

**TIAGO DE HOLLANDA AYUPE**

***Arthrobotrys cladodes* var *macroides* E *Pochonia chlamydosporia*  
COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE NEMATÓIDES  
PARASITOS GASTRINTESTINAIS 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*.

Orientador: Jackson Victor de Araújo

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2020**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

A989a  
2020 Ayupe, Tiago de Hollanda, 1979-  
*Arthrobotrys cladodes* var *macroides* e *Pochonia*  
*chlamydosporia* como controladores biológicos de nematóides  
parasitos gastrintestinais de equinos / Tiago de Hollanda Ayupe.  
– Viçosa, MG, 2020.  
57 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Jackson Victor de Araujo.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

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

CDD 22. ed. 636.1089696

TIAGO DE HOLLANDA AYUPE

***Arthrobotrys cladodes var macroides* E *Pochonia chlamydosporia*  
COMO CONTROLADORES BIOLÓGICOS DE NEMATÓIDES PARASITOS  
GASTRINTESTINAIS 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: 14 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



---

Tiago de Hollanda Ayupe  
Autor



---

Jackson Victor de Araújo  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar ao meu lado durante minha caminhada, me trazendo paz, serenidade e perseverança.

À minha esposa Bruna, pelo amor, paciência, compreensão e ajuda.

Aos meus pais, Mônica e Sebastião, pelo amor e estímulo.

À minha irmã, Joana, pelo carinho e apoio.

Ao amigo e orientador Jackson, pela oportunidade concedida e pela confiança.

Aos amigos do laboratório: Artur Kanadani, Aloizio Carlos (Calzinho), José Geraldo (Tuim), Ademir, Samuel, Lorendane, Juliana, Mariana, Guilherme, Isabela, Marisa, Ítalo, Atílio, Vinícius e Cristiana, pela ajuda nos experimentos e pelos bons momentos de convivência.

A todos os funcionários do setor de equideocultura da UFV, pela disponibilidade e ajuda durante os experimentos.

À Rose, secretária da pós-graduação, pelas orientações, gentileza e amizade.

Ao professor Leandro Grassi pelo fornecimento do Rizotec® e às colegas Thalita e Cássia pela ajuda nos ensaios.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), aos Departamentos de Veterinária e Zootecnia e ao Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária pelos recursos de infraestrutura e materiais concedidos.

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo custeio de materiais e equipamentos necessários para a execução dos experimentos.

## BIOGRAFIA

TIAGO DE HOLLANDA AYUPE, filho de Sebastião Heleno Ayupe e Mônica Hollanda Ayupe, nasceu em Juiz de Fora, Minas Gerais, no dia 02 de fevereiro de 1979.

Em março de 2005 graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Em março de 2009 iniciou o curso de Pós-Graduação *Lato Sensu* MBA em Gestão Empresarial, pela Fundação Getúlio Vargas, o qual concluiu em fevereiro de 2011.

Em agosto de 2012 iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, na área de parasitologia, concluindo em dezembro de 2014.

Em março de 2016 iniciou o doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na mesma Universidade, na área de parasitologia.

## RESUMO

AYUPE, Tiago de Hollanda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Fungos nematófagos *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* e *Pochonia chlamydosporia* como controladores biológicos de nematóides parasitas gastrintestinais de equinos.** Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Os nematóides parasitas gastrintestinais são responsáveis por gerar perdas econômicas significativas para a equideocultura mundial. O surgimento de resistência aos anti-helmínticos tem se tornado frequente e o controle biológico através do uso de fungos nematófagos torna-se uma alternativa para auxiliar na profilaxia das helmintoses gastrintestinais de equinos. Neste trabalho foi avaliada a eficácia do fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (isolado CG719) em predação de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos *in vitro*, bem como sua atividade predatória após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos (TGI). Os testes *in vitro* e após passagem pelo TGI apresentaram reduções ( $p < 0,05$ ) de 56,6% e 31,42% respectivamente de L3, confirmando a capacidade de *A. cladodes* em controlar L3 de ciatostomíneos e suportar a passagem pelo TGI. Esses resultados incentivaram a avaliação da eficácia do fungo *A. cladodes* em testes com equinos a campo. Nesse ensaio, o fungo foi utilizado em formulações à base de alginato de sódio fornecidas duas vezes por semana, durante 9 meses. Embora os resultados tenham mostrado redução na contagem de ovos por grama de fezes, bem como de larvas recuperadas de coproculturas e de pastagem, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo controle e tratado. Isso demonstra que fatores externos, como pluviosidade, temperatura e umidade relativa podem ter afetado sua eficácia a campo. Nesse trabalho, também foi avaliada a eficácia do nematicida biológico Rizotec® formulado com clamidósporos do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc 10). Foram utilizadas diferentes doses de Rizotec® equivalentes a ( $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $7,5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$ ) clamidósporos. Após 7, 14 e 21 dias de interação, os ovos foram classificados quanto aos

efeitos ovicidas tipos 1, 2 e 3. Somente as doses de 14,25 mg e 19,0 mg de Rizotec® apresentaram diferenças ( $p < 0,05$ ) com relação ao efeito lítico tipo 3 com 21 dias de interação em relação ao grupo controle. Foi observada uma tendência de aumento nas percentagens (17,0%, 26,33%, 28,33%, 47,83% e 65,66%) de ovos com esse efeito ao se elevar a dose do produto. As curvas de regressão para as doses testadas mostraram uma tendência de aumento do efeito lítico tipo 3 com o aumento do tempo de interação. Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a eficácia dos fungos *Arthrobotrys cladodes var. macroides* (isolado CG719) e *Pochonia chlamydosporia* (isolado Pc 10) no controle de formas infectantes e ovos de nematóides gastrintestinais de equinos *in vitro*.

Palavras-chave: Ciatostomíneos. Controle. Equinos. Helmintos. *Parascaris equorum*.

## ABSTRACT

AYUPE, Tiago de Hollanda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. ***Arthrobotrys cladodes* var *macroides* and *Pochonia chlamydosporia* as biological controllers of gastrointestinal parasitic nematodes in horses.** Adviser: Jackson Victor de Araújo.

Gastrointestinal parasitic nematodes are responsible for generating significant economic losses for the world equideoculture. The emergence of resistance to anthelmintics has become frequent and biological control through the use of nematophagous fungi has become a promising alternative to assist in the prophylaxis of gastrointestinal helminths in horses. In this work, the efficacy of the nematophagous fungus *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (CG 719) in predating infective larvae (L3) of cyathostomins *in vitro*, as well as their predatory activity after passing through the equine gastrointestinal tract (GIT). Tests *in vitro* and after passing through the GIT showed reductions ( $p < 0.05$ ) of 56.6% and 31.42%, respectively, of L3, confirming the ability of *A. cladodes* to control cyathostomin L3 and support the passage through the GIT. These results encouraged the evaluation of the effectiveness of the fungus *A. cladodes* in tests with horses in the field. In this test, the fungus was used in formulations based on sodium alginate supplied twice weekly, for 10 months. Although the results showed a reduction in the egg count per gram of feces, as well as in larvae recovered from coprocultures and pasture, no significant differences were observed between the control and treated groups. This demonstrates that external factors such as rainfall, temperature and relative humidity can affect its effectiveness in the field. In this work, the effectiveness of the biological nematicide Rizotec® (1.9 mg, 4.75 mg, 9.5 mg, 14.25 mg and 19.0 mg) formulated with chlamydo-spores of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (isolated Pc 10) was also evaluated, in destroying *Parascaris equorum* eggs *in vitro*. The eggs were classified according to the ovicidal effects (types 1, 2 and 3) caused by the fungus in 7, 14 and 21 days of interaction. Only the doses of 14.25 mg and 19.0 mg of Rizotec® showed differences ( $p < 0.05$ ) in relation to the type 3

lytic effect with 21 days of interaction in relation to the control group. There was a tendency to increase the percentages (17,0%, 26,33%, 28,33%, 47,83% and 65,66%) of eggs with this effect when increasing the product dose. The regression curves for the tested doses showed a tendency to increase the type 3 lytic effect with increasing interaction time. The results presented in this work confirm the efficacy of the fungi *A. cladodes* and *P. chlamydosporia* (isolated Pc10) in the control of infectious forms and eggs of gastrointestinal nematodes in horses *in vitro*.

Keywords: Cyathostomins. Control. Helminths. Equin. *Parascaris equorum*.

## SUMÁRIO

<b>Introdução Geral</b> .....	<b>10</b>
Referências .....	14
<b>Capítulo 1</b> .....	<b>17</b>
<b><i>Arthrobotrys cladodes as biological controller of cyathostomin infective larvae</i></b> .....	<b>17</b>
Abstract .....	19
1.1 Introduction .....	20
1.2 Material and Methods .....	21
1.3 Results .....	23
1.4 Discussion .....	25
1.5 Acknowledgments .....	27
1.6 Conflict of Interest .....	27
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>31</b>
<b><i>Arthrobotrys cladodes var macroides (CG 719) na redução ambiental de larvas infectantes de ciatostomíneos</i></b> .....	<b>31</b>
Resumo .....	32
2.1 Introdução .....	33
2.2 Material e Métodos .....	34
2.2.1 Fungo .....	34
2.2.2 Ensaio Experimental <i>in vivo</i> .....	34
2.2.3 Análise dos dados .....	35
2.3 Resultados .....	36
2.4 Discussão .....	39
2.5 Referências .....	42
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>45</b>
<b><i>Eficácia in vitro ematicida biológico Rizotec® em destruir ovos de Parascaris equorum</i></b> .....	<b>45</b>
Resumo .....	46
3.1 Introdução .....	47
3.2 Material e Métodos .....	48
3.2.1 Nematicida biológico .....	48
3.2.2 Ovos de <i>Parascaris equorum</i> .....	48
3.2.3 Teste de parasitismo <i>in vitro</i> .....	48
3.3 Resultados .....	49
3.4 Discussão .....	52
3.5 Referências .....	55

# **Introdução Geral**

## Introdução Geral

Inserida no Complexo do Agronegócio Brasileiro, a equideocultura gera aproximadamente R\$ 16,15 bilhões anualmente e é responsável pela geração de aproximadamente 612 mil empregos e 3 milhões de postos de trabalho. Com 5,8 milhões de cavalos, continua sendo decisivo para o desenvolvimento de atividades pecuárias e agrícolas na grande maioria das propriedades produtivas nacionais (MAPA, 2016). O rebanho se destaca como o maior da América Latina e ocupa a terceira posição mundial. (ANUALPEC, 2017; FAO, 2020).

Os sistemas normalmente adotados para criação de equinos, baseados na utilização de pastagens, favorecem a ocorrência de helmintoses gastrintestinais, as quais causam perdas econômicas significativas na equideocultura mundial. Os equinos são hospedeiros de uma grande variedade de helmintos. Entre eles, o grupo dos ciatostomíneos, formado por aproximadamente 50 espécies, se mostra como o mais importante, devido ao seu potencial patogênico e à sua elevada prevalência em animais de diferentes faixas etárias. Outro nematóide que se destaca é *Parascaris equorum* em virtude dos danos que causam à saúde de animais jovens. Essas espécies estão presentes durante todo o ano nas pastagens e os animais parasitados podem apresentar anemia, letargia, perda de peso, cólicas intestinais e até morte, de acordo com a carga parasitária (Relf et al., 2013; Stratford et al., 2014).

Os ciatostomíneos possuem um ciclo de vida direto, onde os ovos liberados pelas fêmeas adultas são dispersados no ambiente através das fezes do hospedeiro. Os ovos passam por um desenvolvimento embrionário que culmina com a eclosão da larva de primeiro estágio. Na pastagem ocorre o desenvolvimento da larva até o seu estágio infectante (L3). Os equídeos são infectados através da ingestão das L3. Dentro do hospedeiro, a larva continua seu desenvolvimento até chegar à fase adulta (Lyons et al., 1999).

O ciclo de vida de *P. equorum* também se caracteriza por ser de forma direta. A infecção se dá pela ingestão de ovos em seu estágio infectante presentes no ambiente. Após a ingestão e eclosão dos ovos, as

larvas penetram na parede intestinal e migram para o fígado, pulmão e posteriormente para a traqueia. As larvas são deglutidas e retornam ao intestino delgado para posteriormente completar a muda de L2 para o estágio de maturidade do parasita (L3) (Nielsen, 2012).

