pesquisas realizadas no Brasil (GOMES et al., 2000; GRAMINHA et al., 2005; BRAGA et al., 2009; MACIEL et al., 2009).

A presente tese é resultado de pesquisas que visaram avaliar a possibilidade de ampliação das opções de controle biológico de nematoides parasitos de equinos, por meio da utilização de fungos nematófagos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A criação de equinos no Brasil e no mundo

O primeiro registro oficial do cavalo no Brasil data de 1549 (CNA, 2004). A utilização dos equinos vem modificando-se ao longo dos anos e hoje nota-se que a sua importância vai além da locomoção humana em meio rural, sendo esses animais utilizados, também, em atividades de esporte e lazer (MAPA, 2016).

No Brasil, a população de equinos gira em torno de 5 milhões de animais. O complexo agronegócio cavalo apresenta grande importância econômica no Brasil no que se refere à geração de empregos (cerca de 3 milhões de empregos diretos e indiretos) além da movimentação de cerca de 16 bilhões de reais anuais (MAPA, 2016).

Dados divulgados pelo SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal), indicam que no ano de 2014, a indústria farmacêutica veterinária no Brasil obteve um faturamento próximo a R\$ 4,5 milhões de reais, sendo que a classe de antiparasitários representou 25% deste total. Os medicamentos para equídeos representam um total de 2,1% do faturamento. No contexto mundial, a indústria farmacêutica veterinária movimentou aproximadamente \$ 23,9 bilhões de dólares nesse mesmo ano.

2.2. O problema da verminose na equideocultura e a resistência parasitária

De acordo com Molento (2005), a fauna parasitária que infectam os equinos é extensa e podemos destacar nessa, os pequenos strongilídeos,

também denominados ciatostomíneos (mais de 40 espécies), os grandes strongilídeos (*Strongylus vulgaris*, *S. equinus*, *S. edentatus*), *Oxyuris equi*, *Trichostrongylus axei*, *Gasterophilus* spp., *Habronema* spp., *Dictyocaulus arnfieldi*, *Anoplocephala* spp., *Strongyloides westeri* e *Parascaris equorum*, sendo esses dois últimos muito comuns em animais mais jovens.

Dentre todos os parasitos citados, os grandes e os pequenos strongilídeos são apontados como os mais prevalentes, e apresentam importância na criação de equídeos em todo o mundo, uma vez que podem afetar o desenvolvimento e desempenho desses animais, podendo, inclusive, ocasionar graves distúrbios gastrointestinais, tais como cólicas (OGBOURNE, 1978; TAVASSOLI et al., 2010).

Conder & Campbell (1995 apud MOLENTO, 2005) definem a resistência parasitária como um evento no qual observa-se a perda da eficiência de uma droga contra parasitos, se utilizada em condições semelhantes após um determinado período de tempo. Segundo esses autores, o fenômeno da resistência pode ser confirmado quando se verifica uma eficácia inferior a 95% de redução da carga parasitária por uma droga que antes apresentava resultados superiores à essa porcentagem.

Para que este fenômeno ocorra, faz-se necessária, na população parasitária, a presença de exemplares que apresentem o gene que confere a resistência para a droga utilizada. Assim, há persistência da população resistente após o tratamento parasitário, o que irá contribuir para a mudança do perfil genético da população, a qual passará a ser predominantemente formada por indivíduos não susceptíveis àquela droga utilizada anteriormente.

O intervalo de tempo necessário para observar-se o início desse fenômeno depende não só da espécie do parasito e da classe do antiparasitário, mas também da frequência do tratamento nos animais (MOLENTO, 2005).

O surgimento da resistência parasitária é inevitável mas pode ser retardado com práticas adequadas no manejo dos animais. Sangster (1999) cita a necessidade de estratégias de controle que evitem a terapêutica por bases químicas para se reduzir a pressão de seleção à resistência nas populações de parasitos. Assim, são imprescindíveis métodos alternativos de controle parasitário, que permitam reduzir a frequência da utilização de antiparasitários químicos, aumentando sua vida útil, e protelando o surgimento da resistência parasitária (MOLENTO et al., 2013).

2.3. Controle biológico e fungos nematófagos

Controle biológico é um termo utilizado para definir a utilização de antagonistas de ocorrência natural na redução de populações prejudiciais à uma atividade de interesse, como a produção agrícola ou animal (GRONVOLD, 1996). A maioria dos estudos sobre controle biológico de nematoides de animais domésticos envolve o uso de fungos nematófagos (MENDOZA-DE-GIVES, 1999).

De acordo com Barron (1977), os fungos predadores de nematoides são divididos em três grupos, denominados predadores, endoparasitas e parasitos de ovos (ovicidas ou oportunistas). Esses fungos são comumente encontrados em matéria orgânica em decomposição e solos agrícolas (SAXENA & MITTAL 1995).

A maior parte desses fungos são dependentes de estruturas em hifas específicas, das quais depende a virulência da cepa fúngica, caracterizada pela capacidade do fungo de invadir um hospedeiro. Essas estruturas permitem a captura e apreensão do nematoide de forma mecânica ou por adesão (NORDBRING-HERTZ, 2004).

A taxonomia desses fungos baseia-se nas estruturas de captura (que apreendem os nematoides), os quais são produzidos ao longo das hifas (Oliveira, et al., 2002). De acordo com a velocidade do crescimento micelial, Cooke (1963) agrupou os fungos predadores em: fungos de crescimento rápido, composto pelos formadores de redes e pelos produtores de nódulos adesivos, e os fungos de crescimento mais lento, representados pelos formadores de anéis constritores.

2.4. *Arthrobotrys musiformis*

O gênero *Arthrobotrys* foi descrito por Corda, em 1839, (DRECHSLER, 1937). Van Oorschot (1985), avaliou o gênero e reconheceu 27 espécies e 5 variedades. Os exemplares deste gênero apresentam um modo de ação sobre as larvas, baseado na formação de armadilhas do tipo redes adesivas tridimensionais, através das quais os fungos capturam suas presas (BARRON, 1977).

Com relação à utilização desses fungos contra larvas de parasitos de interesse veterinário, as espécies *A. robusta*, *A. conoides*, *A. cladodes*, *A. oligospora* e *A. musiformis* já demonstraram resultados positivos em pesquisas realizadas no Brasil e em outros países (BIRD & HERD, 1995; MOTA,

BEVILAQUA & ARAÚJO, 2000; ESLAMI, 2005; ARAUJO, 2010; CARVALHO, BRAGA & ARAÚJO, 2011; SILVEIRA, et al., 2017a; SILVEIRA et al., 2017b).

A espécie *Arthrobotrys musiformis* é formadora de redes adesivas, seus conídios apresentam morfologia ligeiramente curva, com presença de um septo e dimensões de 20-41 x 7-14 µm (OLIVEIRA et al., 2002).

O modo de ação do *A. musiformis* segue o padrão dos fungos predadores, com uma ação mecânica seguida de uma ação enzimática. Com relação a esses mecanismos, Nordbring-Hertz, Jansson e Tunlid (2006) descreveram a predação de nematóides pelo gênero *Arthrobotrys* iniciando com a atração do parasito por componentes produzidos pelo micélio fúngico, seguido pela captura, através das armadilhas (redes adesivas tridimensionais), com posterior adesão. Essa adesão seria facilitada por fibrilas extracelulares presentes nas armadilhas do fungo, provavelmente para facilitar a ancoragem e invasão fúngica ao parasito. Em seguida, ocorre a penetração no nematóide, a qual é facilitada pela ação de enzimas extracelulares hidrolíticas e serino-proteases, produzidas pelo fungo. As primeiras solubilizam macromoléculas, enquanto as proteases são capazes de solubilizar a cutícula do parasito. Após a penetração, o conteúdo do nematóide é digerido através da ação de gotículas lipídicas que se acumulam em suas hifas tróficas, e também pela ação de lectinas no citoplasma.

Referências

ARAUJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O. (2010). *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. **Parasitology Research**, 107 (1):103-108.

BARRON G.L. (1977). **The nematode-destroying fungi. Topics in Mycobiology**, No. 1. Canadian Biological Publications, Guelph, Canada, 140 pp.

BIRD, J.; HERD, R.P. (1995). *In vitro* assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. **Veterinary Parasitology**, 56(1-3):181-187.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; CAMPOS, A.K. (2009). Controle in vitro de larvas infectantes de ciatostomíneos (nematoda: cyathostominae) de equinos utilizando os fungos predadores *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*. **Ciência Animal Brasileira**, 10(3): 887-892.

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

BUZATTI, A.; SANTOS, C.P.; VIEIRA, D.L.; MOLENTO, M.B. (2017). Nematoides gastrintestinais de equinos com ênfase no biocontrole por *Duddingtonia flagrans*. **Archives of Veterinary Science**, 22(4): 95-110.

CARVALHO, R. O.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. (2011). Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma* spp. infective larvae in dogs. **Veterinary Parasitology**, 176 (2-3): 236-239.

CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária). <http://www.cfmv.org.br/portal/noticia.php?cod=606>. Acesso em 17/01/2016. 17:21h

CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária no Brasil). **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Coletânea estudos gleba 39. 68p. Brasília: 2004.