O controle desses parasitas nas pastagens contribui para a manutenção do *status* imunológico e da saúde intestinal dos equinos. A abordagem tradicional para diminuir a incidência das parasitoses é baseada na administração frequente de anti-helmínticos para os animais. Contudo, estudos têm documentado o aumento de nematóides resistentes às diversas classes de anti-helmínticos (Reynemeyer, 2009; Nielsen et al., 2014). Assim, outras estratégias devem ser empregadas para auxiliar no controle de ciatostomíneos e *P. equorum*.

Nesse contexto, estudos sobre o controle biológico de nematóides parasitas gastrintestinais utilizando fungos nematófagos predadores e ovicidas têm recebido maior atenção devido ao sucesso que vêm apresentando em laboratório e em condições ambientais (Dias et al., 2007; Braga et al., 2011). *Arthrobotrys cladodes* e *Pochonia chlamydosporia* são fungos nematófagos com grande potencial de utilização no controle biológico de helmintos parasitas de animais domésticos (Braga et al., 2013; Castro et al., 2018b; Vieira et al., 2019). O fungo predador *A. cladodes* aprisiona os helmintos em armadilhas formadas por redes tridimensionais de hifas, as quais penetram na cutícula do parasita e digerem os conteúdos internos da larva. O fungo ovicida *P. chlamydosporia* parasita ovos de helmintos por meio de apressórios, desenvolvidos a partir de hifas indiferenciadas, que permitem a colonização da superfície do ovo e a penetração por ação mecânica e enzimática (Carvalho et al., 2010; Braga e Araújo 2014).

A dispersão de estruturas fúngicas através das fezes, onde se encontram os ovos e as larvas dos nematóides, é uma das formas estudadas para o estabelecimento do controle biológico de nematóides parasitas gastrintestinais (Braga et al., 2010; Araujo et al., 2010). Uma alternativa para a disseminação destes fungos no ambiente é o fornecimento de micélio em matriz de alginato de sódio para os animais com o objetivo de controlar larvas infectantes e ovos de helmintos (Rocha

et al., 2007; Silva et al., 2010; Tavela et al., 2013; Castro et al., 2018a). Porém, as variações climáticas a que os fungos nematófagos presentes nas fezes após passagem pelo trato gastrintestinal estão sujeitos, podem afetar o desenvolvimento e a atividade nematicida destes organismos (Tavela et al., 2010). Recentemente, produtos comerciais com formulações à base de clamidósporos estão sendo testados para controlar as parasitoses gastrintestinais de animais domésticos (Healey et al., 2018a; Healey et al., 2018b; Braga et al., 2020). Ainda assim, a seleção de organismos que possam ser produzidos industrialmente, bem como de tecnologias de dispersão desses fungos nematófagos, continua sendo um desafio.

Os objetivos propostos neste trabalho visam avaliar a eficácia do controle biológico de nematóides parasitas de equinos utilizando os fungos nematófagos *Arthrobotrys cladodes* e *Pochonia chlamydosporia*.

O trabalho está organizado em três capítulos. No primeiro capítulo, “*Arthrobotrys cladodes* como controlador biológico de larvas infectantes de ciatostomíneos” foi avaliada a eficácia do fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (isolado CG719) em predação de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos *in vitro*. Além disso, foi verificada a sua atividade predatória após a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos.

No capítulo 2, “Efeito do fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (isolado CG719) na redução ambiental de larvas infectantes de ciatostomíneos” foi avaliada a eficácia do fungo *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (CG 719) em formulação à base de alginato de sódio como alternativa para o controle biológico de ciatostomíneos.

No capítulo 3, “Eficácia *in vitro* do nematicida biológico Rizotec® em destruir ovos de *Parascaris equorum*” foi avaliada a eficácia do nematicida biológico Rizotec®, formulado com clamidósporos do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Pc 10), em destruir ovos de *Parascaris equorum* *in vitro*.

## Referências

- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira, 20th edn. Instituto FNP, São Paulo, SP, Brasil. 2017
- ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O. In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. *Parasitology Research*, v.107, p.103-108, 2010.
- BRAGA, F.R., FERRAZ, C. M., DA SILVA, E. N., & DE ARAÚJO, J. V. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control in vivo and in vitro of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *3 Biotechnology*, v.10, p.62-68, 2020.
- BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.98, p.71-82. 2014.
- BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., TAVELA, A.O., VILELA, V.L.R., SOARES, F.E.F., ARAUJO, J.M., QUEIROZ, J.H. First report of interaction of nematophagous fungi on *Libyostrongylus douglassii* (Nematoda: Trichostrongylidae). *Revista Brasileira de Parasitologia*, v.22, p.147-151, 2013.
- BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; PINTO, P.S.A. Ovicidal activity of different concentrations of *Pochonia chlamydosporia* chlamydospores on *Taenia taeniaeformis* eggs. *Journal of Helminthology*, v.85, p. 7-11, 2011.
- BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.E.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; CAMPOS, A.K.; TAVELA, A.O.; FERREIRA, S.R.; FRASSY, L.N.; ALVES, C.D.F. *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* as a possible biological control agents of *Oxyuris equi* and *Austroxyuris finlaysoni*. *Journal of Helminthology*, v.84, p.21-25, 2010.
- CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; ALVES, C. D. F. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Veterinary parasitology*, v.169, p.123-127, 2010.
- DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; BRAGA, F. R.; FONSECA, T. A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.1245, 2007.
- FAO - Food and Agriculture Organization. United Nations. Available at: [www.fao.org/faostat/en/#data/QA](http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA). Accessed 30 January 2020.
- HEALEY, K.; LAWLOR, C.; KNOX, M. R.; CHAMBERS, M.; LAMB, J. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Veterinary Parasitology*, v.253, p.48-54, 2018a.
- HEALEY, K.; LAWLOR, C.; KNOX, M. R.; CHAMBERS, M.; LAMB, J.; GROVES, P. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Pasture larval studies in horses, cattle and goats. *Veterinary Parasitology*, v.258, p.124-132, 2018b.

LYONS, E. T.; TOLLIVER, S. C.; DRUDGE, J. H. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*, v.85, p.97-112, 1999.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available at: [www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-ematicas/documentos](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-ematicas/documentos). Accessed January 2020.

NIELSEN, M. K. Sustainable equine parasite control: perspectives and research needs. *Veterinary Parasitology*, v.185, p.32-44, 2012.

NIELSEN, M. K.; REINEMEYER, C. R.; DONECKER, J. M. LEATHWICK, D. M.; MARCHIONDO, A. A.; KAPLAN, R. M. Anthelmintic resistance in equine parasites - Current evidence and knowledge gaps. *Veterinary Parasitology*, v.204, p.55-63, 2014.

OLIVEIRA, I. C.; CARVALHO, L. M.; VIEIRA, Í. S.; CAMPOS, A. K.; FREITAS, S. G.; ARAUJO, J. M.; ARAÚJO, J. V. Using the fungus *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* as a sustainable strategy to reduce numbers of infective larvae of bovine gastrointestinal parasitic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, v.158, p.46-51, 2018b.

OLIVEIRA, I. C.; VIEIRA, Í. S.; CARVALHO, L. M.; CAMPOS, A. K.; FREITAS, S. G.; ARAUJO, J. M.; BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. Reduction of bovine strongilides in naturally contaminated pastures in the southeast region of Brazil. *Experimental Parasitology*, v.194, p.9-15, 2018a.

REINEMEYER, C. R. Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites & Vectors*, v.2, S8, 2009.

RELF, V. E.; MORGAN, E. R.; HODGKINSON, J. E.; MATTHEWS, J. B. Helminth excretion with regard to age gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology*, v.140, p.641-652, 2013.

ROCHA, R. A.; ARAÚJO, J. V.; AMARANTE, A. F. T. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in lambs at pasture. *Journal of Helminthology*, v.81, p.387-392, 2007.

SILVA, B. F.; CARRIJO-MAUAD, J. R.; BRAGA, F. R., CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V.; AMARANTE, A. F. Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. *Parasitology Research*, v.106, p.1343-1350, 2010.

STRATFORD, C. H.; LESTER, H. E.; PICKLES, K. P.; MCGORUM, B. C.; MATTHEWS, J. B. An investigation of anthelmintic efficacy against strongyles on equine yards in Scotland. *Equine Veterinary Journal*, v.46, p.17-24, 2014.

TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; SILVEIRA, W. F.; SILVA, V. H. D.; JÚNIOR, M. C.; BORGES, L. A.; ARAUJO, J. M.; BENJAMIN, L. A.; CARVALHO, G. R.; PAULA, A. T. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science*, v.94, p.568-572., 2013.

TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. M.; FERREIRA, S. R.; CARVALHO, G. R. Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus

*Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.175, p.92-96, 2010.

# **Capítulo 1**

*Arthrobotrys cladodes as biological controller of cyathostomin  
infective larvae*

***Arthrobotrys cladodes* as biological controller of cyathostomin  
infective larvae <sup>1</sup>**

Tiago de Hollanda Ayupe, Ítalo Stoupa Vieira, Atílio Dalcin Júnior, Isabela de Castro Oliveira, Vinícius Monteiro Ferreira, Artur Kanadani Campos, Jackson Victor de Araújo

Departamento de Veterinária, Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author: Jackson Victor de Araújo [jvictor@ufv.br](mailto:jvictor@ufv.br)

<sup>1</sup> Paper subject submitted to Journal Tropical Animal Health and Production  
– Manuscript Number TROP-D-20-00199

**Abstract**

Research with nematophagous fungi has shown success in controlling helminth parasites of domestic animals. The aim of this study was to evaluate the potential for predation, *in vitro*, of the fungus *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* on infective larvae of cyathostomin (L3) and to verify the resistance and its viability in a sodium alginate matrix after passing through the gastrointestinal tract of horses. In the *in vitro* test, twenty Petri dishes, containing 2% Water Agar (WA) medium were divided into two groups. The treaty consisted of 10 plates with the developed fungus and 500 L3. The control group consisted of 10 plates with 500 L3 without the fungus. In the *in vivo* test, twelve mares were randomly divided into two groups. After administration of 100g pellets in a sodium alginate matrix with the fungus (treated group) and without the fungus (control group), fecal samples were collected at 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours intervals and transferred for Petri dishes with 2% WA together with 1000 L3. In both tests, the plates were incubated for 15 days to check the predation and characteristic structures of the fungus. The non-predated L3 were recovered, quantified by optical microscopy and the percentage of reduction calculated. In the *in vitro* test there was a reduction ( $p < 0.05$ ) of 56.6%. The *in vivo* test showed a reduction ( $p < 0.05$ ) of 31.42% after isolation of the fungus at 36 hours. These results confirm the ability of *A. cladodes* to control cythostomin L3.

**Keywords:** biological control, horses, microorganisms, parasites, nematophagous fungi.

## 1.1 Introduction

Inserted in the Brazilian Agribusiness Complex, equideoculture generates approximately R\$16.15 billion annually and it is responsible for the generation of approximately 612 thousand jobs and 3 million of work stations. The herd stands out as the largest in Latin America and occupies the third world position. With 5.8 million horses, it remains decisive for the development of livestock and agricultural activities in the vast majority of national productive properties (MAPA 2016; ANUALPEC 2017; FAO 2020).

Horses around the world are exposed to a complex mixture of intestinal parasitic helminths that can seriously compromise health and well-being. Some species of helminths have an extremely high prevalence and are difficult to control, mainly because there is a limited understanding of their most basic biology (Matthews 2011).

Among nematodes, cyathostomins are the most important due to their high prevalence and pathogenicity. With more than 50 recognized species, they are the parasites that affect horses in regions with tropical, temperate or cold weather (Corning 2009).

The increased prevalence of nematodes resistant to anthelmintics requires a review of current parasite control programs to identify factors that influence their effectiveness and the development of resistance (Fritzen et al. 2010). Issues related to the high cost involved in the discovery of new antiparasitic molecules that are implicit in the control of residues in products intended for human consumption, in the countries where horse meat is consumed, made necessary the search for new approaches related to diagnosis, prophylaxis and treatment (Cernea et al. 2008). In recent years, the problem of anthelmintic resistance has reached high levels, and cannot be ignored because it is an important issue in parasite control (Matthews 2011; Kaplan et al. 2012; Matthews 2014).

Studies on the biological control of parasitic nematodes of several species using fungi have been carried out under laboratory and field conditions (Braga and Araújo 2014). Among them, the genus *Arthrobotrys* is shown as one of the most important and promising predatory fungi (Barron 2003). The species of this genus produce traps of the type three -

dimensional networks that promote adhesion, immobilization, penetration and consequently destruction of larvae (Nordbring-Hertz et al. 2006; Carvalho et al. 2011). However, little research has been carried out involving the fungus *Arthrobotrys cladodes* in the control of small strongyles of horses.

Thus, the aim of this work was to evaluate the effectiveness of the fungus *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (CG719 isolate) in prey on infective larvae (L3) of cyathostomin, *in vitro*, and verify their activity after passing through the gastrointestinal tract (GIT) of horses.

## 1.2 Material and Methods

The nematophagous fungi *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* (CG 719 isolated), was kept in tubes containing 2% Corn Meal Agar (CMA, Fluka®), at 4 ° C, in the absence of light, at the Parasitology Laboratory of the Veterinary Department of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil. A sample of this material was transferred to 9 cm diameter Petri dishes containing 2% Water Agar (WA, Fluka®) medium, where the fungus grew for seven days, at 26°C and in the dark. Fragments of the agar approximately 5mm containing mycelium and fungal spores were transferred to Erlenmeyer flasks containing 150 ml of Yeast Extract (YE, Fluka®) medium for the production of mycelium. The fungus grew at pH 6.5 under agitation of 120 rpm, at 26°C, in the dark for 21 days. After that period, the mycelial mass was removed from the flasks for the production of pellets using a sodium alginate matrix, according to the technique described by Walker and Connick (1983) and modified by Lackey et al. (1993).

Coprocultures were produced with 20g of naturally infected horse feces, mixed with autoclaved industrial vermiculite (Vermiculita®, NS Barbosa Ind. Com., Brazil) and incubated at 26°C for 15 days to obtain cyathostomin infective larvae (L3). The L3 were recovered after 12 hours using the method of Baermann, (Ueno and Gonçalves 1998) and identified according to Bevilaqua et al. (1993).

In the *in vitro* test, twenty Petri dishes, 9 cm in diameter, containing 2% Water Agar (Fluka®) medium were divided into two groups (treated and control). The treated group consisted of 10 plates in which the isolated

fungal had previously grown; 500 L3 were poured onto the plate. The control group consisted of 10 plates with 500 L3 without the fungus. The plates were incubated at 25°C, in the dark, for a period of 15 days. During this period, ten random fields on each plate were observed using optical microscopy (magnifications of 100x and 400x) to verify the formation of traps and predation of larvae by the fungus. The L3 were recovered using the technique of Baermann (Ueno and Gonçalves 1998) and identified (Bevilaqua et al. 1993). The percentage of larvae reduction in the treated group compared to the control group was calculated according to the following formula:

$$\%Reduction = (XC - XT)/XC \times 100$$

XC = Average number of larvae recovered in the control group

XT = Average number of larvae recovered in the treated group

The average numbers of L3 recovered from the plates of the treated and control groups were transformed into a log (x + 1) and subjected to analysis of variance (ANOVA) and Student's T test (5%) of probability.

The test *in vivo* was conducted in the equideoculture sector of the Federal University of Viçosa, located in southeastern Brazil, (latitude 20 ° 45 '20' 'S, longitude 42 ° 52' 40 "). Twelve Breton mares, with average age of 24 months and average body weight of 290 kg were previously dewormed with commercial antiparasitic based on abamectin and praziquantel (Aba gel® compound, Ouro Fino) 1.6g / 100 kg live weight orally. Fifteen days after treatment with anthelmintic and confirmed the absence of nematode eggs in the feces, the animals were randomly divided into two groups (treated and control). Fecal samples were collected directly from the rectal ampoule of each animal at intervals of 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours after the administration of a 100 g dose of the pelleted formulation in sodium alginate matrix with the fungus (treated group) and without the fungus (control group) according to Tavela, et al. (2013). The samples of each group were homogenized, and 2 g of feces transferred to 9 cm diameter Petri dishes with 2% WA together with 1000 L3. The plates were stored at 25°C in the dark for 15 days and observed daily for the verification and identification of conidia and conidiophores characteristic of the tested isolate

according to Oorschot (1985). Ten repetitions were performed for each time. On the 15th day, non-predated L3 were recovered by the Baermann method and quantified using optical microscopy to obtain the average of non-predated larvae per plate. The percentage of reduction was calculated using the same formula used in the in vitro test.

The average of L3 recovered from the plates of the groups evaluated for the same collection time were compared using the Kruskal - Wallis non-parametric test at a significance level of 5%.

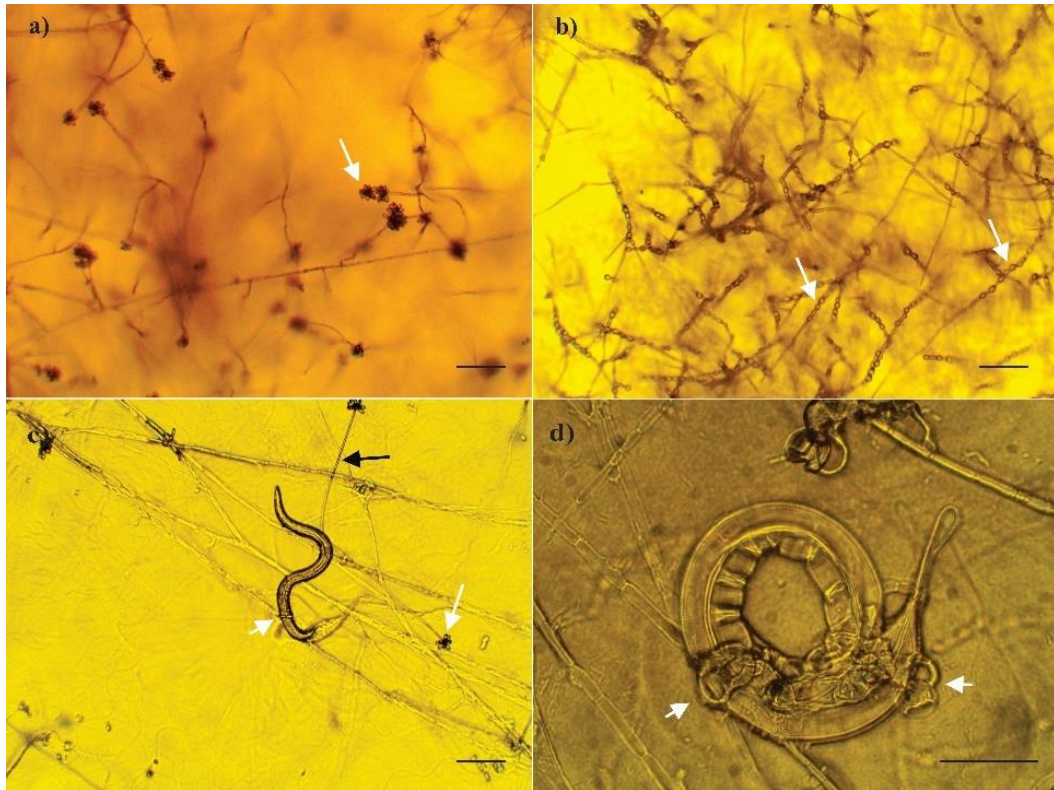
The experimental trial followed the procedures recommended by the rules established by the Ethics Committee (Protocol 51/2017), of the Federal University of Viçosa.

### **1.3 Results**

Reductions ( $p < 0.05$ ) of 56.6% in vitro and 31.5% after passage through the TGI of L3 horses recovered in the treated groups in relation to the control groups were verified at the end of the tests.

The fungus was isolated from fecal samples, only, within 36 hours after its supply in pellets of sodium alginate and maintained its growth and predation potential. Characteristic structures of the species such as conidiophores, conidia and chlamydozoospores (Figure 1. a, b) were observed together with the formation of traps and L3 predation (Figure 1. c, d). *A. cladodes* was not observed in the samples of the control group.

According to table 1, the recovery of cyathostomin L3 showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the treated and control groups only in the 36 hours interval. In 24 hours there was no difference. In the other intervals (12h, 48h, 60h and 72h) the recovery of L3 was higher in the treated groups compared to the control groups.



**Fig. 1** Fungus *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* (CG719) after passage through the gastrointestinal tract of horses obtained by optical microscopy. (A) Conidia in 100x magnification (long white arrow); (B) Chlamydospores in 100x magnification (long white arrows); (C) Conidiophore (black arrow), trap (short white arrow) and conidia (long white arrow) in 100x magnification; (D) Traps (short white arrows) in 400x magnification. Bar: 100  $\mu$ m.

**Table 1** Average and standard deviations (SD) of infective larvae of cyathostomin (L3) recovered from the treated and control groups after 15 days of incubation in Petri dishes with Water Agar 2% of feces collected from 12 to 72 hours after pellet administration containing *Arthrobotrys cladodes* var *macroides*.

	Control	Treated
Time (h)	L3 recovered ( $\pm$ SD)	L3 recovered ( $\pm$ SD)
12	58.33 <sup>b</sup> $\pm$ 70.01	69.17 <sup>b</sup> $\pm$ 74.77
24	36.67 <sup>d</sup> $\pm$ 50.59	24.17 <sup>d</sup> $\pm$ 41.81
36	58.33 <sup>e</sup> $\pm$ 65.34	40.00 <sup>f</sup> $\pm$ 58.64
48	25.83 <sup>g</sup> $\pm$ 46.58	30.83 <sup>g</sup> $\pm$ 51.39
60	25.00 <sup>h</sup> $\pm$ 46.36	33.33 <sup>h</sup> $\pm$ 50.42
72	50.00 <sup>i</sup> $\pm$ 125.20	52.50 <sup>i</sup> $\pm$ 112.12

Different lowercase letters, between columns, indicate statistical difference of means ( $p < 0.05$ ).

#### 1.4 Discussion

In this work, we report the antagonistic effect of the fungus *A. cladodes* var *macroides* (CG 719) on infective larvae of cyathostomin, *in vitro* and *in vivo*, and their ability to produce conidia and chlamydospores *in vitro*. According to (Silva et al. 2015; Blair and Biddle, 2020), this characteristic presented by some genera of nematophagous fungi is desirable to favor their dispersion, colonization and to survive the natural fungicidal action existing in the environment. Just as they facilitate the development of commercial formulations (Braga et al. 2020).

Similar studies have demonstrated the predatory ability of the fungus *A. cladodes* on parasitic nematode larvae. However, in this test, the reduction ( $p < 0.05$ ) of 56.6% of L3 was lower. As we can see, Campos (2006), observed a 99.5% reduction in *Strongyloides papillosus* larvae recovered after seven days of interaction with the same isolate. Braga et al. (2013), found reductions in L3 of *Libyostrongylus douglassii* ( $p < 0.05$ ) of 85.2%, 81.2% for isolates of *Duddingtonia flagrans* and 89.2% for *A. cladodes*. Likewise, evaluating the predatory capacity of *A. cladodes* var

*macroides* (IRAN 677C = CBS 143565), Eslami et al. (2005) found reductions (41.71%, 63.27%, 73.49% and 94, 96%) of *Haemonchus contortus* L3 recovered by adding 1,000, 8,000, 20,000 and 100,000 conidia, respectively, per gram of sheep feces. Paula et al. (2013), studying the predatory capacity of eight fungal isolates of different species with conidia, obtained a decrease ( $p < 0.01$ ) of 84.7% of L1 of *Angiostrongylus cantonensis* recovered by *A. cladodes*.

However, differences in the ability to predate may be related to the recognition and molecular interaction between the traps of different genera, species, fungal isolates and the cuticle of nematodes (Mendoza-de-Gives et al. 1999).

The resistance to passage through the gastrointestinal tract is an important characteristic in fungi to be used in biological controls due to the development of formulations for oral use (Braga and Araújo 2014). Thus, a lot of work has been conducted to select the most suitable isolates. Assis and Araújo (2003) evaluating fungi of the genus *Monacrosporium* obtained reductions ( $p < 0.05$ ) close to 70% of cyathostomin L3 recovered at intervals from 12h to 96h after passing through the GIT of horses. Araujo et al. (2012) observed a high predatory activity of the fungi *D. flagrans* and *M. thaumasium*, and consequently a significant reduction in the L3 of *Strongyloides westeri* in 72 hours after passing through the donkey TGI. Tavela et al. 2013, associating pellets containing the fungi *D. flagrans* and *M. thaumasium* found a 92% reduction in cyathostomin L3 recovered after passing through the GIT of horses at intervals of 48h and 60h.

Likewise, we verified that the fungus *A. cladodes*, showed a similar potential than other species of fungi in crossing the GIT of horses and maintaining their viability, reducing the number of infective larvae by 31.5% in the 36h interval.