COOKE, C.R. (1963) **Ecological characteristics of nematode-trapping fungi hyphomycetes. I Preliminary studies**. *Annals of Applied Biology*. 52: gr431-437.

DRECHSLER, C. (1937). Some hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. ***Mycologia***, 29: 447-552.

ESLAMI, A.; RANJBAR-BAHADORI, A. S.; ZARE, R.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2005). The predatory capability of *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. ***Veterinary Parasitology***, 130: 263–266.

GOMES, A.P.S.; RAMOS, M.L.; VASCONCELLOS, R.S.; JENSEN, J.R.; VIEIRA-BRESSAN, M.C.R.; ARAÚJO, J.V. (2000). *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***, 95(6): 873-876.

GRONVOLD J, HENRIKSEN SA, LARSEN M, NANSEN P, WOLSTRUP J. (1996). Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. ***Veterinary Parasitology***, 64: 47–64.

KAPLAN, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. ***Trends in Parasitology***, 20:477-481

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

MACIEL, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; LOPES, E.A.; FREITAS, L.G. (2009). Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by

nematophagous fungi in different conidial concentrations. **Veterinary Parasitology**, 161:239-247.

MENDOZA-DE-GIVES, P. 1999. **Interaction between Nematodes and Biocontrol Agents with Potential for Use in Biomanagement Systems**, PhD Thesis, University of Nottingham, England, 219 pp.

MOLENTO, M.B. (2005). Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, 35(6): 1469-1477.

MOLENTO, M.B.; VERÍSSIMO, C.J.; AMARANTE, A.T.; VAN WYK, J.A.; CHAGAS, A.C.S.; ARAÚJO, J.V.; BORGES, F.A. (2013). Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, 80(2): 253-263.

MOTA, M.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V. (2000). Atividade predatória dos fungos *Arthrobotrys conoides* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. **Ciência animal**, 10(1): 37-41.

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

NORDBRING-HERTZ, B. (2004). Morphogenesis in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* – an extensive plasticity of infection structures. **Micologist**, 18 (3): 125-133.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H.B.; TUNLID, A. (2006). **Nematophagous fungi**. Encyclopedia of life sciences

OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S; ALFENAS, A.C.; DIAS-ARIEIRA, C.R. (2002). Caracterização morfológica e isoenzimática de espécies de *Arthrobotrys* ocorridas no Brasil. **Nematologia brasileira**, 26(2): 181-197

OGBOURNE, C.P. (1978) **.Pathogenesis of cyathostome (Trichonema) infection of the horse. A review**. Commonwealth Agricultural Bureaux. Farnham Royal Slough. Miscellaneous publication no 5.

SANGSTER, N.C. (1999). Anthelmintic resistance: past, present and future. **International Journal for Parasitology**, 29:115-124.

SAXENA, G.; MITTAL, T. (1995). Trap formation by conidia of nematode trapping *Monacrosporium thaumasium* spp. **Mycological Research**, 7: 839–840.

SILVEIRA, W.F.; BRAGA, F.R.; SANTOS, L.F.; DOMINGUES, R.R.; AGUIAR, FERRAZ, C.M.; CARVALHO, L.M.; AYUPE, T.H.; ZANUNCIO, J.C.; ARAÚJO, J.V. (2017). Nematophagous fungi combinations reduce free-living stages of sheep gastrointestinal nematodes in the field. **Journal of Invertebrate Pathology**, 150: 1-5.

SILVEIRA, W.F.; OLIVEIRA, G.D.; BRAGA, F.R.; CARVALHO, L.M.; DOMINGUES, R.R.; SILVA, L.A.; ZANUNCIO, J.C.; ARAÚJO, J.V. (2017). Predation rate of nematophagous fungi after passing through the gastrointestinal tract of goats. **Small Ruminant Research**, 147: 101-105.

SINDAN.<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>. Acesso em 17/01/2016, 16:36h.

TAVASSOLI, M.; DALIR-NAGHADEH, B.; ESMAEILI-SANI, S. (2010). Prevalence of gastrointestinal parasites in working horses. **Journal of Veterinary Sciences**, 13 (2): 319-324.

VON OORCHOT, C.A.N. (1985). Taxonomy of the Dactylaria complex. V. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. **Studies in Mycology**, 26:61-96.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* no controle de larvas infectantes (L3) de nematoides estrongilídeos que acometem equinos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar a atividade predatória do fungo *Arthrobotrys musiformis* sobre L3 de estrongilídeos, em condições laboratoriais

3.2.2. Avaliar a atividade predatória do fungo *A. musiformis* sobre L3 de estrongilídeos, após passagem pelo trato gastrintestinal de equinos, em péletes a base de alginato de sódio

3.2.3. Avaliar a ação de diferentes doses de conídios do fungo *A. musiformis* na redução de L3 de estrongilídeos em fezes de equinos

4. HIPÓTESES

- 4.1. O fungo *Arthrobotrys musiformis* será capaz de predação as larvas infectantes de estrogilídeos em condições laboratoriais.
- 4.2. O fungo *A. musiformis* manterá sua capacidade predatória após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos.
- 4.3. Diferentes doses de conídios de *A. musiformis* terão distintas eficácias na redução de larvas de estrogilídeos.

5. Capítulo 1

Fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* como controlador biológico de larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos

Resumo

A grande variedade de gêneros de nematoides que infectam equinos já apresenta resistência às bases químicas antiparasitárias disponíveis na atualidade e esse fato reforça a necessidade de implementação de métodos alternativos para o controle desses parasitos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* sobre larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos, antes e após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos. No primeiro, foi analisado a ação do fungo *A. musiformis* sobre as L3 em placas. Após sete dias de interação, foi observado um percentual de 96.61% de redução das larvas por ação do fungo. No segundo experimento, foi avaliado a capacidade do *A. musiformis* de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal de equinos sem perda da viabilidade em predação L3. O micélio do fungo foi incorporado à uma matriz de alginato de sódio para a produção de péletes, os quais foram fornecidos via oral para os animais. Foram recuperados péletes nas fezes dos animais até 72 horas após a administração aos animais, os quais foram colocados em placas contendo meio ágar-água 2%, para avaliar o crescimento do fungo a partir dos péletes. O fungo foi capaz de manter sua viabilidade e sua capacidade de predação das L3 não foi alterada, o que demonstrou o potencial do isolado A144 do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* de ser utilizado como controlador biológico de L3 de ciatostomíneos.

Palavras-chave: nematóides, fungo nematófago, péletes

1. Introdução

Nos equinos, a grande variedade de gêneros de parasitos que infectam esses animais já apresenta resistência às bases atualmente disponíveis comercialmente (MOLENTO, et al., 2009).

Com relação aos ciatostomíneos (Nematoda, Strongylida), a necessidade de implementação de métodos alternativos para o controle desses parasitos já havia sido destacada (Bjørn et al., 1991) e a ineficácia de bases das três maiores classes de antiparasitários utilizadas (benzimidazóis, tetraidropirimidinas e avermectinas) vem sendo relatada em muitos países (KAPLAN et al. 2004; TRAVERSA et al., 2012; CANEVER, et al. 2013; PEREGRINE et al. 2014).

O uso de estratégias para o controle parasitário que reduzam a necessidade de terapêutica por bases químicas é indispensável para se reduzir a pressão de seleção à resistência nas populações de parasitos (SANGSTER, 1999). Assim, boas práticas de manejo bem como o desenvolvimento de métodos alternativos de controle de parasitos são imprescindíveis (MOLENTO, 2005; PAYNE et al., 2013).

Dentre as formas de controle alternativo das parasitoses dos animais domésticos, os fungos nematófagos destacam-se pelos resultados apresentados em trabalhos realizados por todo o mundo (MENDOZA DE GIVES, 1999; PAZ-SILVA et al., 2011; BRAGA & ARAÚJO, 2014; HERNÁNDEZ et al., 2016). Esses organismos são potenciais componentes de programas estratégicos de controle integrado, os quais seriam utilizados

em conjunto com outras práticas, como o manejo das pastagens e a alternância das bases químicas utilizadas (FERNÁNDEZ et al., 1997; BRAGA E ARAÚJO, 2014).

Em função da grande variedade de gêneros e espécies de fungos com capacidade de destruir ovos e/ou predação de larvas de nematoides, faz-se importante avaliar a ação desses organismos em diferentes condições de interação e desafios relacionados tanto a fatores bióticos quanto abióticos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho, foi avaliar a ação do fungo predador *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) sobre larvas infectantes de ciatostomíneos, a sua capacidade de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal de equinos, mantendo sua viabilidade, e avaliar a influência da dose inicial de conídios na destruição de larvas infectantes de ciatostomíneos.

2. Material e métodos

2.1 Fungos e péletes contendo micélio

O isolado A144, do fungo *A. musiformis*, foi recuperado de tubos de ensaio contendo meio Corn Meal Agar a 2% (CMA 2%), os quais são mantidos em geladeira, a 2°C, no escuro, no laboratório de parasitologia veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Discos de cultura de cerca de 5mm de diâmetro foram retirados dos tubos e transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm, contendo aproximadamente 20mL de meio de cultivo Batata Dextrose Agar a 4% (BDA 4%), para verificação da pureza da colônia fúngica. Em seguida, o isolado foi transferido para placas de Petri de 90 x15 mm contendo aproximadamente 20 mL do meio Ágar-Água a 2% (AA 2%) e

mantidos em estufa BOD, no escuro, a temperatura de 26°C, por dez dias, para crescimento.