Recently, Oliveira et al. (2018) showed, *in vitro*, that *A. cladodes* reduced the number of L3 (68.7%) of bovine gastrointestinal parasites and maintained its predatory capacity after passing the GIT test of the same species. Reductions of 48.65%, 53.33%, 45.16%, 40% and 31.71% were reported respectively at the intervals of 12h, 24h, 36h, 48h and 72h. However, significant reductions ( $p < 0.05$ ) were found up to the 36h interval,

suggesting that the fungus action may gradually decrease over time. The data in the present study showed a reduction percentage in the interval of 36h after passing through the GIT of horses similar to that obtained 72h when passing through the GIT of cattle.

According to Campos et al. (2009), differences in the percentage reduction of L3 between *in vitro* and passage tests can be explained by the lack of exposure of fungi tested *in vitro* to adverse conditions imposed by the animals' GIT, including biotic and abiotic environmental factors. The digestive process and the average time required for the passage of pellets containing the fungus, according to Dehority (2002), varies between different species and is related to the type of food.

This study confirmed the ability of the fungus *A. cladodes* var *macroides* (CG719) to control infective larvae and demonstrated its potential for use in the biological control of cyathostomin by resisting passage through the gastrointestinal tract of horses without losing viability.

### **1.5 Acknowledgments**

The authors are grateful to CNPq, CAPES and Fapemig for financial support.

### **1.6 Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## 1.7 References

- ANUALPEC. 2017. Anuário da Pecuária Brasileira, 20th edn. Instituto FNP, São Paulo, SP, Brasil.
- Araujo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Tavela, A.O., Ferreira, S.R., Soares, F.E.F., Carvalho, G.R., 2012. Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(2), 157-160.
- Assis, R.C.L., Araújo, J.V., 2003. Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrintestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12, 109-113.
- Barron, G.L., 2003. Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity*, 4(1), 3-9.
- Bevilaqua, C.M.L., Rodrigues, M.L.A., Concordet, D., 1993. Identification on infective larvae of some common strongylids of horses. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*, 44(12) 989-995.
- Blair, J., Biddle, A. 2020. Stimulating *Duddingtonia flagrans* chlamydospore production through dehydration. *Journal of Helminthology*, 119, 123-128.
- Braga, F.R., Araújo, J.V., Tavela, A.O., Vilela, V.L.R., Soares, F.E.F, Araujo, J.M., Queiroz, L.M., Silveira, W.F., Feitosa, T.F., Dantas, E.S., Athayde, A.C.R., 2013. First report of the interaction of nematophagous fungi on *Libiostrongylus douglassii* (Nematoda: Trichostrongilidae) of ostrich. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22, 147-151.
- 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.
- Braga, F.R., Ferraz, C.M., Silva, E.N., Araújo, J.V., 2020. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control in vivo and in vitro of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep, 3 *Biotech*, 10 (62).
- Campos, A.K. Fungos nematófagos no controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes. 2006. 138 f. Tese (Doutorado) Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Campos, A.K., Araújo, J.V., Guimarães, M.P., Dias, A.S., 2009. Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. *Parasitology Research*, 105(4), 913-919.
- 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, 236-239.

Cernea, M., Madeira De Carvalho, L.M., Cozma, V. Atlas de diagnóstico da estrogilidose equina. Romênia: Academic Pres, 2008. 119 p.

Corning, S., 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & Vectors*, 2 (S2), S1.

Dehority, B.A., 2002. Gastrointestinal Tracts of Herbivores, Particularly the Ruminant: Anatomy, Physiology and Microbial Digestion of Plants. *Journal of Applied Animal Research*, 21(2), 145-160.

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.

Food and Agriculture Organization – FAO. United Nations. Available at: [www.fao.org/faostat/en/#data/QA](http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA). Accessed 30 January 2020.

Fritzen, B., Rohn, K., Schnieder, T., Von Samson-Himmelstjerna, G., 2010. Endoparasite control management on horse farms - lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Veterinary Journal*, 42, 79-83.

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

Lackey, B.A., Muldoon, A.E., Jaffe, B.A., 1993. Alginate pellet formulation of *Hirsutella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biological Control*, 3(2), 155-160.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Available at: [www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-ematicas/documentos](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-ematicas/documentos). Accessed 26 January 2020.

Matthews, J.B., 2011. Review Article: HBLB's advances in equine veterinary science and practice – Facing the threat of equine parasitic disease. *Equine Veterinary Journal*, 43, 126-132.

Matthews, J.B., 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(3), 310-315.

Mendoza-De-Gives, P., Davies, K.G., Clarck, S.J., Behnke, J.M., 1999. Predatory behaviour of trapping fungi against of srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology*, 119 (1), 95-104.

Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.B., Tunlid, A. Nematophagous Fungi. In: *Encyclopedia of Life Science(c)*. Weinheim: Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing, 111, 2006.

Oliveira, I.C, Carvalho, L.M., Vieira, I.S., Campos, A.K., Freitas, S.G., Araujo, J.M., Braga, F.R., Araújo, J.V., 2018. Using the fungus *Arthrobotrys cladodes* var. *macroides* as a sustainable strategy to reduce numbers of infective larvae of bovine gastrointestinal parasitic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 158, 46-51.

Paula, A.T., Braga, F.R., Carvalho, L.M., Leis, R.T., Mello, I.N.K., Tavela, A.O., Soares, F.E.F., Junior, A.M., Garcia, J.S., Araújo, J.V., 2013. First report of the activity of predatory fungi on *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Angiostrongylidae) first-stage larvae. *Acta Tropica*, 127(3), 187-190.

Silva, M.E., Braga, F.R., Borges, L.A., Oliveira, P., Lima, W.S., Araújo, J.V., 2015. Producción de conidios y clamidosporas de los hongos *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en diferentes medios sólidos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82, 1-5.

Tavela, A.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Silveira, W.F., Silva, V. H. D., Júnior, M.C., Borges, L.A., Araujo, J.M., Benjamim, L.A., Carvalho, G.R., Paula, A.T., 2013. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 568-572.

Ueno, H., Gonçalves, P.C., 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4.ed. JICA, 166p.

Oorschot, C.A.N, van, 1985. Taxonomy of *Dactylaria* complex, V. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *Studies in Mycology*, 26, 61-96.

Walker, H.L., Connick, W.J., 1983. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed Science*, 31, 333-338.

# **Capítulo 2**

*Arthrobotrys cladodes var macroides (CG 719) na redução ambiental de larvas infectantes de ciatostomíneos*

## **Efeito do fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* (CG 719) na redução ambiental de larvas infectantes de ciatostomíneos**

### **Resumo**

O controle biológico através do uso de fungos nematófagos é uma alternativa sustentável que auxilia no controle das helmintoses gastrintestinais de equinos e possibilitar a redução do uso de anti-helmínticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* (CG 719) em formulação à base de alginato de sódio como alternativa para o controle biológico de ciatostomíneos. Doze éguas com idade média de 24 meses foram divididas aleatoriamente em dois grupos e distribuídas em piquetes infestados por larvas de ciatostomíneos. Os animais do grupo tratado receberam 1g de péletes de alginato de sódio para cada 10kg de peso corporal, duas vezes por semana, por dez meses. No grupo controle, cada animal recebeu 1g de péletes por cada 10kg de peso vivo, sem adição de micélio fúngico. A eficácia do tratamento foi avaliada por meio da contagem de ovos por grama de fezes (OPG), contagem de larvas infectantes (L3) recuperadas de coproculturas e da pastagem, e as suas correlações com o clima. Durante o estudo não foi observada diferença na contagem de OPG e de larvas recuperadas de coproculturas. Maio, junho, novembro e dezembro foram os meses que apresentaram as maiores porcentagens de redução de OPG no grupo tratado em relação ao grupo controle, 46,2%, 24,2%, 41,6% e 29,5% respectivamente. Da mesma forma, não foi observada diferença na redução de lavas recuperadas de pastagem nas distâncias de 0-20 cm e de 20-40 cm dos bolos fecais entre os grupos. Nesse trabalho, o tratamento de equinos com massa micelial do fungo *A. cladodes* var *macroides* (CG 719) em péletes de alginato de sódio por dez meses não foi capaz de reduzir significativamente o número de L3 da pastagem na região sudeste do Brasil.

**Palavras-chave:** Fungos nematófagos, helmintos, parasitas, equinos.

## 2.1 Introdução

Os ciatostomíneos ou pequenos estrôngilos são helmintos que afetam equídeos de todas as idades. São muito prevalentes e apresentam grande potencial patogênico e de adquirir resistência aos anti-helmínticos (Cernea, et al., 2008; von Samson-Himmelstjerna, 2012; Relf et al., 2013; Matthews et al. 2014; Stratford et al. 2014). Nos últimos anos, o problema da resistência antihelmíntica atingiu níveis altos, e por ser uma questão importante no controle de parasitas não pode ser ignorado (Kaplan, 2012; Molento et al., 2012; Peregrine et al., 2014). Assim, uma avaliação dos programas de controle de parasitas deve ser realizada para identificar fatores associados à perda de eficácia (Fritzen et al., 2010).

Do mesmo modo, a busca por estratégias de gestão sustentáveis que reduzam o uso de anti-helmínticos, a seleção de parasitas resistentes, a liberação de produtos químicos no ambiente e que permitam o desenvolvimento da imunidade adquirida devem ser consideradas (Larsen, 1999; Molento, 2009). Assim, o uso de fungos nematófagos, integrados com outras formas de controle, torna-se uma ferramenta valiosa para reduzir o número de larvas infectantes nas pastagens e a reinfecção dos animais (Araújo et al., 2004; Braga et al., 2009; Paz-Silva et al. 2011).

Esses fungos são microrganismos saprófitas e cosmopolitas, encontrados em ambientes ricos em matéria orgânica. São ingeridos e excretados nas fezes, naturalmente, por animais de diferentes espécies durante o pastejo. São classificados como predadores, endoparasitas e ovicidas (Braga e Araújo, 2014). Apresentam a vantagem de passar pelo sistema digestivo de diferentes espécies animais e manter a sua capacidade predatória (Araújo et al., 2000; Oliveira et al., 2018). Entre os predadores, os do gênero *Arthrobotrys* apresentam resultados positivos nos testes *in vitro* e *in vivo* no controle de nematóides parasitos do trato gastrointestinal de animais domésticos (Carvalho et al., 2009).

O objetivo do estudo foi testar a eficácia do fungo *A. cladodes* var. *macroides* (CG 719) formulado em péletes de alginato de sódio no controle biológico de ciatostomíneos em condições de campo.

## 2.2 Material e Métodos

### 2.2.1 Fungo

O fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes* var *macroides* (isolado CG 719), natural de solo brasileiro, foi mantido a 4°C, no escuro, em tubos de ensaio contendo Ágar Fubá (AF 2%) na micoteca do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. O fungo foi inoculado em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo o meio Ágar Água (AA 2%). Após o crescimento por sete dias, fragmentos com aproximadamente 5 mm contendo micélio e esporos foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo 150 ml de meio GPL (glicose, peptona de soja e extrato de levedura) com pH 6,5 para a produção de micélio. Os frascos foram mantidos sob agitação (120 rpm), no escuro a 26°C por 21 dias. Em seguida, o micélio foi incorporado em uma matriz de alginato de sódio de acordo com a técnica descrita por Walker e Connick (1983) modificada por Lackey et al., (1993). Os péletes produzidos apresentavam 30% de umidade.

### 2.2.2 Ensaio Experimental *in vivo*

O experimento foi realizado no setor de equideocultura da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, sudeste do Brasil, (latitude 20° 45' 20" S, longitude 42° 52' 40", de março a dezembro de 2017 e seguiu os procedimentos recomendados pelas normas estabelecidas pelo Comitê de Ética (Protocolo 51/2017), da Universidade Federal de Viçosa.

Doze éguas da raça Bretã, com idade média de 24 meses e peso corporal médio de 290 kg foram previamente vermifugadas com duas doses de abamectina e praziquantel (Aba gel composto®, Ouro Fino) 1,6 g/ 100 kg de peso vivo por via oral. Quinze dias após o tratamento com o anti-helmíntico e confirmada a ausência de ovos de nematoides nas fezes, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos (tratado e controle) com seis animais. Posteriormente, foram alojados em dois piquetes com aproximadamente 1 hectare cada, e compostos por pastagem formada por Tifton 85 (*Cynodon dactylon*) com aproximadamente 70 cm de altura e histórico de pastejo por animais naturalmente infectados por larvas de ciatostomíneos.

Os animais do grupo tratado receberam por via oral, duas vezes por semana, 1 g de péletes de alginato de sódio com o fungo para 10 kg de peso vivo (0,1 g de micélio/ 10 kg de PV) misturados em 2 kg de ração para equinos enquanto os do grupo controle receberam 2 Kg de ração (Dias et al., 2007). Amostras fecais dos animais dos dois grupos foram coletadas semanalmente, às 8 horas de manhã, diretamente da ampola retal de cada égua para a contagem de ovos por grama de fezes (Gordon e Whitlock, 1939) e para a recuperação de L3 obtidas de coproculturas.

As coproculturas foram produzidas com 20g de fezes misturadas com vermiculita industrial autoclavada (Vermiculita®, NS Barbosa Ind. Com., Brasil) e, em seguida, incubadas a 26°C durante quinze dias. As L3 foram recuperadas utilizando o método de Baermann (Ueno & Gonçalves, 2008) e identificadas de acordo com Bevilaqua et al., (1993).

A cada 15 dias, duas amostras de pasto (20 cm e 40 cm de distância dos bolos fecais) foram coletadas dos piquetes dos grupos tratado e controle em zigue-zague a partir de seis pontos alternados, de acordo com Amarante et al., 1996). Amostras de pasto (500g) foram utilizadas para recuperar (L3), seguindo o método descrito por Lima (1989). Posteriormente, as larvas foram examinadas ao microscópio óptico, contadas e identificadas de acordo com Bevilaqua et al., (1953).

As amostras de pasto utilizadas para recuperar as L3 foram colocadas em estufa a 100°C para a obtenção de matéria seca. Os dados obtidos foram transformados em número de larvas por quilograma de matéria seca.

Diariamente, as médias mensais das temperaturas mínima, média e máxima, umidade relativa do ar e precipitação pluvial foram obtidas da estação meteorológica de Viçosa, do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET.

### *2..2.3 Análise dos dados*

Os percentuais de redução das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) e do número de larvas recuperadas das coproculturas de ambos os grupos foram analisados (Mendoza-de-Gives et al., 1999) com a fórmula:

$$\% \text{ Redução} = (XC - XT) / XC \times 100$$

XC= Média do número de ovos do grupo controle

XT= Média do número de ovos do grupo tratado

XC= Média do número de larvas recuperadas no grupo controle

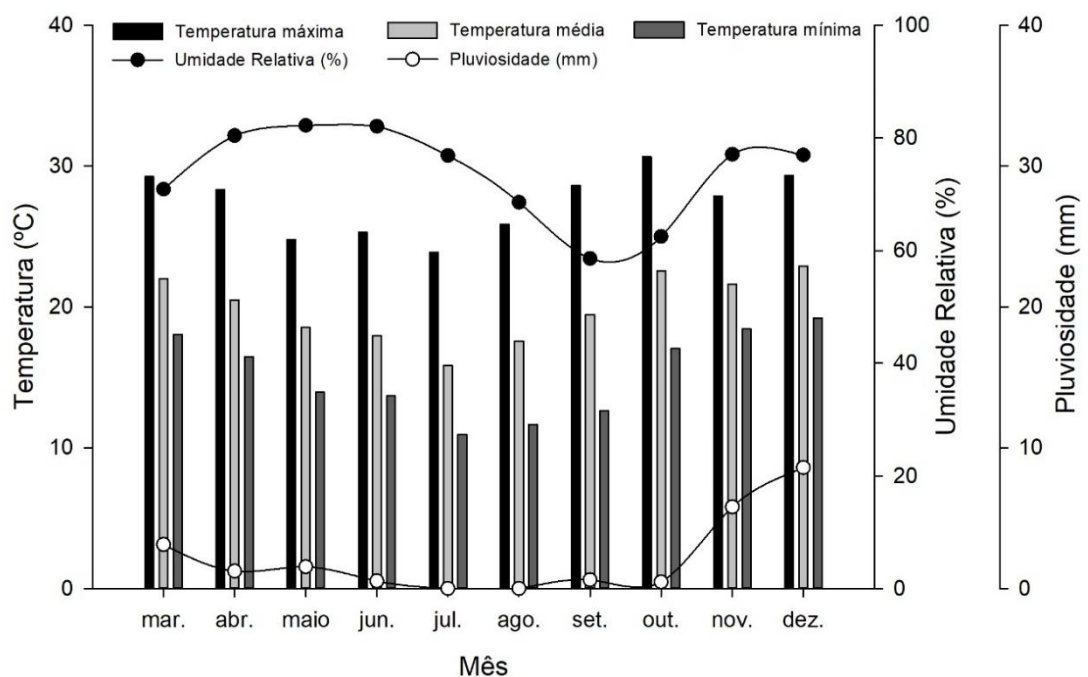
XT= Média do número de larvas recuperadas no grupo tratado

Os números obtidos das contagens de OPG, de L3 recuperadas das coproculturas e o de L3 recuperadas das pastagens dos grupos tratado e controle foram comparados ao longo do período experimental. Os dados foram transformados em  $\log(x + 1)$  e submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (5%) de probabilidade. As análises foram realizadas com o software IBM SPSS Statistics 2.0.

### 2.3 Resultados

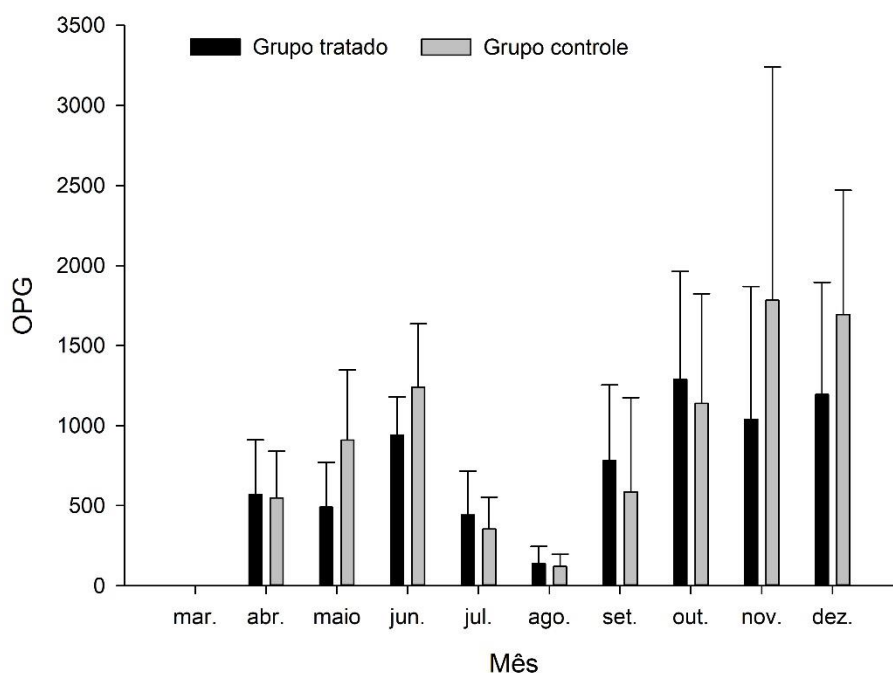
As temperaturas médias mensais variaram de 17,6°C em agosto a 22,9°C em dezembro. A pluviosidade variou de zero em julho e agosto para 8,5 mm em dezembro. A umidade relativa mais baixa foi de 58,6% setembro e a máxima foi de 82,2% em maio (figura 1).

Figura 1 - Temperatura média mensal (°C): mínima, média e máxima, umidade relativa do ar (UR%) e pluviosidade no período de março a dezembro de 2017 em Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.



Em relação aos valores de OPG, ao final do período houve uma redução ( $p>0,05$ ) de 19,9 % entre o grupo tratado e o grupo controle (figura 2). Maio, junho, novembro e dezembro apresentaram as maiores porcentagens de redução de OPG no grupo tratado em relação ao grupo controle: 46,2%, 24,2%, 41,6% e 29,5% respectivamente.

Figura 2 - Médias mensais de ovos por grama de fezes (OPG) dos animais dos grupos controle e tratado com o fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides*. Março a dezembro de 2017, Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.



Em relação à coprocultura, não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os resultados do grupo tratado e o grupo controle ao final do experimento. Somente em maio foi observada uma redução ( $p<0,05$ ) de 57% entre os grupos avaliados (figura 3). Ovos e L3 recuperadas de coproculturas não foram observados nas duas últimas semanas de julho e nas duas primeiras semanas de agosto.

A tabela 1 mostra o número de larvas recuperadas de amostras de forragem nas distâncias de (0 a 20 cm) e (20 a 40 cm) distantes dos bolos fecais. Não houve diferença ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratado e controle nas

amostras coletadas de (0 a 20 cm) e (20 a 40 cm). Diferenças ( $p < 0,05$ ) foram verificadas entre amostras coletadas a 20 cm e 20-40 cm dos bolos fecais nos dois grupos. Apenas larvas de ciatostomíneos foram encontradas nas coproculturas e na forragem durante o período experimental.

Figura 3 - Médias de larvas infectantes (L3) de ciatostomíneos recuperadas das coproculturas dos grupos controle e tratado com o fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides*. Março a dezembro de 2017, Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil. \* Significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

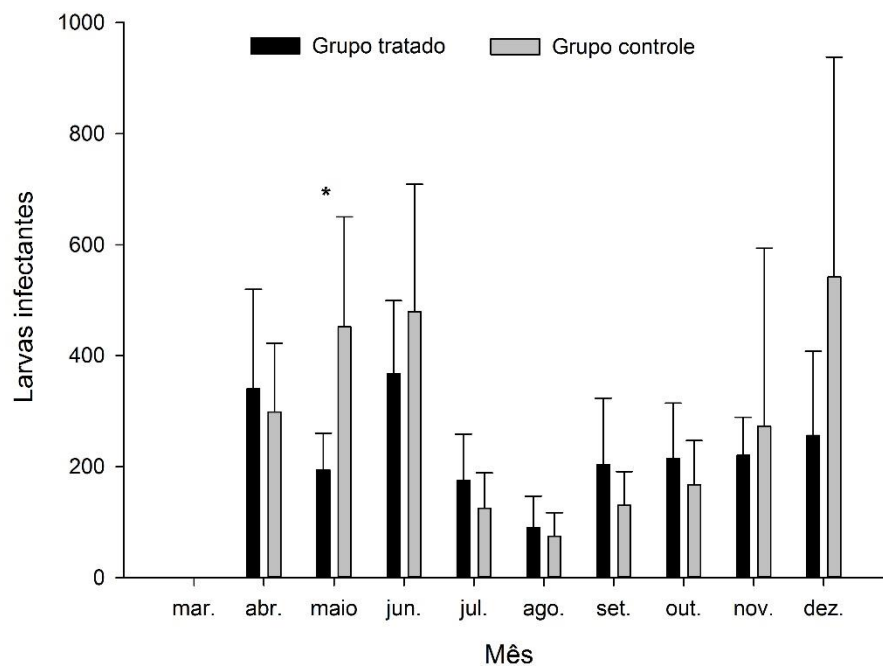


Tabela 1 - Médias e desvio padrão (DP) de larvas infectantes (L3) por quilograma (kg) de matéria seca (MS) de pastagem obtida de 0-20 cm e 20-40 cm de distância dos bolos fecais dos grupos controle e tratado com o fungo *Arthrobotrys cladodes* var *macroides*. Março a dezembro de 2017, Viçosa, Estado de Minas Gerais, sudeste do Brasil.

	Larvas/Kg MS (0-20 cm)		Larvas/Kg MS (20-40 cm)	
	Tratado	Controle	Tratado	Controle
Março	0	0	0	0
Abril	73	145	2	26
Maio	1078	2357	39	41
Junho	381	748	89	470
Julho	72	104	26	23
Agosto	5	124	5	49
Setembro	50	9	4	4
Outubro	226	230	36	39
Novembro	72	84	31	21
Dezembro	54	101	21	38
Média ( $\pm$ DP)	201 <sup>a</sup> $\pm$ 329	390 <sup>a</sup> $\pm$ 724	25 <sup>b</sup> $\pm$ 27	71 <sup>b</sup> $\pm$ 141

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

## 2.4 Discussão

O valor médio de OPG do grupo tratado com o fungo *A. cladodes* comparado ao grupo controle mostrou redução de 19,9%, porém, essa diferença não foi significativa ao final do teste ( $p > 0,05$ ). Esse resultado concorda com resultados apresentados por Perez et al. (2017) e Oliveira et al., (2018) que forneceram os fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys cladodes*, respectivamente, a bovinos.