Para a produção de micélio fúngico, discos de cultura (cerca de 5 mm de diâmetro) do isolado testado foram transferidos para frascos de 250 mL de Erlenmeyer com 150 mL de meio líquido GPY (glucose, petona de soja e extrato de levedura), e incubados sob agitação de 120 g em escuro a 26°C, durante 10 dias. A seguir, o conteúdo de cada frasco foi filtrado, para recuperação do micélio fúngico e posterior produção dos péletes, utilizando alginato de sódio, de acordo com a técnica descrita de Walker e Connick (1983).

2.2 Larvas de ciatostomíneos

Para a obtenção de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos, foram coletadas fezes de equinos adultos, diretamente da ampola retal. Esses animais são provenientes do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. O material foi submetido à contagem de ovos por gramas de fezes (OPG), pela técnica descrita por Gordon e Whitlock (1939), modificada por Lima (1989), e então foram realizadas cultura de fezes, as quais foram incubadas a 25°C, por 14 dias. Ao final deste período, foi realizado o método de Baermann (Ueno e Gonçalves, 1998), para recuperação das larvas eclodidas. Para remover detritos, as L3 foram limpas utilizando lenço de papel para laboratório (Kimwipes® disposable wipers, Sigma-Aldrich) acoplado a tubos de ensaio, invertidos em cálice, contendo água à 42°C, adaptando a metodologia descrita por Barçante et al. (2003). Após duas

horas, as L3 limpas e viáveis foram recuperadas do fundo do cálice, com auxílio de uma pipeta de plástico.

2.3 Capacidade de sobrevivência e manutenção da atividade predatória do fungo *A. musiformis* após passagem pelo trato gastrointestinal de equinos

Dez éguas da raça Bretã, com idade média de 24 meses, peso corporal médio de 270kg, foram vermifugadas com ivermectina e praziquantel por via oral (Iver Gel Composto, Ourofino®, Brasil) antes da administração dos fungos. Quinze dias após o tratamento com o anti-helmíntico, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (tratado e controle), com 5 animais cada. No grupo tratado, os animais receberam dose única de 100 gramas de péletes à base de alginato de sódio contendo micélio fúngico do isolado A144, com umidade padronizada em 30%, em dose única. No grupo controle, os animais receberam péletes sem micélio fúngico.

Foram realizadas coletas de fezes, direto da ampola retal dos animais, nos horários de 12h, 24h, 36h, 48h, e 72h após a administração das doses experimentais, para avaliar a recuperação de péletes nas fezes.

Os péletes recuperados foram colocados no centro de placas de Petri de 55 x 15 mm contendo aproximadamente 10mL de AA 2%, para avaliar o crescimento do fungo a partir desses, sendo doze réplicas por horário. Nas placas contendo os péletes recuperados após 72h da administração aos animais, foram adicionadas 1000 L3 de ciatostomíneos, para avaliar a manutenção da capacidade de predação do isolado após passagem pelo trato gastrointestinal dos animais.

2.4 Ação *in vitro* do fungo *Arthrobotrys musiformis* sobre L3 de ciatostomíneos

O ensaio experimental foi dividido em três grupos, com 12 repetições cada, sendo dois grupos tratados e um grupo controle. Um grupo tratado foi formado com placas de Petri de 55 x 15 mm, contendo o isolado A144 crescido em meio AA 2% (aproximadamente 10 mL por placa), a partir de repiques de tubos mantidos em laboratório. O outro grupo tratado foi formado por placas de Petri com o isolado A144 crescido a partir de péletes recuperados nas fezes dos animais, no último horário de coleta (72h) do teste de passagem. Os grupos controle consistiram de 12 placas cada, contendo apenas o meio AA 2%. Em cada placa, o repique inicial foi retirado e foram adicionados 180µL de solução aquosa contendo 1000 larvas de terceiro estágio (L3) de ciatostomíneos. Em seguida, as placas foram seladas com Parafilm M® e colocadas em estufa BOD, a 26°C, no escuro.

Durante o período de incubação, foram realizadas leituras diárias das placas, para a observação da formação de armadilhas e predação de larvas pelo fungo. Para isso, campos aleatórios em cada placa foram avaliados com auxílio de microscópio de luz, na objetiva de 10x. Ao final do período de sete dias, o material contido nas placas foi utilizado para a recuperação das larvas não predadas, pelo método de Baermann, e posterior quantificação.

2.5 Análises estatísticas

Os percentuais de redução de larvas nas placas dos grupos tratados em relação aos controles nos foram feitos por meio da seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{\text{média de L3 recuperadas no controle} - \text{média de L3 recuperadas no tratado}}{\text{Média de L3 recuperadas no controle}} \times 100$$

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homocedasticidade e, posteriormente, à análise de variância. As médias das variáveis foram comparadas utilizando o teste de Tukey, adotando-se os níveis de 1% e 5% de probabilidade (SAEG, 1999).

3. Resultados

A média de larvas recuperadas ao final de 7 dias de interação com o fungo está apresentada na figura 1. Foi obtido um percentual de redução de 96.61% das larvas do grupo tratado em relação ao controle. O fungo *A. musiformis* foi capaz de predação as L3 de ciatostomíneos. Nas primeiras 24h de interação, já foi observada a presença de armadilhas formadas pelo fungo nas placas e as primeiras L3 sendo capturadas (Figura 3).

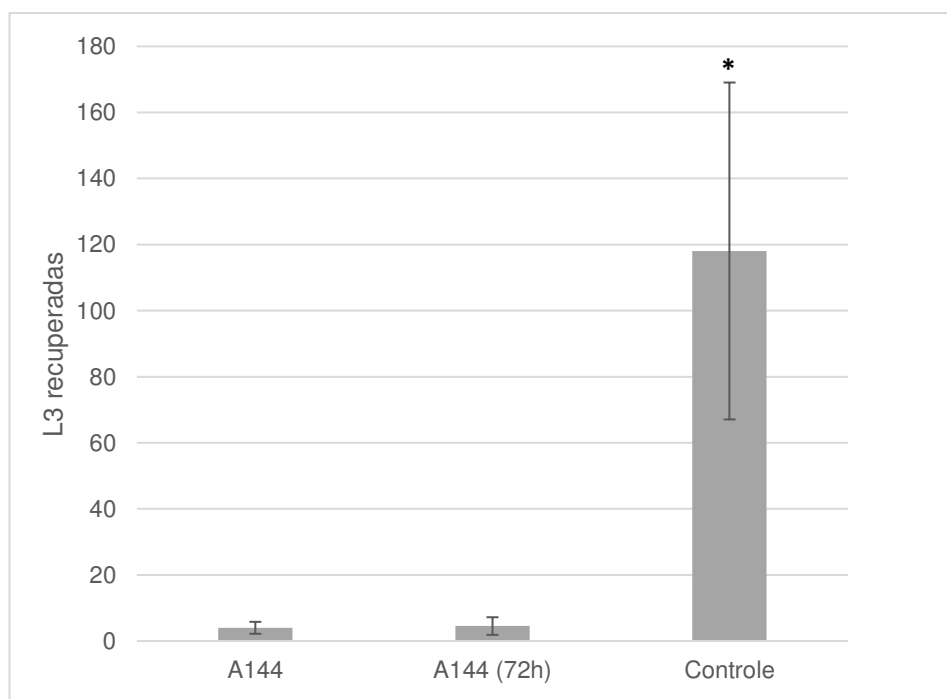


Figura 1: Médias e desvios-padrão (I) do número de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos não predadas ao final de sete dias de interação com o fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144), recuperadas pelo método de

Baermann-Moraes. O asterisco (*) indica diferença estatística ($p < 0.01$) dos grupos tratados em comparação ao grupo controle, demonstrado pelo teste de Tukey.

A144: fungo crescido a partir de tubos mantidos em laboratório.

A144 (72h): fungo crescido a partir de péletes de alginato de sódio contendo o isolado A144 e recuperados de fezes de equinos 72 horas após a ingestão desses pelos animais.

Controle: 1000 L3 de ciatostomíneos em placas contendo ágar-ágar, sem presença de fungos.

Na avaliação da capacidade de sobrevivência e manutenção da viabilidade do fungo após passagem pelo trato gastrointestinal de equinos, foram recuperados péletes nas fezes dos animais em todos os horários de coleta. Foi observado o crescimento do fungo em todas as placas contendo os péletes recuperados. Com relação à avaliação da capacidade predatória do *A. musiformis* recuperado de péletes coletados após 72h da administração aos animais, foi observado que o fungo manteve sua capacidade de predação de larvas de ciatostomíneos. A média de larvas recuperadas após sete dias de interação com o fungo está representada na figura 1. Para este grupo experimental, o percentual de redução de larvas foi de 96.18%.

4. Discussão

O uso de fungos nematófagos como controladores biológicos de formas infectantes (ovos ou larvas) de parasitos de interesse veterinário tem se destacado entre as formas alternativas de controle. Essa metodologia apresenta a vantagem de reduzir a carga parasitária ambiental (reduzindo, assim, a ocorrência de reinfecções nos animais), sendo uma alternativa interessante do ponto de vista veterinário, pois reduz a frequência da necessidade do controle químico, além de ser melhor sob o ponto de vista ambiental, uma vez que não lança resíduos químicos no meio ambiente.

Com relação à atividade predatória *in vitro* da espécie *A. musiformis* sobre nematoides da superfamília Strongyloidea, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os resultados obtidos por Graminha et al. (2001), que observaram uma redução de 94.44% de larvas de *Haemochus contortus*, após um período de sete dias de interação.

Fungos do gênero *Arthrobotrys* tem sido utilizados no controle biológico dos nematoides de animais ao longo dos últimos anos, apresentando resultados que credenciam esses organismos como uma alternativa viável e eficaz. Avaliando a interação do fungo *A. robusta* com larvas de ciatostomíneos, em condições laboratoriais, Braga et al. (2009) relataram uma redução de 85% dessas, após um período de 5 dias de interação.

Os ciatostomíneos apresentam uma grande importância nas criações de equinos por serem frequentes as infecções por parasitos deste amplo grupo de nematoides. Os prejuízos causados à saúde dos animais são notórios, principalmente em casos de infecções por altas cargas parasitárias (CANEVER et al. 2013). Os relatos de redução da eficácia dos antiparasitários contra os ciatostomíneos vêm reforçando a necessidade de pesquisas por alternativas de controle que possam auxiliar o controle químico tradicional.

Os fungos nematófagos tem sido amplamente estudados para o controle das parasitoses dos animais domésticos. Com relação aos ciatostomíneos, os fungos *Monacrosporium thaumasium*, *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Pochonia clamydosporia* já demonstraram sua capacidade de destruição de ovos e predação de larvas infectantes em

condições laboratoriais e à campo (TAVELA 2010; BRAGA 2011; PAZ-SILVA et al. 2011; TAVELA 2013).

Graminha et al. (2005) avaliaram a capacidade das espécies *A. musiformis* e *A. conoides* de resistirem à passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos pela administração conídios em solução aquosa e conídios encapsulados em alginato de sódio e farinha de aveia e demonstraram a recuperação da primeira espécie nos intervalos de 12, 16 e 20h após a administração, além da manutenção da capacidade de predação de nematóides. O mesmo não ocorreu para o *A. conoides*.

Em comparação com outros fungos nematófagos, o isolado da espécie *A. musiformis*, utilizado no presente trabalho, apresentou percentual de destruição de larvas de ciatostomíneos semelhante ao *D. flagrans* (97.5%), e superior ao percentual de redução apresentados pelas espécies *A. robusta* (85%) e *M. thaumasium* (72.5%) (BRAGA et al., 2009). Essa diferença pode indicar uma maior adaptação das espécies *A. musiformis* e *D. flagrans* na predação das larvas desses parasitos. Os resultados apresentados pelo fungo *A. musiformis* abrem uma nova possibilidade de controle biológico em criações de equinos. A manutenção da atividade do fungo após a passagem pelo organismo dos animais (sem prejuízos à sua capacidade predatória) é mais um fator a ser destacado sobre essa espécie fúngica.

Conclusão

O fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* é capaz de predação de larvas infectantes de ciatostomíneos, além de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal de cavalos. Essas características fazem dessa espécie fúngica

um potencial organismo a ser utilizado como controlador biológico, sendo um controle alternativo das parasitoses de equinos.

Referencias

BARÇANTE, J.; BARÇANTE, T.; DIAS, S.; VIEIRA, L.; LIMA, W.; NEGRÃO-CORRÊA, D. (2003). A method to obtain axenic *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae from dog feces. **Parasitology Research**, 89(2): 89-93.

BJØRN, H.; SOMMER, C.; SCHOUGARD, H.; HENRIKSEN, S.A.; NASEN, P. (1991). Resistance to benzimidazole anthelmintics in small strongyles (Cyathostominae) of horses in Denmark. **Acta veterinaria Scandinavica**, 32: 253-260.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; CAMPOS, A.K. (2009). Controle in vitro de larvas infectantes de ciatostomíneos (nematoda: cyathostominae) de equinos utilizando os fungos predadores *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*. **Ciência Animal Brasileira**, 10(3): 887-892.

BRAGA, F.R. (2011). **Controle biológico das nematodioses intestinais de equinos por fungos nematófagos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 124p.(Tese, doutorado)

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

CANEVER, R.J.; BRAGA, P.R.C.; BOECKH, A.; GRUCAJUCK, M.; BIER, D.; MOLENTO, M.B. (2013). Lack of *Cyathostomin* sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 194: 35-39.

FERNÁNDEZ, A.S.; LARSEN M.; NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. (1997). Effect of the nematode trapping

fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. **Veterinary Parasitology**, 73: 257-266.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research**, 12:50-52.

GRAMINHA, E.B.N.; MAIA, A.S.; SANTOS, T.M.; CÂNDIDO, R.C.; SILVA, G.S.; COSTA, A.J. (2001) Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematoides parasitos de animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**. 22(1): 11-16.

GRAMINHA, E.B.N.; COSTA, A.J.; OLIVEIRA, G.P.; MONTEIRO, A.C.; PALMEIRA, S.B.S. (2005) Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: *in vitro* activity and after passage through the gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. 21: 717-722

HERNÁNDEZ, J.A.; ARROYO, F.L.; SUÁREZ, J.; CAZAPAL-MONTEIRO, C.F.; ROMASANTA, A.; LÓPEZ-ARELLANO, M.E.; PEDREIRA, J.; MADEIRA DE CARVALHO, L.M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; ARIAS, M.S.; MENDOZA-DE GIVES, P.; PAZ-SILVA, A. (2016). Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. **Veterinary Parasitology**, 229: 37-44.

KAPLAN, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, 20:477-481.

LIMA, W.S. 1989. **Dinâmica das populações de parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG. Brasil**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG,178p. (Tese, doutorado).

MACIEL, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; LOPES, E.A.; FREITAS, L.G. (2009). Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. **Veterinary Parasitology**, 161:239-247.

MENDOZA-DE GIVES, P. (1999) **Interaction between nematodes and bio-control agentes with potential for use in bio-management systems**. PhD Thesis. Faculty of life Sciences. University of Nottingham, Nottingham, UK. 219p.

MOLENTO, M. B. (2005). Resistencia parasitária em helmintos de equídeos e proposta de manejo. **Ciência Rural**, 35 (6): 1469-1477.

MOLENTO, M.B., Antunes, J., Bentes, R.N., Coles, G.C. (2008). Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. **Veterinary Record**, 162: 384–385.

MOLENTO, M.B.; Nielsen, M.K.; Kaplan, R.M. (2012). Resistance to avermectin/milbemycin in equine Cyathostomins – Current situation. **Veterinary Parasitology**, 185: 16-24.

PAZ-SILVA, A.; FRANCISCO, I.; VALERO-CROSS, R.O.; CORTIÑAS, F.J.; SÁNCHEZ, J.A.; FRANCISCO, R.; ARIAS, M. SUAREZ, J.L.; LOPEZ-ARELLANO, M.E.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MENDOZA-DE-GIVES, P. (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydozoospores. **Veterinary Parasitology**, 179:277-282.

PEREGRINE, A.S.; MOLENTO, M.B.; KAPLAN, R.M.; NIELSEN, M.K. (2014). Anthelmintic resistance in importante parasites of horses: Does it really matter? **Veterinary Parasitology**, 201:1-8.

PAYNE, S.E.; KOTZ, A.C.; DURMIC, Z.; VERCOE, V.E. (2013). Australian plants show anthelmintic activity toward equine cyathostomins *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, 196: 153-160.

SAEG (1999) **Sistema de Análise Estatística e Genética, UFV, Central de Processamento de Dados**, Viçosa-MG.

SANGSTER, N. C. (1999). Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? **Veterinary Parasitology**, 85: 189-204.

TAVELA, A.O. (2010). **Controle biológico de ciatostomíneos de equinos resistentes a ivermectina e pamoato de pirantel com o fungo *Monacrosporium thaumasium***. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 42p. (Dissertação, mestrado).

TAVELA, A.O. (2013). **Avaliação da eficácia *in vitro* e *in vivo* dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Pochonia chlamydosporia* sobre larvas infectantes de ciatostomídeos e trichostrongilídeos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa (UFV), 70p. (tese, doutorado).

TRAVERSA, D.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., DEMELER, J., MILILO, P., SCHÜRMAN, M., BARNES, S., OTRANTO, H., PERRUCCI, D., REGALBONO, S., BERALDO, A.F., BOECKH, P., COBB, A.R. (2009). Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. **Parasites & Vectors**, 2 (Suppl. 2), S2.

TRAVERSA, D.; CASTAGNA, G.; SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.V.; MELONI, S.; BARTOLINI, R.; GEURDEN, T.; PEARCE, M.C.; WORINGER, E.; BESOGNET, B.; MILILLO, P.; D'ESPOIS, M. (2012). Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. **Veterinary Parasitology**, 188: 294-300.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. (1998). **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 4.ed. JICA, 166p.

WALKER, H.L.; CONNICK, W.J. (1983). Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. **Weed Science**, 31:333-338.