A ausência de ovos e de L3 recuperadas de coproculturas (Figs. 2 e 3) nas 2 últimas semanas de julho e nas 2 primeiras semanas de agosto

pode ser o resultado da falta de chuva e da baixa umidade registradas. Esse fato pode ter desencadeado o fenômeno da hipobiose, que é uma forma de adaptação em que o parasita sincroniza seu ciclo de vida com as mudanças ambientais ou condições do hospedeiro para garantir a sua sobrevivência (Gibbs, 1982).

As porcentagens de recuperação maiores de ovos e L3 de coproculturas no grupo controle em maio, junho, novembro e dezembro, coincidem com o aumento da umidade relativa e pluviosidade. Isso mostra a influência das condições climáticas sobre o fungo e o desenvolvimento e a sobrevivência de pequenos estrôngilos (Baudena, et al., 2000; Nielsen et al., 2007; Leathwick, et al., 2015). Esses resultados sugerem que L3 de ciatostomíneos presentes na pastagem sofreram ação direta do fungo *A. cladodes* resultando em níveis mais baixos de reinfecções parasitárias.

Ao analisar os dados apresentados (Tabela 1) podemos sugerir que a ação das condições climáticas, como temperatura, umidade relativa e principalmente da pluviosidade, pode ter influenciado no desenvolvimento do fungo, dos estágios de vida livre e a migração para a pastagem (Langrová, et al, 2003; Castro et al., 2003; Cardoso et al., 2009; Couto et al.; 2009). Esses resultados estão de acordo com Braga et al. (2009) que observaram uma migração reduzida de L3 para além de 20 cm de distância dos bolos fecais utilizando o fungo *Duddingtonia flagrans* e com Tavela et al. (2011), que tiveram uma baixa contagem de L3 recuperadas da pastagem em condições de baixa pluviosidade trabalhando com o fungo *Monacrosporium thaumasium*, ambos no controle de ciatostomíneos no sudeste do Brasil. Porém, os trabalhos citados anteriormente e Oliveira et al. (2018) testando o fungo *A. cladodes* em bovinos observaram uma diferença significativa no número médio de larvas recuperadas até 40 cm dos bolos fecais entre grupos de animais tratados com fungos em matriz de alginato de sódio e grupos controle. Contudo, Mendoza-De-Gives et al. (1999) sugerem que variações como essas possam estar relacionadas também à interação molecular entre as armadilhas dos diferentes gêneros, espécies até mesmo de isolados fúngicos e as cutículas dos nematóides, o que pode influenciar na eficiência da captura e predação.

Nesse trabalho, a capacidade pretatória do fungo *A. cladodes* var *macroides* (CG 719) ficou prejudicada em condições ambientais de baixa pluviosidade e umidade relativa. Dessa forma, o tratamento de equinos no sudeste do Brasil com massa micelial desse isolado em péletes de alginato de sódio por nove meses não foi capaz de reduzir significativamente o número de larvas infectantes da pastagem.

## 2.5 Referências

AMARANTE, A.F.T.; PADOVANI, C.R.; BARBOSA, M.A. Contaminação de pastagens por larvas de nematoides gastrintestinais parasitos de bovinos e ovinos em Botucatu-SP. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.5, p.65-73, 1996.

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

BAUDENA, M.A.; CHAPMAN, M.R.; LARSEN, M.; KLEI, T.R. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Veterinary Parasitology*, v.89, n.3, p.219-230, 2000.

BEVILAQUA, C.M.L.; RODRIGUES, M.L.A.; CONCORDET, D. Identification on infective larvae of some common strongyles of horses. *Revue de Medicine Veterinaire*, v.44, n.12, p.989-995, 1993.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; TAVELA, A.O.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, G.R. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.163, p.335-340, 2009.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.98, n.1, p.71-82, 2014.

CARDOSO, E.R.; ASSIS, L.C.; NAHAS, E. Nutrição e crescimento do fungo nematófago *Arthrobotrys oligospora*. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.4, p.267-272, 2009.

CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp: evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. *Journal of Helminthology*, v.83, p.231-239, 2009.

CASTRO, A.A.; OLIVEIRA, C.R.; ANJOS, D.H.; ORNELAS, 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.

CERNEA, M.; MADEIRA DE CARVALHO, L.M.; COZMA, V. Atlas de diagnóstico da estrogilidose equina. Romênia: *Academic Press*, 2008. 119 p.

COUTO, M. C. M., QUINELATO, S., SOUZA, T. M. D., SANTOS, C. N. D., BEVILAQUA, C. M. L., ANJOS, D. H. S.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGUES, M. L. A. Desenvolvimento e migração de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) em gramínea coast cross (*Cynodon dactylon*) em clima tropical, na Baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.18, n.2, p.31-37, 2009.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; BRAGA, F.R.; FONSECA, T.A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodioses. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.28, p.1000-1007, 2007.

FRITZEN, B.; K. ROHN, K.; SCHNIEDER, T.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Endoparasite control management on horse farms – lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Veterinary Journal*, v.42, p.79-83, 2010.

GIBBS, H.C. Mechanisms of survival of nematode parasites with emphasis on hypobiosis. *Veterinary Parasitology*, v.11, n.1, p.25-48, 1982.

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

KAPLAN, R.M.; VIDYASHANKAR, A.N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance *Veterinary Parasitology*, v.186, p.70-78, 2012.

LANGROVÁ, I.; JANKOVSKÁ, I.; BOROVSÍ, M.; FIALA, T. Effect of climatic influences on the migrations of infective larvae of Cyathostominae. *Veterinary Medicine - Czech*. v. 48, n. 1-2, p.18-24, 2003.

LACKEY, B.A.; MULDOON, A.E.; JAFFEE, B.A. Alginate pellet formulation of *Hirsutiella rhossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biological Control*, v.3, p.155-160, 1993.

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

LEATHWICK, D.M.; DONECKER, J.M.; NIELSEN, M.K. A model for the dynamics of the free-living stages of equine cyathostomins. *Veterinary Parasitology*, v.209, n.3-4, p.210-220, 2015.

LIMA, W., 1989. Dinâmica das populações de nematóides parasitos gastrintestinais em bovinos de corte de vida livre, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estágios de vida livre na região do vale do Rio Doce, MG, Brasil. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 78 p.

MATTHEWS, J.B. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v.4, p. 310-315, 2014.

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

MOLENTO, M.B. Parasite control in the age drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*, v.163, p.229-234, 2009.

MOLENTO, M.B.; NIELSEN, M.K.; KAPLAN, R.M. Resistance to avermectin/milbemyacin in equine cyathostomins - current situation. *Veterinary Parasitology*, v.185, p.16-24, 2012.

NIELSEN, M. K.; KAPLAN, R. M.; THAMSBORG, S. M.; MONRAD, J.; OLSEN, S. N. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *The Veterinary Journal*, v.174, n.1, p.23-32, 2007.

OLIVEIRA, I.C.; VIEIRA, Í.S., CARVALHO, L.M.; CAMPOS, A.K.; FREITAS, S.G.; ARAUJO, J.M.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J. V. Reduction of bovine strongilides in naturally contaminated pastures in the southeast region of Brazil. *Experimental Parasitology*, v.194, p.9-15, 2018.

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. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary Parasitology*, v.179, p.277-282, 2011.

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

PÉREZ, D.O.O.; MUÑOZ, B.S.; TORAL, J.N.; ZEBADÚA, M.Á.O.; LÓPEZ, J.L.C.; GARCÍA, M.E.R.; DE GIVES, P.M. Using *Duddingtonia flagrans* in calves under an organic milk farm production system in the Mexican tropics. *Experimental Parasitology*, v.175, p.74-78, 2017.

RELF, V.E., MORGAN, E.R., HODGKINSON, J.E., MATTHEWS, J.B. Helminth excretion with regard to age gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology*, v.140, p.641-652, 2013.

STRATFORD, C.H.; LESTER, H.E.; PICKLES, K.P.; MCGORUM, B.C.; MATTHEWS, J.B. An investigation of anthelmintic efficacy against strongyles on equine yards in Scotland. *Equine Veterinary Journal*, v.46, p.17-24, 2014.

TAVELA, A.O.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAUJO, J.M.; FERREIRA, S.R.; CARVALHO, G.R. Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.175, p.92-96, 2011.

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

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Veterinary Parasitology*, v.185, p. 2-8, 2012.

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

# **Capítulo 3**

*Eficácia in vitro ematicida biológico Rizotec® em destruir ovos  
de Parascaris equorum*

## Nematicida biológico Rizotec® em destruir ovos de *Parascaris equorum*

### Resumo

As helmintoses gastrintestinais são responsáveis por elevadas perdas econômicas na equideocultura mundial. Pesquisas sobre o controle biológico de nematoides parasitas de interesse veterinário têm sido conduzidas na tentativa de auxiliar as medidas de controle convencionais. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia do nematicida biológico Rizotec®, formulado com clamidósporos do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* Pc 10, em destruir ovos de *Parascaris equorum in vitro*. Seis grupos, com seis repetições cada, foram avaliados durante 21 dias. Os testes de parasitismo foram realizados em placas de Petri contendo meio semi-seletivo com diferentes doses de Rizotec®, equivalentes a  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $7,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  clamidósporos e 2000 ovos de *P. equorum*. Cem ovos embrionados de cada placa foram observados através de microscopia óptica nos intervalos de 7, 14 e 21 dias. Os ovos foram classificados em três níveis de efeito: tipo 1, tipo 2 e tipo 3. Aos 21 dias de interação houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do efeito tipo 3 apresentado pelos tratamentos que utilizaram 14,25 mg e 19,0 mg de Rizotec® em comparação ao grupo controle. Foi observada uma tendência de aumento nas percentagens (17,0%, 26,33%, 28,33%, 47,83% e 65,66%) de ovos com esse efeito ao se aumentar a dose do produto. As curvas de regressão para as doses testadas mostraram uma tendência de aumento do efeito lítico tipo 3 com o aumento do tempo de interação. Nesse trabalho, confirmamos a capacidade ovicida do fungo *P. chlamydosporia* isolado Pc 10, e o potencial do produto Rizotec® para ser utilizado no controle biológico de *P. equorum*.

**Palavras-chave:** Clamidósporos, controle biológico, equinos, fungo nematófago, *Pochonia chlamydosporia*.

### 3.1 Introdução

O controle das infecções causadas por helmintos é considerado essencial no manejo de rotina na criação de cavalos. O ascarídeo, *Parascaris equorum*, é um parasito de alta patogenicidade que acomete equinos jovens. Esse verme pode causar baixo crescimento, perda de peso, cólica e morte subsequente à compactação ou perfuração intestinal (Reinemeyer, 2009). Além disso, apresenta elevada prevalência e capacidade de adquirir resistência anti-helmíntica (Von Samson-Himmelstjerna, 2012; Relf et al., 2013; Matthews et al. 2014; Nielsen et al. 2014).

O aumento de espécies de nematóides resistentes aos anti-helmínticos tem determinado a procura por novas abordagens relacionadas ao diagnóstico, profilaxia, tratamento e controle das parasitoses (Fritzen et al., 2010; Raza et al., 2019). Nesse contexto, o controle biológico de nematóides parasitas do trato gastrointestinal de equinos utilizando fungos nematófagos têm sido apresentado como uma alternativa segura e eficaz em diferentes regiões do mundo (Baudena et al., 2000; Araujo et al., 2010; Braga et al., 2010; Jagla et al., 2013).

Vários fatores contribuem para que o fungo *P. chlamydosporia* seja selecionado para uso no biocontrole de nematóides, como a facilidade de acesso a diversos isolados desse fungo, o fácil cultivo em laboratório, a capacidade de produzir clamidósporos e a sua eficácia em destruir ovos. No entanto, apenas alguns isolados estão disponíveis comercialmente (Manzanilla-López et al., 2013). Por essa razão, pesquisas têm sido realizadas para avaliar os seus diversos isolados, substratos para o seu crescimento e o uso de clamidósporos visando o desenvolvimento de produtos biológicos para ajudar no controle de nematóides parasitas de animais e plantas (Dalle-mole-Giaretta et al., 2012).

Estudos com fungos produtores de clamidósporos, estruturas resistentes que permitem que esse organismo sobreviva à passagem pelo TGI de animais e persista no solo em condições adversas também têm sido realizadas amplamente (Campos et al., 2009; Braga et al., 2010; Ferreira et al. 2011, Araujo et al., 2012; Dias et al., 2012; Vieira et al., 2019).