Capítulo 2

Avaliação da influência da dose de esporos do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* na redução de larvas infectantes de estrongilídeos em fezes de equinos

Resumo

Foram avaliadas as taxas de redução de larvas infectantes (L3) de nematoides estrongilídeos em fezes de equinos que receberam diferentes concentrações de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144). Dois testes foram realizados, sendo que no primeiro, cinco concentrações diferentes de conídios/grama de fezes foram testadas, sendo elas: 100/g (T1), 1000/g (T2), 2000/g (T3), 10.000/g (T4) e 15.000/g (T5). Os conídios foram misturados a fezes de equinos com valor médio de ovos por grama de fezes (OPG) de 6400, adicionados à recipientes plásticos e mantidos em temperatura ambiente, protegidas da luz solar, por 15 dias. Ao final desse período as larvas não predadas que permaneceram no material foram recuperadas. Todas as concentrações testadas apresentaram diferença estatística quando comparadas ao grupo controle (sem adição de esporos). Quando comparados os cinco grupos tratados, apenas o T1 diferiu estatisticamente dos demais, apresentando uma taxa de redução das L3 menor. No segundo teste, bolos fecais de 250 gramas, com OPG médio de 1500 receberam três diferentes dosagens de conídios do isolado A144: 2.5×10^4 , 1.25×10^5 e 2.5×10^5 . Os bolos fecais foram depositados e mantidos por 15 dias em um piquete de Tifton 85 (*Cynodon* spp.). Ao final desse período, o material foi recolhido, e realizou-se a técnica de Baermann-Moraes para recuperar as larvas ainda viáveis. Foi observado que todas as três

concentrações testadas foram capazes de reduzir as larvas presentes nas fezes e diferiram estatisticamente do grupo controle. Contudo, não houve diferença estatística entre os grupos tratados. Esses resultados indicam que esporos do fungo *A. musiformis* apresentam potencial para serem empregados no controle das formas de vida livre do principal grupo de nematóides parasitos de equinos.

Palavras-chave: conídios, nematoides, controle biológico.

1. Introdução

Nematoides estrombilídeos apresentam grande importância na criação de equídeos em todo o mundo, em função de serem os parasitos mais comumente encontrados infectando esses animais (Couto et al., 2009). A ampla distribuição desse vasto grupo de nematoides se deve a diversos fatores, dentre os quais pode-se destacar erros nas estratégias de controle parasitário, manejo incorreto dos animais e a falta de critério na administração de anti-helmínticos, o que acelerou o processo de resistência dos parasitos às bases utilizadas (KAPLAN 2002, MOLENTO, 2005).

Dentre as opções de controle alternativo das parasitoses animais, os fungos nematófagos são organismos amplamente estudados, sendo os gêneros *Duddingtonia*, *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* bem caracterizados quanto à capacidade de predarem larvas infectantes de nematoides (BRAGA & ARAÚJO, 2014).

Arthrobotrys musiformis é um fungo saprófita com potencial para ser empregado como controlador biológico de nematóides parasitos de animais,

atuando sobre as formas de vida livre desses. Esta espécie já demonstrou atividade contra larvas infectantes (L3) de trichostrongilídeos parasitos de ovinos e também contra L3 de *Ancylostoma* spp. parasitos de cães, além dos produtos extracelulares com potencial proteolítico (GRAMINHA et al., 2001, MACIEL et al., 2009, ACEVEDO-RAMIREZ, et al., 2015; CAI et al., 2017)

Dentre as formas de utilização dos fungos nematófagos para o controle biológico de nematoides, o uso dos esporos (conídios e/ou clamidósporos) é uma alternativa para ser administrada por via oral aos animais, e a dose necessária, assim como as vias de incorporação dessas estruturas fúngicas para o fornecimento através da alimentação, tem sido alvo de estudos (CASILLAS-AGUIAR, et al., 2008; ARROYO et al., 2016; AGUILAR-MARCELINO et al., 2016).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da adição de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) em fezes de equinos naturalmente parasitados por nematoides da superfamília Strongyloidea

2. Material e métodos

2.1 Fungo

O isolado A144, do fungo *A. musiformis*, foi recuperado de tubos de ensaio contendo meio Corn Meal Agar a 2% (CMA 2%), os quais eram mantidos em geladeira, a 2°C, no escuro, no laboratório de parasitologia veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Discos de cultura de cerca de 5mm de diâmetro foram retirados dos tubos e transferidos para placas de Petri de 90 x 15 mm, contendo aproximadamente 20mL de meio de cultivo Batata

Dextrose Ágar a 4% (BDA 4%), para verificação da pureza da colônia fúngica. Em seguida, o isolado foi transferido para placas de Petri de 90 x15 mm contendo aproximadamente 20 mL do meio Agar-Água a 2% (AA 2%) e mantidos em estufa BOD, no escuro, a temperatura de 26°C, por dez dias, para crescimento.

2.2 Conídios

Um repique de cerca de 9 mm de placas de petri contendo ágar-ágar com o isolado fúngico previamente crescido foi transferido para o centro de placas de petri de 150 x 20mm, contendo aproximadamente 30 mL do meio YPSSA (extrato de levedura, amido solúvel, ágar) (DIAS & FERRAZ, 1993). As placas foram lacradas com parafilm®, e colocadas em estufas BOD, à temperatura de 26°C, no escuro. Após 14 dias, a superfície das placas foi raspada com auxílio de uma espátula, e o material obtido foi diluído em água destilada e filtrado em gaze quatro malhas. Alíquotas foram feitas para estimar o número de conídios por mL da solução obtida.

2.3 Fezes de equinos

Fezes de equinos adultos foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, seguindo todos os procedimentos éticos preconizados para a utilização de animais em experimentação. Esses animais são provenientes do setor de equideocultura da Universidade Federal de Viçosa. O material foi submetido à contagem de ovos por gramas de fezes (OPG) em câmara de McMaster, de acordo com metodologia descrita por Gordon e Withlock (1939), modificada por Lima (1989).

2.4 Análise da influência da concentração de conídios no percentual de redução de larvas em placas de Petri

Foram formados quatro grupos experimentais, em placas de Petri de 55 x 15 mm, contendo aproximadamente 10mL de AA 2%, sendo três grupos tratados (contendo conídios do isolado A144) e um grupo controle (sem fungo). Os grupos tratados foram divididos em: C1 (500 L3 de ciatostomíneos + 1000 conídios), C10 (500 L3 de ciatostomíneos + 10.000 conídios) e C30 (500 L3 de ciatostomíneos + 30.000 conídios). O grupo controle consistiu em apenas 500 L3 depositadas por placa. Para cada grupo experimental, foram feitas 12 réplicas e as placas foram incubadas em estufa BOD, a 26°C e no escuro.

Nos três primeiros dias de incubação foram realizadas leituras diárias de 10 campos por placa, utilizando microscópio de luz (Zeiss, Germany), objetiva de 10x. Para as leituras, inicialmente eram determinadas as regiões onde se observava a presença tanto de larvas quanto de estruturas fúngicas, e a partir dessas regiões, 10 campos aleatórios eram observados para quantificar as larvas presas em armadilhas do fungo *A. musiformis*.

Do quarto ao sexto dia de incubação, foram realizadas leituras diárias nas mesmas condições descritas acima, contudo, foi realizada a quantificação das larvas ainda viáveis. Foram consideradas viáveis, as larvas que apresentavam motilidade e não estavam presas a armadilhas fúngicas.

2.5 Ação de diferentes concentrações de conídios de *A. musiformis* em coproculturas

Para avaliar a ação dos conídios do isolado A144 sobre larvas infectantes (L3) de estrogilídeos, foi feito um *pool* das fezes, e, então, realizou-se a avaliação do OPG da amostra, fazendo 5 repetições, o que resultou em valor médio de 6400 ovos por grama de fezes. As fezes foram, então, divididas e alíquotas de 20g, e colocadas, juntamente com 10g de vermiculita, em copos plásticos. Foram montados 6 grupos experimentais, com 12 repetições cada, sendo cinco grupos tratados, contendo proporções crescentes de conídios por grama de fezes (TC1= 100 conídios/grama de fezes, TC2= 1000 conídios/grama de fezes, TC3= 2000 conídios/grama de fezes, TC4= 10.000 conídios/grama de fezes e TC5= 15.000 conídios/grama de fezes) e um grupo controle (sem adição de conídios). Para se adicionar a quantidade de conídios necessária para o grupo T5, 15 ml da solução aquosa contendo os esporos foi adicionada por amostra. Dessa forma, para evitar possível influência da diferença de umidade, água destilada foi adicionada nos demais grupos, a fim de que todas as amostras recebessem um volume final de 15ml de líquido. Após a homogeneização do material, os copos foram parcialmente fechados com papel alumínio e em seguida, foram deixados em temperatura ambiente por 14 dias. Após o período de incubação, foi realizado o método de Baermann-Moraes para recuperação e posterior quantificação das larvas ainda viáveis.

2.6 Ação de conídios em fezes depositadas em pastagem

Para avaliar a ação dos conídios de *A. musiformis* em condições naturais, foi feito um *pool* homogêneo das fezes de equinos, com valor médio de 1500 ovos por grama de fezes. As fezes foram divididas em 48 amostras de 250 gramas, e foram depositadas em um piquete de Tifton 85 (*Cynodon*

spp.), com área aproximada de 12m², o qual foi cultivado exclusivamente para este ensaio experimental, não havendo histórico de pastejo no mesmo. A altura da pastagem no piquete foi padronizada em 20 cm, no início do experimento, o qual foi conduzido durante o mês de julho de 2017. Foram formadas 16 fileiras, com três amostras cada, e com distância de 60 cm entre elas. A distância para as amostras da fileira seguinte também foi de 60 cm.

Foram formados quatro grupos experimentais, sendo três grupos tratados (TP1, TP2 e TP3), contendo diferentes doses iniciais de conídios e um grupo controle (sem deposição de conídios). A divisão dos grupos no piquete foi feita intercalando-se as fileiras dos quatro grupos experimentais no piquete, seguindo a orientação leste/oeste, de modo que todas as amostras recebessem a mesma incidência de luz solar durante o dia. Cada grupo teve quatro fileiras, com três amostras fecais cada. As doses de conídios depositadas nos grupos TP1, TP2 e TP3 foram 2.5×10^4 , 1.25×10^5 e 2.5×10^5 respectivamente. As fezes foram mantidas no piquete por 15 dias e, ao final deste período, foram recolhidas e levadas ao laboratório para recuperação das larvas eclodidas, através do método de Baermann-Moraes, e posterior quantificação. Após a recuperação das larvas, os volumes dos tubos foram padronizados para 2mL, três alíquotas de 100μL foram retiradas de cada tubo e as larvas foram quantificadas, com auxílio de microscópio de luz, na objetiva de 10x. As fezes foram completamente secas em estufa para possibilitar a quantificação de matéria seca e estimar o número de L3 por grama de fezes (LPG) dos quatro grupos.

2.7 Análises estatísticas

Os percentuais de redução de larvas dos grupos tratados em relação aos controles nos foram feitos por meio da seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{média de L3 recuperadas no controle} - \text{média de L3 recuperadas no tratado})}{\text{Média de L3 recuperadas no controle}} \times 100$$

As variáveis foram submetidas aos testes de normalidade e homocedasticidade e, posteriormente, à análise de variância. As médias das variáveis foram comparadas utilizando o teste de Tukey, adotando-se os níveis de 1% e 5% de probabilidade (SAEG, 1999).

3. Resultados

Com relação às diferentes concentrações de conídios, foi observado que o número de larvas predadas no primeiro dia de interação diferiu estatisticamente entre as 3 concentrações testadas nos grupos tratados. Entretanto, nos dias 2 e 3, quando comparados os grupos C10 e C30 não houve diferença estatística. As médias e desvios-padrão de larvas predadas nos três primeiros dias de interação estão apresentadas na tabela 1 e as médias e desvios-padrão das larvas não predadas do quarto ao sexto dia de incubação estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 1: Médias* e desvios-padrão (\pm) de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos predadas durante três dias de incubação com diferentes concentrações de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144)

Período de incubação	Tratamento			
	C1	C10	C30	Controle
1 dia	0.68 ^A \pm 0.94	1.46 ^B \pm 1.34	2.33 ^C \pm 1.32	0 ^D \pm 0
2 dias	2.42 ^A \pm 2.51	4.25 ^B \pm 2.64	4.8 ^B \pm 6,4	0 ^C \pm 0
3 dias	4.26 ^A \pm 3.35	5.55 ^B \pm 2.80	6.36 ^B \pm 4.54	0 ^C \pm 0

* medias das leituras de dez campos aleatórios por placa.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha demonstraram diferença estatística ($p < 0.01$) pelo teste de Tukey.

Número de L3/ número de conídios por placa nos grupos experimentais: C1= 500/1000; C10= 500/ 10.000; C30= 500/ 30.000; controle= 500 L3 sem adição de conídios.

Tabela 2: Médias* e desvios-padrão (\pm) de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos não predadas do quarto ao sexto dia de incubação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144).

Período de incubação	Tratamento			
	C1	C10	C30	Controle
4 dias	0.38 ^A \pm 1.35	0.26 ^A \pm 1.15	0.17 ^A \pm 0.66	3.81 ^B \pm 3.46
5 dias	0.19 ^A \pm 0.78	0.16 ^A \pm 0.61	0.13 ^A \pm 0.54	2.91 ^B \pm 2.71
6 dias	0.13 ^A \pm 0.48	0.06 ^A \pm 0.44	0.09 ^A \pm 0.40	3.77 ^B \pm 2.79

* medias das leituras de dez campos aleatórios por placa.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha demonstraram diferença estatística ($p < 0.01$) pelo teste de Tukey.

Número de L3/ número de conídios por placa nos grupos experimentais: C1= 500/1000; C10= 500/ 10.000; C30= 500/ 30.000; controle= 500 L3 sem adição de conídios.

Ao final de sete dias, não foi observada diferença estatística entre as médias de L3 recuperadas nas três concentrações de conídios testadas. Contudo, houve diferença estatística quando os grupos tratados foram comparados ao grupo controle (Figura 1). Os percentuais de redução foram: C1: 82,4%, C10: 95,4% e C30: 96,3%. A germinação dos conídios em placa, a formação de armadilhas e a captura de L3 estão apresentadas na figura 2.

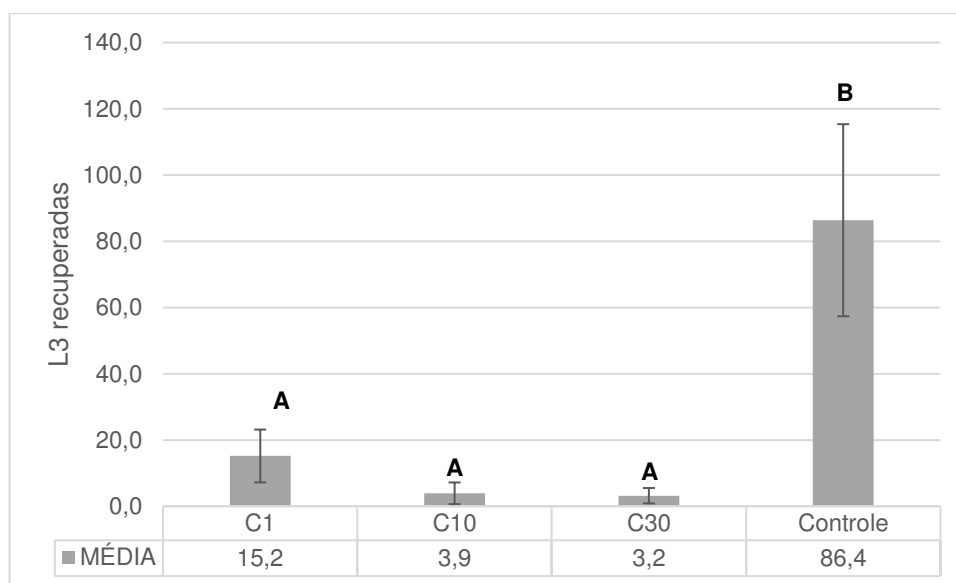


Figura 1: Médias e desvios-padrão (I) do número de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos não predadas ao final de 7 dias de interação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144), recuperadas pelo método de Baermann-Moraes. Letras diferentes demonstram diferença estatística ($p < 0.01$) os grupos tratados e o grupo controle, pelo teste de Tukey.

(Número de L3 de ciatostomíneos/ número de conídios de *A. musiformis* por grupo: C1= 500/1000; C10: 500/10.000; C30: 500/30.000; Controle: 500 L3 de ciatostomíneos, sem adição de conídios).