Experimentos *in vitro* e em condições ambientais têm gerado o conhecimento necessário para o desenvolvimento de produtos comerciais. O nematicida biológico Rizotec® é eficaz no controle de nematóides em diversas culturas, especialmente contra o nematóide das galhas, gênero *Meloydogine*. No entanto, testes utilizando esse produto em áreas da medicina veterinária preventiva ainda não têm sido realizados. Por isso, o objetivo do estudo foi avaliar a eficácia do nematicida biológico Rizotec® em destruir ovos de *P. equorum*.

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1 Nematicida biológico

No estudo foi utilizado o nematicida microbiológico Rizotec® (Stoller do Brasil Ltda), formulado com  $5,2 \times 10^7$  clamidósporos/g do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* isolado Pc 10. Registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 5816.

### 3.2.2 Ovos de *Parascaris equorum*

Exemplares adultos de *P. equorum* foram disponibilizados pelo Laboratório de Parasitologia do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Os ovos de *P. equorum* foram obtidos pela dissecação do útero de fêmeas adultas. Posteriormente, os ovos foram lavados em água destilada (10 vezes por 5 min) e centrifugados a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os ovos foram mantidos em água destilada sob refrigeração (4°C) até o seu uso.

### 3.2.3 Teste de parasitismo *in vitro*

O teste foi conduzido de acordo com Araujo et al., (2013). Seis grupos, com seis repetições cada, foram avaliados aos 7, 14 e 21 dias de interação com o Rizotec®. Cada grupo tratado, foi composto por 6 placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo meio semi-seletivo com doses diferentes do produto (1,9 mg, 4,75 mg, 9,5 mg, 14,25 mg e 19,0 mg) equivalentes a  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $7,5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  clamidósporos respectivamente e acrescidas de 2000 ovos de *P. equorum*. O meio semi-seletivo foi escolhido por suprimir fungos de crescimento rápido que inibem

a presença de *P. chlamydosporia* (Gaspard, 1990). O produto foi depositado no centro das placas, as quais foram incubadas em BOD a 26°C, no escuro, por 7 dias. Após o crescimento inicial do fungo, os ovos foram transferidos para a superfície do meio. O grupo controle foi composto por 6 placas contendo 2000 ovos embrionados sem Rizotec®. Posteriormente, as placas foram mantidas em incubadora BOD durante 21 dias.

Cem ovos embrionados de cada placa foram observados em 10 campos aleatórios através de microscopia óptica, com aumento de 100x, após 7, 14 e 21 dias de interação com *P. chlamydosporia*. Os ovos foram classificados quanto ao efeito ovicida causado pelo fungo, segundo os parâmetros estabelecidos por Lýsek, et al. (1982). Efeito tipo 1: efeito lítico sem alteração morfológica da casca do ovo e com hifas aderidas à casca; efeito tipo 2: efeito lítico com alteração morfológica da casca e do embrião, sem penetração de hifas através da casca; e efeito tipo 3: efeito lítico com alteração morfológica da casca e do embrião, com a penetração de hifas e colonização interna do ovo.

Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de KRUSKALL-WALLIS ao nível de significância de 5% e análise de regressão linear.

### 3.3 Resultados

A Tabela 1 mostra os resultados dos efeitos líticos dos tipos 1, 2 e 3 para doses diferentes de Rizotec® de 7, 14 e 21 dias. Os três tipos de efeito lítico foram observados em todos os tratamentos durante o período experimental. Todos os grupos tratados apresentaram uma percentagem de ovos sem interação até o final do teste. No grupo controle os resultados foram negativos devido à ausência de Rizotec®. Com relação ao efeito ovicida tipo 3, foram observadas diferenças ( $p < 0,05$ ) aos 7, 14 e 21 dias utilizando 19,0 mg. Essa diferença também foi percebida aos 21 dias usando 14,25 mg. Entre os tratamentos com 14,25 mg e 19,0 mg não houve diferença ( $p > 0,05$ ) do efeito tipo 3 aos 21 dias de interação. Foi observada uma tendência de aumento nas percentagens (17%, 26,33%, 28,33%, 47,83% e 65,66%) de ovos com esse efeito ao se aumentar a dose do produto.

Tabela 1 - Percentagem de atividade ovicida ( $\pm$  desvio padrão) para os efeitos tipo 1, 2 e 3 em ovos de *Parascaris equorum* após 7, 14 e 21 dias de interação com doses diferentes de Rizotec® (1,9 mg, 4,75 mg, 9,5 mg, 14,25 mg e 19,0 mg).

	Sem interação	Efeito tipo 1 <sup>1</sup>	Efeito tipo 2 <sup>2</sup>	Efeito tipo 3 <sup>3</sup>
<b>Efeito em 7 dias</b>				
Controle	100,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
1,90 mg	93,2 <sup>a</sup> $\pm$ 16,7	1,0 <sup>a</sup> $\pm$ 2,4	1,7 <sup>a</sup> $\pm$ 4,1	4,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 10,2
4,75 mg	66,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 44,4	16,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 21,9	15,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 22,0	1,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 2,5
9,50 mg	94,0 <sup>a</sup> $\pm$ 14,7	2,5 <sup>a</sup> $\pm$ 6,1	3,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,6	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
14,25 mg	71,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 26,2	18,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 15,9	6,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,0	3,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,2
19,00 mg	22,3 <sup>b</sup> $\pm$ 14,9	41,0 <sup>b</sup> $\pm$ 14,0	22,0 <sup>b</sup> $\pm$ 13,1	14,7 <sup>b</sup> $\pm$ 9,0
<b>Efeito em 14 dias</b>				
Controle	100,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
1,90 mg	68,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 38,8	12,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 13,3	10,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 12,9	9,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 15,6
4,75 mg	47,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 41,2	12,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 8,6	15,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 13,8	24,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 23,3
9,50 mg	32,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 17,4	10,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,1	29,3 <sup>b</sup> $\pm$ 9,7	27,5 <sup>b</sup> $\pm$ 13,9
14,25 mg	27,5 <sup>b</sup> $\pm$ 29,7	27,5 <sup>b</sup> $\pm$ 20,1	20,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 17,9	24,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 18,2
19,00 mg	24,3 <sup>b</sup> $\pm$ 27,8	8,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,0	12,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 10,8	55,3 <sup>b</sup> $\pm$ 42,1
<b>Efeito em 21 dias</b>				
Controle	100,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0	0,0 <sup>a</sup> $\pm$ 0,0
1,90 mg	54,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 32,8	14,5 <sup>b</sup> $\pm$ 5,9	13,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 9,7	17,0 <sup>ab</sup> $\pm$ 19,4
4,75 mg	52,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 30,7	10,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 3,1	10,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 6,6	26,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 24,2
9,50 mg	39,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 29,0	15,2 <sup>ab</sup> $\pm$ 14,0	16,8 <sup>ab</sup> $\pm$ 9,6	28,3 <sup>ab</sup> $\pm$ 24,2
14,25 mg	15,3 <sup>b</sup> $\pm$ 5,8	19,7 <sup>b</sup> $\pm$ 8,8	17,2 <sup>b</sup> $\pm$ 5,6	47,8 <sup>b</sup> $\pm$ 18,2
19,00 mg	12,2 <sup>b</sup> $\pm$ 16,9	8,7 <sup>ab</sup> $\pm$ 7,9	13,5 <sup>ab</sup> $\pm$ 11	65,7 <sup>b</sup> $\pm$ 32,2

Percentagens seguidas por letras minúsculas diferentes (a,b) na mesma coluna indicam diferença estatística das médias ( $p > 0,05$ ) pelo teste de KRUSKALL-WALLIS.

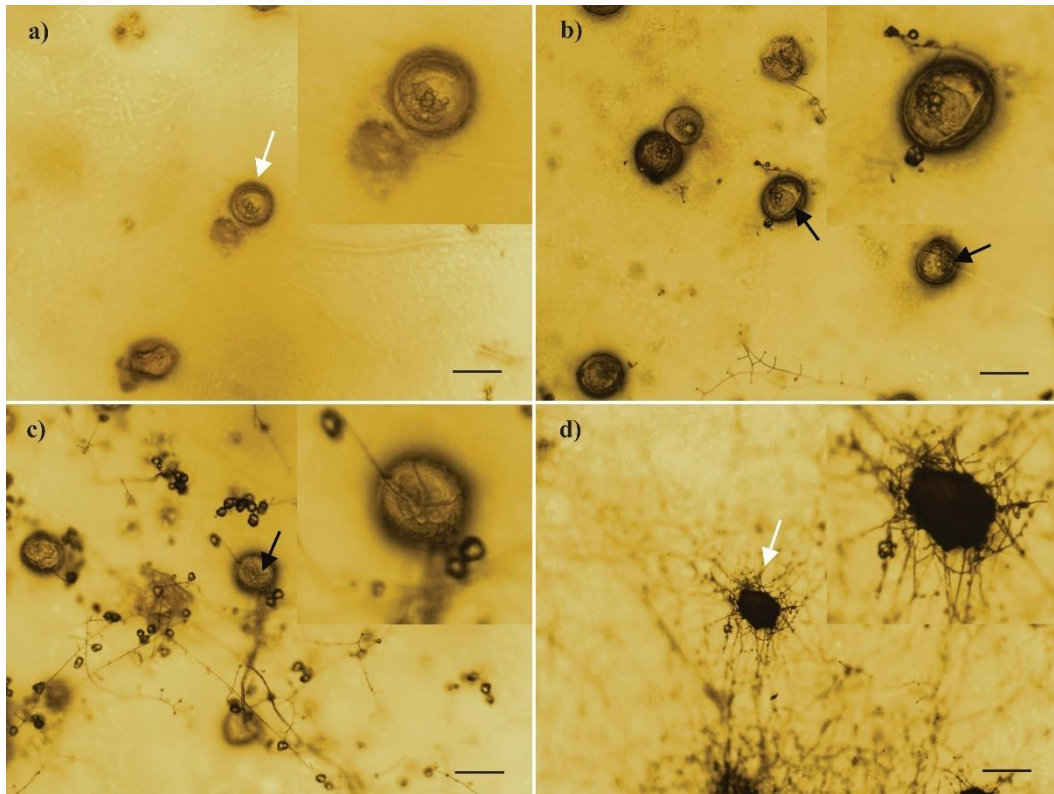
<sup>1</sup>Efeito lítico sem dano morfológico à casca do ovo e com hifas aderidas à casca.

<sup>2</sup>Efeito lítico com alteração morfológica da casca e do embrião, sem penetração de hifas através da casca.

<sup>3</sup>Efeito lítico com alteração morfológica da casca e do embrião, com a penetração de hifas e colonização interna do ovo.

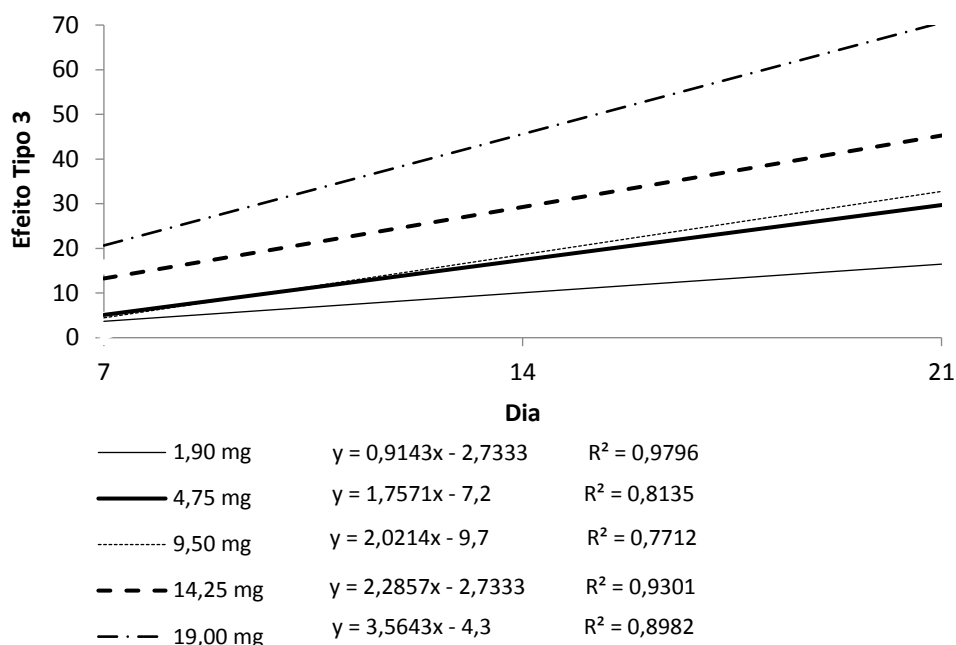
A figura 1 mostra imagens de ovos íntegros e com os efeitos tipos 1, 2 e 3 causados pela interação entre as hifas do fungo *P. chlamydosporia* e ovos embrionados de *P. equorum* através de microscopia óptica, com aumento de 100x.

Figura 1 - Imagens de microscopia óptica com aumento de 100x dos efeitos líticos dos tipos 1, 2, e 3 causados pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos embrionados de *Parascaris equorum* aos 21 dias de interação. (a) Ovo sem interação (seta branca). (b) Efeito tipo 1: hifas do fungo sobre o ovo (setas pretas). (c) Efeito tipo 2: adesão e penetração das hifas (seta preta). (d) Efeito tipo 3: ovo destruído (seta branca). Em detalhe, ampliação da imagem do ovo sem efeito (a) e com efeito lítico (b,c,d). Barras: 100  $\mu$ m



De acordo com a figura 2, as equações de regressão e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para o efeito tipo 3 nas doses 1,9 mg, 4,75 mg, 9,5 mg, 14,25 mg e 19,0 mg de Rizotec<sup>®</sup> aos 21 dias foram respectivamente:  $y = 0,9143x - 2,7333$  e  $R^2 = 0,9796$ ;  $y = 1,7571x - 7,2$  e  $R^2 = 0,81835$ ;  $y = 2,0214x - 9,7$  e  $R^2 = 0,7712$ ;  $y = 2,2857x - 2,7333$  e  $R^2 = 0,9301$ ;  $y = 3,5643x - 4,3$  e  $R^2 = 0,8982$ . As curvas de regressão para as doses testadas mostraram uma tendência de aumento do efeito lítico tipo 3 com o aumento do tempo de interação.

Figura 2 - Curvas de regressão linear para o efeito tipo 3 em ovos de *Parascaris equorum* após 7, 14 e 21 dias de interação com doses diferentes de Rizotec® (1,9 mg, 4,75 mg, 9,5 mg, 14,25 mg e 19,0 mg).



### 3.4 Discussão

A utilização de 19.0 mg de Rizotec® provou ser a melhor opção para reduzir o número de ovos de *P. equorum* devido às diferenças significativas de ovos com o efeito tipo 3 foram encontradas nos dias 7, 14 e 21. O uso de 14,25 mg mostrou esse mesmo resultado aos 21 dias de interação.

A ação lítica desse fungo sobre ovos de nematóides parasitas de plantas e animais tem sido comprovada por diversos trabalhos (Ferreira et al., 2011; Maciel et al., 2012; Manzanilla-López et al., 2013; Dias et al., 2013).

Neste estudo foi observada a presença dos efeitos tipo 1, 2 e 3 durante o período experimental (Tabela 1). Outros trabalhos têm relatado os tipos de efeito condicionado por fungos nematófagos aos ovos de nematóides parasitas. Contudo, a classificação de um fungo como espécie ovicida só acontece se for constatado o efeito tipo 3 durante a infecção dos ovos (Lýsek et al., 1982; Araújo et al., 1995).

Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Braga et al., (2011) ao testar *in vitro* a interação de 1.000, 10.000 e 20.000 clamidósporos de *P. chlamydosporia* (VC4) com ovos de *Taenia taeniaeformis* em ágar fubá. Onde constataram a maior percentagem de ovos com efeito tipo 3 aos 21 dias utilizando 20.000 clamidósporos. Araujo et al. (2013) ao avaliarem os efeitos da interação de diferentes concentrações (1.000, 10.000 e 100.000) de clamidósporos dos isolados (VC1 e VC4) de *P. chlamydosporia* também verificaram maior percentagem de ovos com efeito tipo 3 na concentração mais alta de clamidósporos.

Nesse trabalho, curvas de regressão para as doses testadas aos 7, 14 e 21 dias mostraram uma tendência de aumento do efeito lítico tipo 3 (fig 2), o que pode ser explicado pelo maior tempo de interação entre fungo e ovos. Esse efeito também foi observado por Braga et al. (2008) utilizando os isolados de *P. chlamydosporia* VC1 e VC4 contra ovos de *Fasciola hepática* e Braga et al. (2011) usando diferentes concentrações de clamidósporos do isolado VC4 contra ovos de *Taenia taeniaeformis*. Recentemente, Braga et al. (2016) avaliaram o efeito ovicida do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Contraecum pelagicum* sob diferentes concentrações (500, 1.500, 2.000 e 3.000) de clamidósporos por 7 dias e observaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ) para o efeito tipo 3 entre os grupos tratados e o grupo controle. Porém não observaram diferença ( $p > 0,01$ ) entre os grupos tratados.

Pesquisas recentes têm provado a viabilidade de produtos comerciais formulados com clamidósporos nas áreas agrícola e veterinária. Trabalhos realizados com o Rizotec® (Dallemole-Giaretta et al., 2013; Bontempo et al., 2014, Bontempo et al., 2017) comprovaram a sua capacidade de controlar nematóides parasitas de culturas vegetais com viabilidade econômica. Healey, et al. (2018) mostraram a eficácia do produto Biowarma (*Duddingtonia flagrans* IAH 1297) em reduzir a infestação de pastagens por vermes parasitas de ovinos. Braga, et al., 2020 evidenciaram a eficácia do produto Bioverme (*Duddingtonia flagrans* AC001) na redução da população de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* nas fezes de ovelhas *in vitro*.

Nesse trabalho, confirmamos a capacidade ovicida do fungo *P. chlamydosporia* isolado Pc 10, e o potencial do produto Rizotec® para ser utilizado no controle biológico de *P. equorum*.

### 3.5 Referências

ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, D.M.; FERREIRA, S.R.; SOARES, F.E.; BENJAMIN, L.D.A. Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. *Research in Veterinary Science*, v.93(2), p.803-806, 2012.

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

ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; FERREIRA, S.R.; TAVELA, A.O. Predatory activity of chlamydo-spores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.22 (1), p.171-174, 2013.

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(1), p. 37-42, 1995.

BAUDENA, M.A.; CHAPMAN, M.R.; LARSEN, M.; KLEI, T.R. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Veterinary Parasitology*, v.89(3), p.219-230, 2000.

BONTEMPO, A.F.; FERNANDES, R.H.; LOPES, J.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A. *Pochonia chlamydosporia* controls *Meloidogyne incognita* on carrot. *Australasian Plant Pathology*, 43(4), 421-424, 2014.

BONTEMPO, A.F.; LOPES, E.A.; FERNANDES, R.H.; FREITAS, L.G.D.; DALLEMOLE-GIARETTA, R. Dose-response effect of *Pochonia chlamydosporia* against *Meloidogyne incognita* on carrot under field conditions. *Revista Caatinga*, v.30(1), p.258-262, 2017.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24(8), p.1559-1564, 2008.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.E.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; CAMPOS, A.K.; TAVELA, A.O.; FERREIRA, S.R.; FRASSY, L.N.; ALVES, C.D.F. *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* as a possible biological control agents of *Oxyuris equi* and *Austroxyuris finlaysoni*. *Journal of Helminthology*, v.84, p.21-25, 2010.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; PINTO, P.S.A. Ovicidal activity of different concentrations of *Pochonia chlamydosporia* chlamydo-spores on *Taenia taeniaeformis* eggs. *Journal of Helminthology*, v.85(1), p. 7-11, 2011.

BRAGA, F.R.; SOARES, F.E.F.; SENNA, T.; AYPE, T.H.; FONSECA, L.A.; LACERDA, T.; AGUIAR, A.R.; MAYORGA, L.F.; ARAÚJO, J.V. Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Contraecum pelagicum* eggs. *International Journal of current Microbiology and Applied Sciences*, v.5, p.836-843, 2016.

CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; DIAS, A.S. Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. *Parasitology Research*, v.105(4), p.913, 2009.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; CAVALLIN, I.C., MARMENTINI, G.A., FARIA, C.M.R.; RESENDE, J.T.V. Avaliação de um produto à base de *Pochonia*

*chlamydosporia*, no controle de *Meloidogyne javanica* em alface e cenoura no campo. *Nematropica*, v.43, p.131-137, 2013.

DALLEMOLE-GIARETTA, R.; FREITAS, L.G.; LOPES, E.A.; PEREIRA, O.L.; ZOOCA, R.J.; FERRAZ, S. Screening of *Pochonia chlamydosporia* Brazilian isolates as biocontrol agents of *Meloidogyne javanica*. *Crop Protection*, v.42, p.102-107, 2010.

DIAS, A. S., ARAÚJO, J. V., BRAGA, F. R., ARAUJO, J. M., PUPPIN, A. C., FERNANDES, F. M.; RAMOS, R.F.; BERTONCELI, R.M.; SILVA, R.G.; PERBONI, W.R. Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitology Research*, v.110(2), p.663-667, 2012.

DIAS, A.S.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; PUPPIN, A.C.; PERBONI, W.R. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitology Research*, v.112(6), p.2131-2136, 2013.

FERREIRA, S.R.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; FRASSY, L.N.; FREITAS, L.G. Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. *Tropical Animal Health and Production*, V.43(3), P.639-642, 2011.

FERREIRA, S.R.; DE ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; FRASSY, L.N.; FERREIRA, A.S. Biological control of *Ascaris suum* eggs by *Pochonia chlamydosporia* fungus. *Veterinary Research Communications*, v.35(8), p.553-558, 2011.

FRITZEN, B.; ROHN, K.; SCHNIEDER, T.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Endoparasite control management on horse farms—lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine veterinary journal*, v.42(1), p.79-83, 2010.

GASPARD, T.; JAFFEE, B.A.; FERRIS, H. Association of *Verticillium chlamydosporium* and *Paecilomyces lilacinus* with root-knot nematode infested soil. *Journal of Nematology*, v.22(2), p.207, 1990.

HEALEY, K.; LAWLOR, C.; KNOX, M.R.; CHAMBERS, M.; LAMB, J.; GROVES, P. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Pasture larval studies in horses, cattle and goats. *Veterinary Parasitology*, v.258, p.124-132, 2018.

JAGŁA, E.; JODKOWSKA, E.; POPIOŁEK, M. Alternative methods for the control of gastrointestinal parasites in horses with a special focus on nematode predatory fungi: a review. *Annals of Animal Science*, v.13(2), p.217-227, 2013.

LÝSEK, H.; FASSATIOVÁ, O.; PINEDA, N.C.; HERNÁNDEZ, N.L. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitologica*, v.29(3), p.265-270, 1982.

MACIEL, A.S.; FREITAS, L.G.; FIGUEIREDO, L.D.; CAMPOS, A.K.; MELLO, I.N.K. Antagonistic activity of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on mature and immature *Toxocara canis* eggs. *Parasitology*, v.139(8), p.1074-1085, 2012.

MANZANILLA-LOPEZ, R. H., ESTEVES, I., FINETTI-SIALER, M. M., HIRSCH, P. R., WARD, E., DEVONSHIRE, J., & HIDALGO-DÍAZ, L. *Pochonia chlamydosporia*: advances and challenges to improve its performance as a biological control agent of sedentary endoparasitic nematodes. *Journal of Nematology*, v.45(1), p.1, 2013.

MATTHEWS, J.B. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v.4(3), p.310-315, 2014.

NIELSEN, M.K.; REINEMEYER, C.R.; DONECKER, J.M. LEATHWICK, D.M.; MARCHIONDO, A.A.; KAPLAN, R.M. Anthelmintic resistance in equine parasites - Current evidence and knowledge gaps. *Veterinary Parasitology*, v.204(1-2), p.55-63, 2014.

RAZA, A.; QAMAR, A.G.; HAYAT, K.; ASHRAF, S.; WILLIAMS, A.R. Anthelmintic resistance and novel control options in equine gastrointestinal nematodes. *Parasitology*, v.146(4), p.425-437, 2019.

REINEMEYER, C.R. Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites & Vectors*, v.2, S8, 2009.

RELF, V.E.; MORGAN, E.R.; HODGKINSON, J.E.; MATTHEWS, J.B. Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology*, v.140(5), p.641-652, 2013.

VIEIRA, Í.S.; DE CASTRO OLIVEIRA, I.; CAMPOS, A.K.; DE ARAÚJO, J.V. (2019). Association and predatory capacity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Arthrobotrys cladodes* in the biological control of parasitic helminths of bovines. *Parasitology*, v.146(10), p.1347-1351, 2019.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Veterinary Parasitology*, v.185(1), p.2-8, 2012.