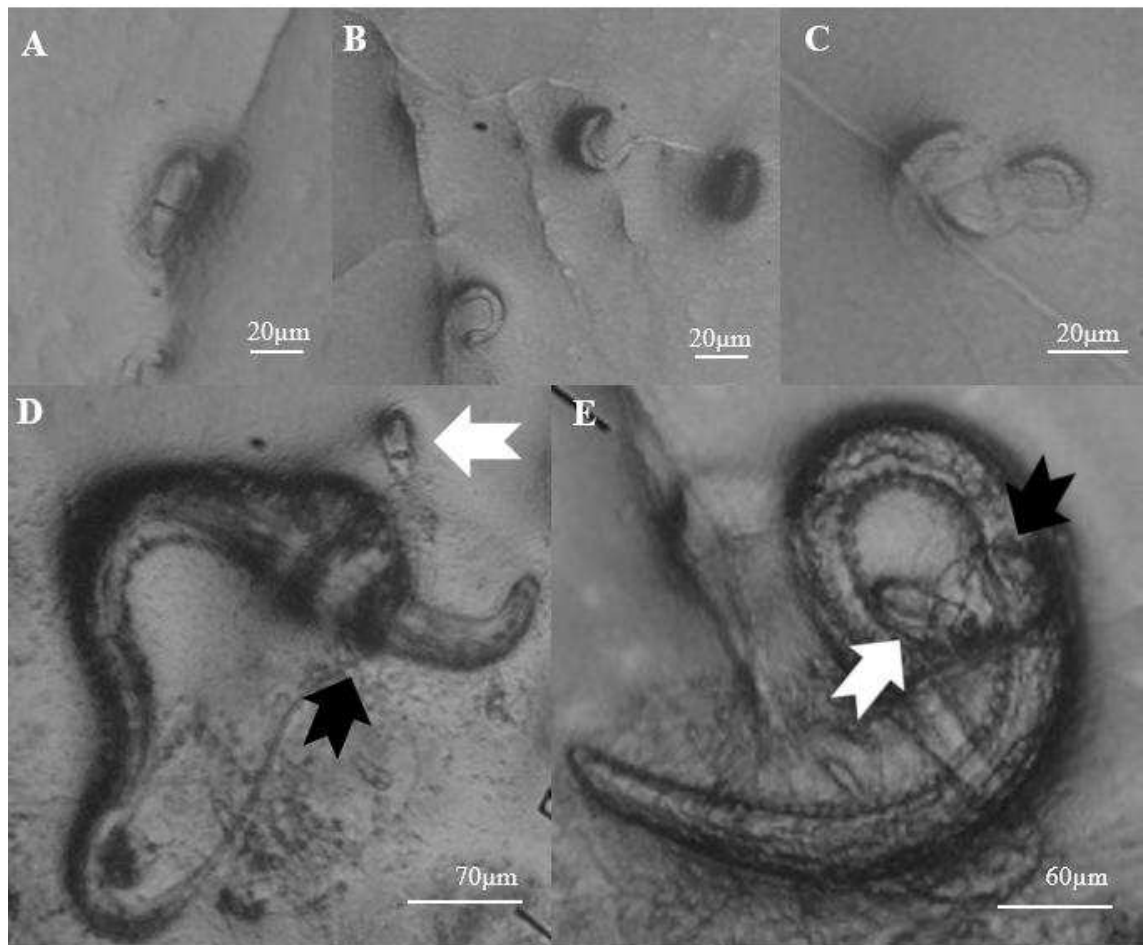


Figura 2: Estruturas do fungo *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) e sua interação com larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos. (A) Conídio germinando. (B-C) armadilhas do tipo rede adesiva tridimensional, formadas por diferenciação ao longo das hifas do fungo. (D-E) Larvas de ciatostomíneos capturadas pelas armadilhas do fungo *A. musiformis*. Setas pretas indicam armadilhas formadas para captura de larvas. Setas brancas indicam conídios do fungo.

As médias de larvas recuperadas das coproculturas adicionadas de conídios estão apresentadas na figura 3. A partir da concentração de 1000 conídios por grama de fezes (grupo TC2), não foi observada diferença no número de larvas recuperadas entre os grupos tratados. Todas as concentrações de conídios testadas apresentaram diferença estatística quando comparadas ao grupo controle. Os percentuais de redução por tratamento foram: TC1: 56,2%, TC2: 96,1%, TC3: 97,1%, TC4: 98% e TC5:

96,9%. A temperatura média e umidade no período experimental foram de 26°C (mínima 18°C e máxima 34°C) e 77%, respectivamente.

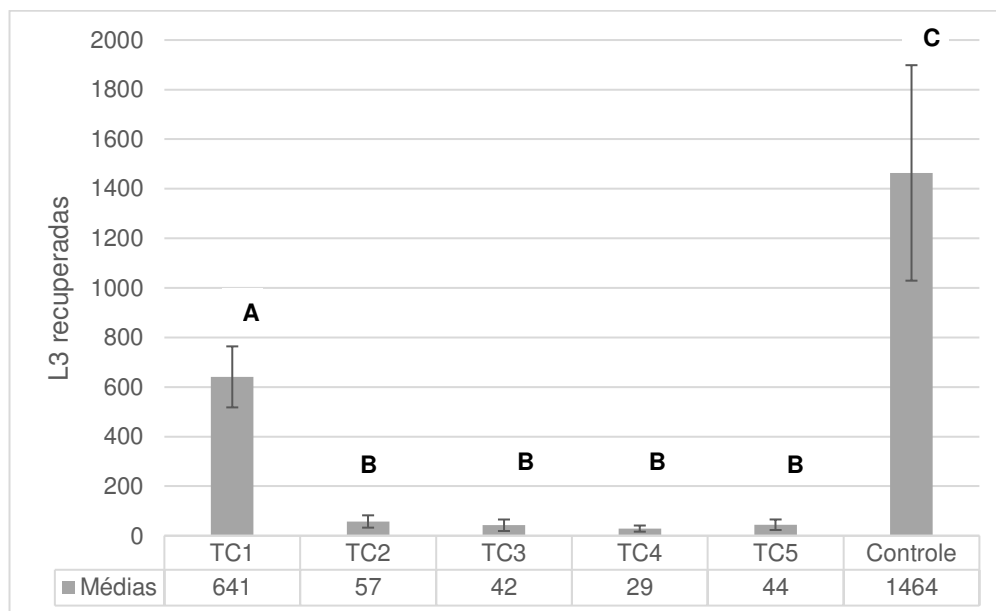


Figura 3: Médias* e desvios-padrão (I) de larvas infectantes (L3) de estrongilídeos parasitos de equinos, recuperadas de coproculturas pelo método de Baremann-Moares, após 15 dias de interação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis*. (Número de conídios por grama de fezes: TC1= 100/g; TC2= 1000/g; TC3= 2000/g; TC4= 10.000/g; TC5= 15.000/g; Controle= sem adição de conídios).

* Médias representadas por letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0.01$) pelo teste de Tukey

Os grupos tratados com conídios nas fezes depositadas no piquete não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre eles. Contudo, todos os grupos tratados diferiram estatisticamente quando comparados ao grupo controle. As médias das L3 recuperadas estão apresentadas na figura 4. O número de L3/g de matéria seca encontrado para os grupos TP1, TP2, TP3 e controle foram 27.4, 30.4, 16.5 e 143.2 L/g MS, respectivamente, e os percentuais de redução foram: TP1: 61,5%, TP2: 59,6%, TP3: 74,3%.

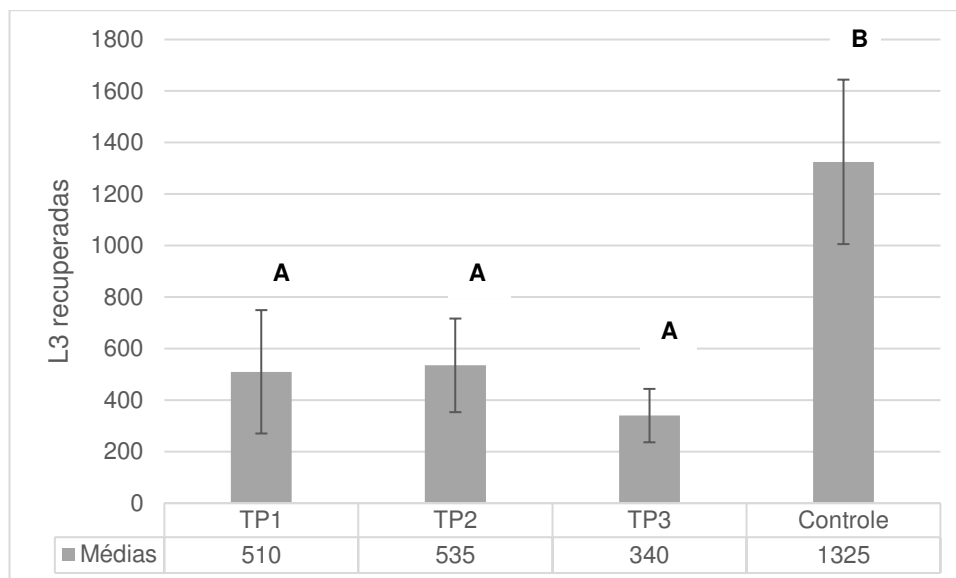


Figura 4: Médias* e desvios-padrão (I) de larvas infectantes (L3) de estrongilídeos parasitos de equinos recuperadas, pelo método de Baremann-Moares, de bolos fecais depositados em pastagem, após interação com diferentes doses de conídios do fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis*, durante um período de 15 dias. (Número de conídios por grama de fezes: TP1= 100/g; TP2= 500/g; TP3= 1000/g; Controle= sem adição de conídios).

* Médias representadas por letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0.01$) pelo teste de Tukey.

4. Discussão

A proposta da utilização de fungos nematófagos como controladores biológicos das formas de vida livre dos nematoides de interesse veterinário é reforçada pela necessidade de alternativas para o controle parasitário, as quais possam ser associadas ao controle convencional e, dessa forma, desacelerar o processo de seleção de organismos resistentes, mantendo as bases químicas efetivas por maior tempo.

Os esporos fúngicos (conídios e clamidósporos) são estruturas que tem sido utilizadas tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, através da administração oral aos animais. Maciel et al. (2009) trabalhando com 12 espécies de fungos

nematófaos, dentre eles a espécie *Arthrobotrys musiformis*, demonstraram, em condições laboratoriais, que a taxa de redução de larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. foi dose-dependente, recuperando menos larvas vivas nos tratamentos com maior concentração de conídios dos isolados fúngicos. Paz-Silva et al. (2011) obtiveram reduções de larvas infectantes de ciatostomíneos acima de 90%, utilizando clamidósporos de *D. flagrans* diretamente em amostras de fezes de equinos depositadas no solo.

A ação dos conídios de *A. musiformis* demonstrou que essas estruturas são capazes de reduzir as larvas infectantes de estrongilídeos parasitos de equinos tanto em condições controladas quanto em condições à campo. As concentrações testadas neste trabalho apresentaram pouca variação nos resultados finais. Esse fato pode indicar que o período de 15 dias é o bastante para que os conídios do *A. musiformis* germinem e sejam capazes de colonizar o bolo fecal o suficiente para reduzir as larvas ali presentes, independente da dose inicial de esporos presentes nas fezes.

Esporos são estruturas fúngicas que podem ser utilizadas para produção de formulações para biocontrole e outros produtos comerciais contendo fungo. A utilização de esporos fúngicos para equinos é uma proposta que vem ganhando atenção da comunidade científica nos últimos anos, e tem sido alvo de pesquisas, principalmente quanto às dosagens adequadas e suficientes para um controle efetivo da carga parasitária ambiental, e também as formas de administração dessas estruturas aos animais (BUZATTI et al., 2015, HERNÁNDEZ et al., 2016).

Concentrações de conídio nas fezes maiores do que as utilizadas neste trabalho podem gerar uma colonização do bolo fecal em um tempo mais curto, sendo este fato desejável, uma vez que um maior número de larvas pode ser capturado, antes que escapem desse controle, o qual é limitado ao bolo fecal, e contamine as pastagens. Contudo, é necessário levar em conta o fato de que a administração dos conídios por via oral pode gerar uma perda da dosagem inicial administrada, a qual seria inerente ao processo natural da digestão. Nesse sentido, Krambeck (2015) avaliou a quantidade de clamidósporos do fungo *Duddingtonia flagrans* eliminada por grama de fezes (CPG), em diferentes horários, após a administração de uma dosagem de $3,5 \times 10^6$ clamidósporos/kg peso para ovinos e o maior valor de CPG encontrado foi de aproximadamente 110. Dessa forma, para se obter concentrações muito elevadas de esporos nas fezes dos animais, a dosagem de administração requerida talvez não seja praticável. Para a determinação de uma dosagem correta de administração aos animais, e obtenção de um valor de esporos suficiente para um controle efetivo das larvas no bolo fecal, é necessário a avaliação da cinética de eliminação dessas estruturas nas fezes.

Conclusão

Conídios de *Arthrobotrys musiformis* demonstraram capacidade de reduzir as larvas infectantes de strongilídeos parasitos de equinos tanto em condições controladas quanto em condições à campo. As concentrações testadas neste trabalho apresentaram pouca variação nos resultados finais entre os grupos tratados, mas todas diferiram estatisticamente quando foram comparadas ao grupo controle. Esses resultados indicam que esporos do

fungo *A. musiformis* apresentam potencial para serem empregados no controle das formas de vida livre do principal grupo de nematóides parasitos de equinos.

Referencias

ACEVEDO-RAMÍREZ, P.M.C.; FIGUEROA-CASTILLO, J.A.; ULLOA-ARVIZÚ, R.; MARTÍNEZ-GARCIA, L.G.; GUEVARA-FLORES, A.; RENDÓN, J.L.; VALERO-COSS, R.O.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; QUIROZ-ROMERO, H. (2015) Proteolytic activity of extracelular products from *Arthrobotrys musiformis* and their effect in vitro against *Haemonchus contortus* infective larvae. **Veterinary Record Open**. 2: e000103.

AGUILAR-MARCELINO, L.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; TORRES-HERNÁNDEZ, G.; LÓPEZ-ARELLANO, M.E.; BECERRIL-PÉREZ, C.M.; ORIHUELA-TRUJILLO, A.; TORRES-ACOSTA, J.F.J.; OLMEDO-JUÁREZ, A. (2016). Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. **Journal of Helminthology**, 91(6): 665-671.

ARROYO, F.L.; ARIAS, M.S.; CAZAPAL-MONTEIRO, C.F.; HERNÁNDEZ, J.A.; SUÁREZ, J.; MIGUÉLEZ, S.; ROMASANTA, A.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; PAZ- SILVA, A. (2016). The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. **Biological Control**, 92: 38-44.

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

BUZATTI, A.; SANTOS, C.P.; FERNADES, M.A.M.; YOSHITANI, U.Y.; SPRENGER, L.K.; SANTOS, C.D.; MOLENTO, M.B. (2015). *Duddingtonia*

flagrans in the control of gastrointestinal nematodes of horses. **Experimental Parasitology**, 159: 1-4.

CAI, K.Z.; WANG, B.B.; XU, Q.; LIU, J.L.; WANG, K.Y.; XUE, Y.J.; ZHANG, H.Y.; WANG, H.Y.; CAO, X, MA, Z.R. (2017). *In vitro* and *in vivo* studies of nematophagous fungi *Arthrobotrys musiformis* and *Arthrobotrys robusta* against the larvae of the trichostrongylides. **Acta Parasitologica**, 62(3): 666–674.

CASILLAS-AGUILAR, J.A.; MENDOZA-DE-GIVES, P.; LÓPEZ-ARELLANO, M.E.; LIÉBANO-HERNÁNDEZ, E. (2008). Evaluation of Multinutritional Pellets Containing *Duddingtonia flagrans* chlamyospore for the Control of Ovine Haemonchosis. **Annals of the New York Academy of Science**, 1149: 161–163.

DIAS, W.P.; FERRAZ, S. (1993). Crescimento e esporulação de *Arthrobotrys* spp. em diferentes substratos, meios de cultura, pH e níveis de temperatura. **Nematologia Brasileira**, 17(2): 168-181.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research**, 12:50-52.

GRAMINHA, E.B.N.; MAIA, A.S.; SANTOS, T.M.; CÂNDIDO, R.C; SILVA, G.S.; COSTA, A.J. (2001) Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematoides parasitos de animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**. 22(1): 11-16.

GRAMINHA, E.B.N.; COSTA, A.J.; OLIVEIRA, G.P.; MONTEIRO, A.C.; PALMEIRA, S.B.S. (2005). Biological control of sheep parasite nematodes by nematode-trapping fungi: *in vitro* activity and after passage through the gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 21: 717-722.

HERNÁNDEZ, J.A.; ARROYO, F.L.; SUÁREZ, J.; CAZAPAL-MONTEIRO, C.F.; ROMASANTA, A.; LÓPEZ-ARELLANO, M.E.; PEDREIRA, J.; MADEIRA DE CARVALHO, L.M.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; ARIAS, M.S.; MENDOZA-DE GIVES, P.; PAZ-SILVA, A. (2016). Feeding horses with

industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. **Veterinary Parasitology**, 229: 37-44.

KAPLAN, R.M. (2002). Anthelmintic resistance in nematodes of horses. **Veterinary Research**, 33(5): 491-507.

KRAMBECK, D.R. 2015. **Efeito do clima e do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre o desenvolvimento e migração vertical de larvas infectantes de helmintos parasitos gastrintestinais de ovinos em pastagem de capim Massai**. Sinop: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 56p. (Dissertação, Mestrado).

LIMA, W.S. 1989. **Dinâmica das populações de parasitos gastrintestinais em bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG. Brasil**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 178p. (Tese, doutorado).

MACIEL, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; LOPES, E.A.; FREITAS, L.G. (2009). Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. **Veterinary Parasitology**, 161:239-247.

MOLENTO, M. B. (2005). Resistencia parasitária em helmintos de equídeos e proposta de manejo. **Ciência Rural**, 35 (6):1469-1477.

PAZ-SILVA, A.; FRANCISCO, I.; VALERO-COSS, R.O.; CORTINÃS, F.J.; SÁNCHEZ, J.A.; FRANCISCO, R.; ARIAS, M.; SUÁREZ, J.L.; LÓPEZ-ARELLANO, M.E.L.; SÁNCHEZ-ANDRADE, R.; MENDOZA-DE-GIVES, P. (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. **Veterinary Parasitology**, 179: 277-282.

6. CONCLUSÕES GERAIS

O fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) é capaz de destruir larvas infectantes de strongilídeos nematoides de equinos. O micélio incorporado à uma matriz de alginato de sódio foi capaz de resistir à passagem pelo trato gastrintestinal de equinos e manter sua viabilidade, não apresentando redução na capacidade de predação de larvas infectantes de ciatostomíneos.

Os conídios do isolado A144 foram capazes de reduzir as larvas infectantes de strongilídeos parasitos de equinos tanto em condições controladas quanto em condições à campo. As concentrações testadas apresentaram pouca variação nos resultados finais entre os grupos tratados, mas todas diferiram estatisticamente quando foram comparadas ao grupo controle.

Os resultados encontrados indicam que o fungo *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) é uma alternativa para o controle das fases de vida livre dos strongilídeos nematoides de equinos.


ANEXOS

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 65/2016, intitulado “**Fungo nematófago *Arthrobotrys musiformis* como controlador biológico de nematoides de equinos e sua interação com antiparasitários**”, coordenado pelo Jackson Victor de Araújo do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado definitivamente em 15/03/2018.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 65/2016, named “**Nematophagous fungus *Arthrobotrys musiformis* as a biological control of nematodes of horses and their interaction with antiparasitic**”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being definitive approved on March 15, 2018.



Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV