

ALESSANDRA TEIXEIRA DE PAULA

**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Angiostrongylus cantonensis* UTILIZANDO
FUNGOS NEMATÓFAGOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS–BRASIL
2014

ALESSANDRA TEIXEIRA DE PAULA

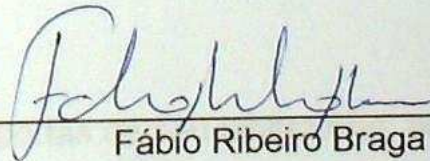
**CONTROLE BIOLÓGICO DE *Angiostrongylus cantonensis* UTILIZANDO
FUNGOS NEMATÓFAGOS**

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

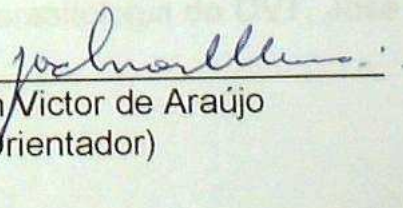
APROVADA: 19 de fevereiro de 2014.



Leandro Licursi de Oliveira



Fábio Ribeiro Braga
(Coorientador)



Jackson Victor de Araújo
(Orientador)

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

T

P324c
2014 Paula, Alessandra Teixeira de, 1982-
Controle biológico de *Angiostrongylus cantonensis*
utilizando fungos nematófagos / Alessandra Teixeira de Paula. –
Viçosa, MG, 2014.
x, 50f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Inclui apêndices.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Angiostrongylus cantonensis*. 2. Controle biológico.
3. Fungos nematófagos. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 632.96

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e iluminar meus caminhos, permitindo que meus objetivos sejam alcançados... Senhor, obrigada por mais esta conquista;

Ao meu pai pelo carinho, dedicação, paciência, incentivo e pelo explícito orgulho demonstrado ao longo desses anos, meu eterno agradecimento por tudo;

À minha mãe e irmãs pela colaboração e confiança;

À minha avó Maria (*in memoriam*), pela sua fé que comovia a todos, e que a acompanhou até seus últimos instantes de vida, a ela essa minha conquista eu dedico;

À Universidade Federal de Viçosa, em particular ao Departamento de Veterinária pela oportunidade de poder aprimorar meus conhecimentos;

Ao Professor Jackson Victor de Araújo, pela orientação, oportunidade e confiança depositada;

Ao nosso co-orientador Fabio Ribeiro Braga pelos ensinamentos, orientação e sugestões na execução dos experimentos e escrita dos artigos;

Aos pesquisadores da Fiocruz, Dr. Arnaldo Maldonado e Dr. Juberlan Garcia, pela confiança e colaboração nesse projeto;

Ao professor Leandro Licursi, por ter aberto as portas de seu laboratório, pelos ensinamentos e por abraçar a nossa causa com tanto entusiasmo e disposição;

Aos funcionários do laboratório de Parasitologia do DVT, José Geraldo, Ademir e Samuel pela colaboração;

Aos amigos do laboratório de Parasitologia Veterinária, Rosane, Wendee, Lorendane, Juliane, Tavela, Anderson, Guedes e aos estagiários que por lá passaram, obrigada a todos pela cumplicidade e companheirismo;

À todos os funcionários do Departamento de Veterinária, em especial as secretárias da Pós-Graduação Rosi e Beth, pelo carinho e gentileza.

Aos meus amigos pela torcida e compreensão;

À CAPES pelo suporte financeiro, que fez com que essa caminhada fosse um pouco mais tranquila.

À todos, a minha eterna gratidão

BIOGRAFIA

ALESSANDRA TEIXEIRA DE PAULA, Filha de Vicentina Teixeira de Paula e Alvino de Paula, nasceu em Viçosa - Minas Gerais, em 27 de Janeiro de 1982.

Em Dezembro de 2009 graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade do Grande Rio (Unigranrio) no Rio de Janeiro.

Em Setembro de 2010, iniciou o curso de Especialização em Ciências do Laboratório Clínico e Diagnóstico *in vitro* na Universidade do Grande Rio (Unigranrio) no Rio de Janeiro, tendo concluído em Dezembro de 2011.

Em Fevereiro de 2012, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária pelo Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa/ Minas Gerais, submetendo-se à defesa de dissertação em Fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. O parasito e a Doença.....	2
2.2. Situação da Doença no Brasil.....	4
2.3. Controle Biológico.....	6
2.4. Fungos Nematofagos.....	6
2.5. <i>Arthrobotrys</i> spp.....	9
2.6. <i>Duddingtonia</i> spp.....	10
2.7. <i>Monacrosporium</i> spp.....	10
2.8. Referências.....	11
3.0.	
OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo	
Geral.....	23
3.2. Objetivo	
Específico.....	23
4. CAPÍTULO ÚNICO: First report of the activity of predatory fungi on <i>Angiostrongylus cantonensis</i> (Nematoda: Angiostrongylidae) first- stage larvae	25

4.1. Abstract.....	26
4.2. Introduction.....	27
4.3. Materials and Methods.....	28
4.4. Obtaining of the <i>Angiostrongylus cantonensis</i> larvae.....	28
4.5. Experimental assay.....	29
4.6. Statistical analysis.....	29
4.7. Results.....	30
4.8. Discussion.....	30
5. CONCLUSÃO.....	32
6. REFERENCES.....	32

RESUMO

PAULA, Alessandra Teixeira, Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Controle biológico de *Angiostrongylus cantonensis* utilizando fungos nematófagos.** Orientador: Jackson Victor de Araújo. Co-orientador: Fabio Ribeiro Braga.

As parasitoses, do ponto de vista médico e social, representam importantes problemas de saúde pública. No Brasil, em média um terço da população vive em áreas com risco de transmissão e ocorrência de doenças parasitárias. A falta de saneamento básico, bem como fatores ambientais próprios de clima tropical, desigualdade das condições socioeconômicas dos indivíduos e a falta de informação favorecem sua ocorrência. Os processos de colonização, estabelecimento de novas rotas de comércio e migração humana, contribuíram para a introdução de patógenos transportados por seus hospedeiros para outras regiões. Dessa forma, várias espécies se encontram fora de sua área de origem. O parasito *Angiostrongylus cantonensis* e o caramujo exótico *Achatina fulica*, são dois exemplos de organismos que foram introduzidos no Brasil. *A. fulica* é um dos hospedeiros intermediários do parasito *A. cantonensis*, responsável por causar em humanos, doença conhecida como meningoencefalite eosinofílica, podendo levar indivíduos parasitados a óbito. Em várias regiões do país, foi confirmada a presença deste parasito ocorrendo naturalmente, bem como casos de humanos infectados. Dessa forma, medidas de controle alternativo, são importantes para evitar sua dispersão. Nesse contexto foi avaliada a capacidade predatória de oito isolados fúngicos pertencentes às espécies *Duddingtonia flagrans* (isolados: AC001, CG768 e CG722), *Monacrosporium thaumasium* (isolado: NF34), *M. sinense* (isolado: SF53) e *Arthobotrys robusta* (isolado: I31), *A. cladodes* (isolado: CG719) e *A. conoides* (isolado: I40) sobre larvas de primeiro estágio (L_1) de *A. cantonensis* em condições laboratoriais. Foram formados nove grupos: oito grupos tratados com os diferentes isolados, e um grupo controle (sem fungos). Os grupos tratados continham 1000 conídios dos isolados fúngicos e 1000 L_1 de *A. cantonensis* em placa de Petri contendo o meio Agar-água 2% (AA2%). O

grupo controle continha apenas 1000 L₁ de *A. cantonensis* em AA2%. *Evidências da atividade predatória de todos os isolados fúngicos testados, foram observadas ao final de sete dias do experimento, através da recuperação das larvas (L₁) não predadas, sendo observados os seguintes percentuais de redução com os respectivos isolados: AC001 (82,8%); CG768 (71,0%); CG722 (72,8%); NF34 (86,7%), SF53 (89,7%); I40 (48,3%), CG719 (84,7%) e I31 (80,4%). Não houve diferença (p>0,01) entre a ação dos isolados utilizados ao final de sete dias, no entanto, foi observado diferença (p<0,01) em relação ao grupo controle. Os resultados demonstraram que os fungos pertencentes aos gêneros *Duddingtonia* (AC001, CG768 E CG722), *Monacrosporium* (NF34 e SF53) e *Arthrobotrys* (I31 e CG719), poderiam ser utilizados no controle biológico, uma vez que estes foram capazes de reduzir a população de larvas (L₁) de *A. cantonensis in vitro*.*

ABSTRACT

PAULA, Alessandra Teixeira, Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. Biological control of *A. cantonensis* using nematophagous fungi. Adviser: Jackson Victor de Araújo. Co-advisor: Fabio Ribeiro Braga.

The parasitosis, in a medical and social standpoint, presents important public health problems. In Brazil, an average of a third of population lives in areas with risk of transmission and occurrence of parasitic diseases. The lack of basic sanitation, as well as environmental factors particular of tropical climates, inequality of the socioeconomic conditions of the individuals and the lack of information are factors that favor its occurrence. The colonization process, establishment of new routes of trade and human migration, contributed to the introduction of pathogens transported by their hosts to other regions. This way, various species found out of their origin area. The parasite *Angiostrongylus cantonensis* and the exotic snail *Achatina fulica* are two examples of organisms that were introduced in Brazil. *A. fulica* is one of the intermediate hosts of the parasite *A. cantonensis*, responsible for cause in humans, disease known as eosinophilic meningoencephalitis, may lead parasitized individuals to death. In various regions of the country, was confirmed the presence of this parasite naturally occurring, as well as cases of infected humans. This way, measures of alternative control, are important to avoid its dispersion. In this context was evaluated the predatory capability of eight fungal isolates belong to the species *Duddingtonia flagrans* (isolated: AC001, CG768 and CG722), *Monacrosporium thaumasium* (isolated: NF34), *M. sinense* (isolated: SF53) and *Arthobotrys robusta* (isolated: I31), *A. cladodes* (isolated: CG719) and *A. conoídes* (isolated: I40) on first larvae stage (L_1) of *A. cantonensis* in laboratory conditions. Were formed nine groups: eight groups treated with the different isolated and one control group (without fungi). The groups treated contained 1000 conidia of isolated fungal and 1000 L_1 of *A. cantonensis* in Petri dish containing Agar-water 2% (AA2%). The control group contained only 1000 L_1 of *A. cantonensis* in AA2%. Evidence of predatory activity of all fungal isolates tested could be observed at the end of seven days of the experiment through the recovery of

non-predated L₁, where were observed the following percentage of reduction of L₁ with the respective isolates: AC001 (82,8%); CG768 (71,0%); CG722 (72,8%); NF34 (86,7%), SF53 (89,7%); I40 (48,3%), CG719 (84,7%) and I31 (80,4%). No difference was observed ($p>0,01$) between the action of the isolated used in the end of seven days, however, was observed difference ($p<0,01$) compared with the control group. The results observed demonstrated that the fungi belonged to the genus *Duddingtonia* (AC001, CG768 and CG722), *Monacrosporium* (NF34 and SF53) and *Arthrobotrys* (I31 and CG719), could be used in biological control, once that these were capable of reduce the population of larvae (L₁) of *A. cantonensis in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

As parasitoses, do ponto de vista médico e social, representam importantes problemas de saúde pública. Estas infecções resultam em danos para o hospedeiro, que se manifestam de formas variadas, que além de ameaçarem constantemente a vida e o bem-estar de grande parte da população, causam consideráveis perdas econômicas com assistência médica, redução da produtividade ou incapacitação para o trabalho (Rey.,1991; Neves et al., 2005). No Brasil a elevada prevalência de parasitoses também não deixa de ser um dos mais representativos problemas de saúde pública. Em média, um terço da população brasileira vive em áreas com risco de transmissão, locais onde as condições higiênicas da população são mais precárias, sendo esta condição favorável a disseminação dos parasitos. Outros fatores como os ambientais, próprios de clima tropical, a desigualdade das condições socioeconômicas dos indivíduos e falta de informação também favorecem para a ocorrência de doenças parasitárias (Soares e Canto., 2005).

Devido ao processo de colonização, do estabelecimento de novas rotas de comércio e migração humana, houve contribuições decisivas para a introdução de patógenos transportados por seus hospedeiros, dessa forma, várias espécies se encontram fora de sua área de origem (Hinrichsen et al., 2005). Um exemplo é o caramujo exótico *Achatina fulica*, considerado como uma das cem espécies invasoras, este molusco é originário do leste da África, e atua como um dos hospedeiros intermediário do parasito *Angiostrongylus cantonensis* (Alowe, e Boudjelas, 2004; Taylor et al., 2010). Sua introdução no Brasil ocorreu em 1988 numa feira de agricultura no Paraná, como uma alternativa econômica para substituir a espécie comestível *Helix aspersa* (Muller, 1774), o verdadeiro *escargot* (Kosloski e Fischer., 2002; Teles, e Fontes., 2002). Desde então, *A. fulica*, se tornou uma praga sendo encontrado distribuído em 25 dos 26 estados brasileiros causando incômodos às comunidades afetadas e prejuízos econômicos, tanto os relacionados á saúde humana quanto à agricultura de subsistência (Fischer e Colley., 2004; Zanol et al., 2010).

A meningoencefalite eosinofílica, doença causada pelo parasito *A. cantonensis*, pode causar a morte de indivíduos parasitados (Chen., 1935; Dougherty., 1996). Há relatos da presença deste parasito na Ásia, Ilhas do Pacífico, America do Norte e América do Sul (Alicata, 1962; Koo et al.,1988; Tsai et al., 2001; Diaz., 2008). Nesse sentido, o controle biológico utilizando fungos nematófagos, é uma alternativa viável que pode ser utilizado no controle de parasitos potencialmente zoonóticos, e vem apresentando bons resultados quando são utilizados tanto em condições laboratoriais quanto a campo, demonstrando ser um bom agente controlador de helmintos de importância tanto para a saúde pública, quanto para a Medicina Veterinária (Araújo et al., 2004c; Carvalho et al., 2009; Braga et al., 2010a, 2013a; Tavela et al., 2012).

Fungos nematófagos são organismos saprófitas presentes naturalmente no ambiente, capazes de atuar como antagonista de nematóides, promovendo sua captura e destruição. São encontrados em grande quantidade em matéria orgânica em decomposição (Araújo., 2004d; Braga et al., 2007).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O parasito e a doença

A.cantonensis é um nematóide encontrado parasitando artérias pulmonares de roedores (*Rattus rattus* e *R. norvegicus*). As fêmeas quando adultas, depositam seus ovos nestes órgãos (Taylor., 2010). Após eclosão, as larvas de primeiro estágio (L₁), são liberadas e migram para a faringe do roedor, sendo em seguida deglutidas e eliminadas junto às fezes.

No ambiente externo, as larvas (L₁) podem ser ingeridas por moluscos como *A. fulica*, *Bradybaena similaris*, *Subulina octona*, além de lesmas dos gêneros *Veronicella*, *Limax* e *Deroceras* (Malek e Cheng., 1974), que atuam como hospedeiros intermediários. As larvas podem até mesmo penetrar no tecido destes moluscos, e em um período de vinte dias ocorrem duas mudas, e desta forma a larva alcança a fase de larva de terceiro estágio (L₃), sendo esta infectante para os hospedeiros vertebrados. O ciclo de vida se completa quando roedores ingerem os moluscos infectados com as larvas (L₃). Essas

larvas vão penetrar pela parede intestinal do roedor, caindo na corrente sanguínea e alcançando a circulação pulmonar a partir do coração, desta forma as larvas alcançam o cérebro, onde ocorrem mais duas mudas, atingido a larva o estágio de adulto jovem (L₅). Estes adultos jovens migram em seguida para as artérias pulmonares onde alcançam a maturidade sexual, ocorrendo eliminação de ovos pelas fêmeas, tendo início um novo ciclo de vida. As larvas de primeiro estágio (L₁), podem ser encontradas nas fezes dos roedores em aproximadamente 42 dias após a exposição dos roedores às larvas infectantes (Hung e Chen.,1988; Wang et al., 2008; Taylor., 2010; Dorta-Contreras., 2007; Thiengo et al., 2013).

Humanos assim como outros mamíferos, é um hospedeiro acidental adquirindo a infecção através da ingestão de moluscos infectados; vegetais e/ou frutas contaminadas com o muco proveniente dos moluscos contendo as larvas infectantes; pela ingestão de hospedeiros paratênicos como: camarões de água doce, caranguejos e anfíbios contaminados consumidos crus ou mal cozidos e até mesmo por meio da ingestão de água de chuva onde exista a presença deste nematóide (Kim et al., 2002; Toma et al., 2002; Neuhaus et al., 2007; Slom e Johnson., 2003).

A meningoencefalite eosinofílica, é a principal manifestação clínica da doença, considerada importante e algumas vezes fatal. A causa mais comum, é a invasão do sistema nervoso central pelas larvas, que após serem ingeridas migram para o cérebro e medula espinhal, onde passam por duas mudas, alcançando a fase de larva de quinto estágio (L₅), iniciando uma resposta inflamatória que geralmente causa sua morte. (Alicata., 1988; Dorta-Contreras., (2007). A doença é definida pela presença de pelo menos 10 eosinófilos por ml ou número correspondente a 10% de eosinófilos na contagem total de leucocitos presentes no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Ciaravolo et al., 2010), sendo este percentual significativamente maior que o percentual encontrado no sangue periférico de indivíduos parasitados., (Sugaya e Yoshimura., 1988; Hwang e Chen., 1991; Carlisle et al. 1998).

As manifestações clínicas desenvolvem-se de dois a 35 dias após a ingestão das larvas. Os indivíduos parasitados normalmente apresentam fortes dores de cabeça que é o sintoma clínico mais comum, cuja origem é devido ao aumento da pressão intracraniana causado pela inflamação provocada pela

presença das larvas no Sistema Nervoso Central (SNC), cujo alívio pode ser obtido através de repetidas punções lombares visando diminuir a pressão intracraniana (Kuberski et al.,1979; Tsai et al.,2001; Graeff-Teixeira et al., 2009). Outros sintomas como rigidez na nuca, paralisia facial, náuseas, febre e fadiga, podem ser observados, as larvas também podem migrar para os olhos, causando descolamento de retina ou hemorragia intra-ocular (Koo et al. 1988; Alicata.,1962; Sawanyawisuth et al., 2007; Jitpimolmard et al., 2007; Er-hu. et al., 2008). O indivíduo pode ainda apresentar sinais neurológicos mais graves, como convulsões e coma, podendo evoluir para óbito, como casos observados por Dorta-Contreras., (2007) e Lima et al., (2009). Segundo Dorta-Contreras et al., (2007), é necessário que países onde têm sido relatados casos iniciais e aqueles com outras evidências, estejam em alerta para a propagação desta doença.

Com relação ao uso de anti-helmínticos para o tratamento, estudos com infecções experimentais e também registros de casos isolados indicam que a morte das larvas de *A.cantonensis* provavelmente induz ao aumento da inflamação, levando ao agravamento da doença (Wang et al., 2006; Leone et al., 2007). Desta forma, considerando que em uma fase do seu ciclo evolutivo as larvas do parasito *A. cantonensis* se encontram no ambiente, medidas alternativas para o seu controle são importantes. Nesse sentido a utilização de fungos nematófagos no controle biológico deste parasito é sugerida.

2.2. Situação da doença no Brasil

O parasito *A. cantonensis*, foi provavelmente introduzido no Brasil, através de roedores infectados que migraram dentro dos navios. (Caldeira et al., 2007; Yousif e Ibrahim, 1978; Foranda et al., 2010). Trabalhos publicados recentemente confirmam a presença deste parasito em várias regiões do país, infectando naturalmente moluscos e roedores, bem como casos de humanos parasitados. O primeiro relato da presença do parasito *A. cantonensis* no Brasil foi feito em 2007 nas cidades de Cariacica e Vila Velha ambas no Espírito Santo, onde três indivíduos deram entrada em hospitais locais apresentando

sinais clínicos compatíveis com a meningoencefalite eosinofílica, e durante anamnese, foi confirmada a ingestão de caramujos encontrados nos arredores de suas residências. Diante do ocorrido, moluscos e fezes de roedores foram coletados nestas localidades, sendo dessa forma constatada a ocorrência de ciclo do *A. cantonensis* (Caldeira et al., 2007).

Em 2008, mais dois casos da doença foram relatados nas cidades de Escada e Olinda, no estado de Pernambuco. A paciente residente na cidade de Olinda apresentou sinais clínicos e neurológicos graves, vindo a falecer. Moluscos foram coletados nas proximidades das residências desses pacientes, sendo confirmada a presença do parasito (Lima et al., 2009; Thiengo., 2010). Também há relatos da presença de *A. cantonensis* ocorrendo naturalmente nas cidades de Barra do Piraí e São Gonçalo no estado do Rio de Janeiro, assim como na cidade de Joinville em Santa Catarina, o que ficou constatado pela análise realizada em moluscos coletados nessas cidades (Maldonado et al., 2010). Ainda em 2010, foram registrados os primeiros casos de meningoencefalite eosinofílica na região sudeste, onde cinco indivíduos residentes no estado de São Paulo, (sendo quatro da mesma família) apresentaram sintomatologia compatível com a doença (Ciaravolo et al., 2010). Recentemente mais um caso foi relatado no estado, onde um garoto de 11 anos de idade foi hospitalizado apresentando dores de cabeça que já persistiam por sete dias, distúrbios visuais e outros sinais clínicos compatíveis com a doença, sendo esta confirmada após exames laboratoriais (Espírito-Santo., 2013). A presença de *A. cantonensis*, também foi confirmada nas cidades de Guamá e Jurunas no estado do Pará (Moreira et al., 2013), e em Porto Alegre no estado do Rio Grande do Sul (Cognato et al., 2013), onde foram encontrados roedores naturalmente infectados. Registros da presença do *A. cantonensis* em várias regiões do Brasil indicam sua dispersão, aumentando o risco de infecção para a população, sendo dessa forma a meningoencefalite eosinofílica causada por *A. cantonensis*, um problema de saúde pública.

2.3. CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico é baseado na ação de antagonistas presentes naturalmente no ambiente, sem a necessidade de interferência humana (Araújo et al., 2004d). Na ausência destes, uma população de um determinado organismo poderia aumentar consideravelmente. Na prática, o controle biológico não atua sobre estágios internos de parasitos, contudo concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais, além disso, causam menos efeitos negativos no ambiente quando comparados aos métodos químicos. Os microrganismos selecionados como antagonistas naturais devem possuir especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado (Gronvold et al., 1996). Diferentes organismos têm sido relatados como antagonistas de nematóides. Entre os vários grupos de microrganismos antagonistas de helmintos, estão os protozoários, ácaros, nematóides, vírus, bactérias e fungos (Gronvold., et al., 1996), sendo que somente algumas espécies de fungos e bactérias têm apresentado potencial para utilização em programas de controle biológico de nematóides (Mendoza-de-Gives., 1999).

2.4 FUNGOS NEMATÓFAGOS

Fungos nematófagos, são antagonistas naturais de nematóides, presentes naturalmente no ambiente, são cosmopolitas ocorrendo em solos naturais, solos agricultáveis e em todo tipo de matéria orgânica em decomposição (Van Ooij., 2011). São organismos saprófitas, mundialmente estudados e os mais promissores para serem utilizados no controle biológico, pois estão em abundância no solo podendo utilizar vários substratos orgânicos; por sua capacidade de capturar nematóides no ambiente através de suas armadilhas que são encontradas ao longo de suas hifas e por serem encontrados em diferentes habitats e micro-habitats, o que faz com que aumente a chance de interação destes organismos com as larvas de nematóides, sendo dessa forma capaz de reduzir efetivamente populações de

nematóides a campo e em condições laboratoriais (Stirling., 1991; Larsen., 1999; 2000; Mota et al., 2002).

São na sua maioria mitospóricos, pertencentes a divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae. Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzindo-se agamicamente por esporos exógenos, que são formados sobre ramificações do micélio (Drechsler, 1937). Compreendem mais de 700 espécies com a capacidade de predação de nematóides e utilizá-los como fonte de nutrientes (Van Ooij., 2011). De acordo com seu modo de ação, esses fungos são divididos em três grupos: Fungos oportunistas (ou ovicidas), endoparasitos e predadores (Silva et al., 2009). Os fungos nematófagos pertencentes ao grupo dos oportunistas (parasitos de ovos) possuem hifas com capacidade de penetrar a casca do ovo, através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior (Morgan-Jones e Rodríguez-Kábana, 1988). Os fungos endoparasitos são capazes de infectar os nematóides através de esporos, que uma vez ingeridos desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno da larva. Estes fungos não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis ou conidióforos contendo esporos. Os fungos incluídos dentro do grupo dos predadores são os organismos antagonistas mais pesquisados, pois têm mostrado serem capazes de reduzir efetivamente populações de nematóides em condições de laboratório e a campo, além de possuírem a vantagem de apresentar maior potencial de industrialização (Larsen., 1999).

A mudança da fase saprofítica para a fase parasitária ocorre pela diferenciação morfológica com a formação das armadilhas, após captura das larvas, os fungos se alimentam de seu conteúdo interno. Essa condição é influenciada por fatores bióticos e abióticos e proporciona vantagem nutricional para estes organismos no solo (Nordbring-Hertz et al., 2006).

Podem apresentar esporos bastante diversificados no tamanho, coloração, forma e resistência no ambiente. A maioria apresenta esporos secos, emergindo de estruturas de frutificação, denominadas conidióforos, essenciais na dispersão aérea dos conídios. Os conidióforos crescem verticalmente, em direção perpendicular ao substrato o qual o isolado foi

cultivado. Algumas espécies produzem conidióforos contendo apenas um conídio em sua extremidade, outras apresentam cachos de conídios em toda a estrutura do conidióforo. Podem ser produzidas também, estruturas de resistência denominadas clamidósporos que são esporos de parede espessa, diferenciadas a partir de hifas aparecendo em condições de estresse extremo podendo dar origem a hifas, conidióforos e conídios (Barron, 1977).

Segundo Gray.,(1987) fungos predadores de nematóides produzem hifas vegetativas que se diferenciam em seis estruturas de captura (armadilhas): hifas adesivas não diferenciadas; ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, onde em algumas vezes podem se unir formando redes adesivas simples bidimensionais; botões adesivos; anéis constritores e anéis não constritores. Entretanto o tipo de armadilha mais encontrado em fungos predadores são as redes adesivas (Mota et al., 2000).

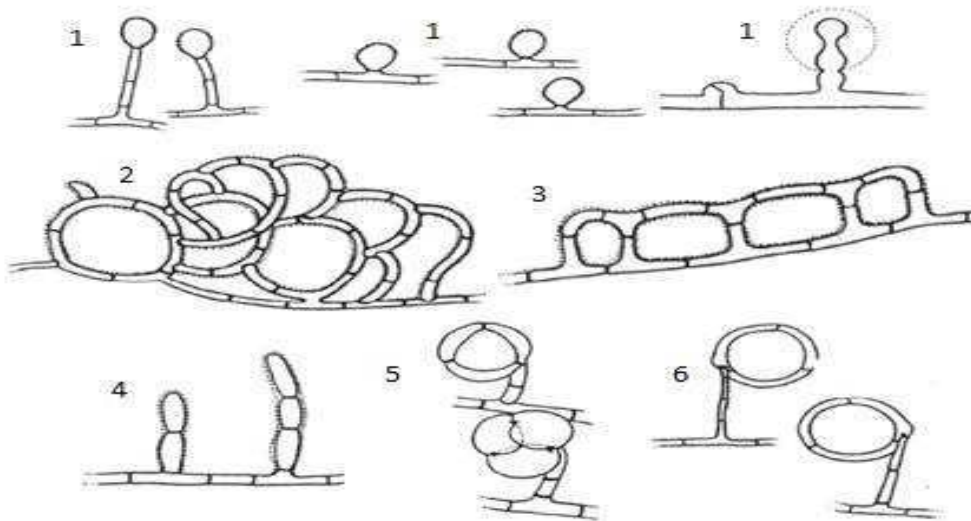


Figura 1. Estruturas de captura produzidas por fungos nematófagos predadores; (1) botões adesivos, (2) redes adesivas tridimensionais, (3) redes adesivas bidimensionais, (4) hifas adesivas, (5) anéis constritores, (6) anéis não constritores (adaptada de Barron.,1977).

A formação dessas armadilhas ocorre em resposta à presença do nematóide ou suas excretas, de compostos biológicos ou ainda, é induzida por condições de estresse fisiológico, como na escassez de nutrientes e água

(Balan e Gerber, 1972). O processo de diferenciação das armadilhas ocorre dentro de 24 horas após a interação fungo e nematóide (Pramer., 1964). Quanto maior a motilidade dos nematóides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas (Nansen et al., 1986; 1988). A fase final de penetração da cutícula parece ser resultado de força mecânica (Veenhuis et al., 1985). Dentro do nematóide, ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos. No grupo dos predadores, os gêneros *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthrobotrys*, são os mais estudados (Dimander et al., 2003; Araújo., 2004a).

2.5. *Arthrobotrys* spp

O gênero *Arthrobotrys* é originário de amostras de solo, e reúne um grande número de espécies de fungos nematófagos. As redes tridimensionais são o tipo de armadilha mais comum encontradas nesse gênero, podendo também ser capazes de produzir clamidósporos (Cooke e Godfrey 1964). As espécies pertencentes a este gênero possuem conidióforos eretos, podendo ter em sua extremidade até seis conídios de formato ovóide e com até três septos (Barron 1977; Zhang et al., 1996; Mota et al., 2003). Estudos realizados com isolados pertencentes a esse gênero demonstraram sua capacidade de destruição da população de larvas de diferentes parasitos. Carvalho et al (2009), utilizando as espécies *A. robusta*, *A. cladodes* e *A. conóides*, observaram a capacidade destas espécies de sobreviver após a passagem pelo trato gastrointestinal de cães, mantendo sua capacidade de destruição de larvas de *Ancylostoma* spp., bem como redução da população de *Ancylostoma* spp. utilizando o fungo *A. robusta* em condições laboratoriais. Braga et al (2010a; 2010b), utilizando o fungo *A. robusta*, observaram redução no número de larvas de *Strongyloides stercoralis* e *Ancylostoma ceylanicum*, também em condições laboratoriais.

2.6 *Duddingtonia* spp

O gênero *Duddingtonia*, produz grande quantidade de clamidósporos e vários conídios na extremidade dos conidióforos (Van Oorschot, 1985). Os conídios apresentam formato variando entre elíptico e ovóide, e um septo mediano. Dentro do grupo dos fungos nematófagos, a espécie *D. flagrans*, é a mais estudada no controle biológico de larvas de parasitos de animais domésticos. Essa espécie captura nematóides por meio de hifas adesivas (Cooke e Godfrei 1964).

Estudos têm demonstrando a capacidade dos isolados pertencentes a esta espécie de capturar e destruir larvas de helmintos parasitos. Fernandes et al. (2012), verificaram a capacidade do fungo *D. flagrans* de destruir larvas de *Ancylostoma ceylanicum* presentes nas fezes de hamsters, após transito pelo trato gastrointestinal destes roedores, assim como Braga et al. (2013a, 2013c), que utilizaram o fungo *D. flagrans* em condições laboratoriais, e observaram no final dos experimentos redução significativa nas populações de larvas (L₁) de *Angiostrongylus vasorum*.

2.7 *Monacrosporium* spp

As espécies do gênero *Monacrosporium* são caracterizadas por produzirem apenas um conídio na extremidade do conidióforo. Os conídios são hialinos, fusiformes, com dois a quatro septos transversais, sendo a célula intermediária, maior que as da extremidade. Normalmente é evidenciada a presença de clamidósporos em culturas de placa com meio de cultura sólido limitante (Saxena e Mittal 1995). Na espécie *M. thaumasium*, são observadas a produção de redes adesivas para captura de larvas de nematóides. (Araújo et al., 2004b).

Braga et al (2009; 2011), utilizaram a espécie *M. sinense* em condições laboratoriais, observando redução no número de larvas de *Strongyloides venezuelensis* e *Angiostrongylus vasorum*. Soares et al (2013a), também observaram redução na população de larvas de *A. vasorum* utilizando o *M. thaumasium* em condições laboratoriais.

Testes realizados *in vitro* com extrato bruto enzimático proveniente de alguns isolados fúngicos, também têm demonstrado resultados satisfatórios na destruição de larvas de parasitos (Braga et al., 2012b; 2013b). Trabalhos recentes demonstraram a participação de enzimas hidrolíticas provenientes destes organismos, na destruição de larvas de parasitos. Braga et al (2012a), identificaram uma protease (Df1) produzida pelo fungo *D.flagrans* e observou sua capacidade de destruir larvas de parasitos de equinos, assim como Soares et al (2012, 2013b), que também identificaram uma serina protease produzidas pelos fungos *M. thaumasium* (Mt1) e *M. sinense* (Ms1, Ms2 e Ms3), e observaram sua capacidade nematicida sobre larvas de vida livre (*Panagrellus redivivus*) e *A. vasorum*, respectivamente. Tunlid et al (1994), identificaram uma protease (PII) proveniente do fungo *A. oligospora*, observando também seu envolvimento no processo de infecção em larvas de vida livre. Estes resultados sugerem que qualquer produto derivado de fungos nematófagos, pode ser usado no controle biológico de nematóides responsáveis por causar infecções em humanos e animais, uma vez que estes organismos já demonstraram em vários ensaios *in vitro* e *in vivo*, sua habilidade e capacidade de atuarem como controladores biológicos.

2.8 REFERENCIAS

ALICATA, J.E. *Angiostrongyliasis cantonensis* (eosinophilic meningitis): historical events in its recognition as a new parasitic disease of man. Journal Washington Academy of Sciences, v.78, p. 38-46, 1988.

ALICATA, J.E. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as acausative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie, v. 40, p. 5-8, 1962.

ALOWE, S.B.; BOUDJELAS, M.S. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species. Disponível: www.issg.org/database, 2004.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.1, p.165-169, 2004a.

ARAÚJO., J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematoides *trichostrongilídeos* (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, p.65-67, 2004b.

ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; ALVES, P.H.; CAMPOS, A.K.; GANDRA, J.R. Controle biológico de *trichostrongilídeos* (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, p. 467-471, 2004c.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *In XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses*. Ouro Preto, MG, 2004d.

BARRON, G.L. The nematode-destroying fungi. *Topics in Microbiology*. Canadian Biological Publications. Guelph, v.1, p.140, 1977.

BOLAN, J. & GERBER. N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactiloides*. *Nematology*, v.18, p.163-173, 1972.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O.; MACIEL, A.S. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium*

chlamydosporium sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). Revista da sociedade brasileira de medicina tropical, v.40, p.356-358, 2007.

BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; LIMA, W.S.; TAVELA, A.O.; RODRIGO, S.F. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae. Journal of Helminthology, v. 83, p. 303-308, 2009.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; FRASSY, L.N. Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v.43, p. 588-590, 2010a.

BRAGA, F.R.; SILVA, A.R.E.; CARVALHO, R.O. ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, P. H. G.; FUJIWARA, R. T.; FRASSY, L. N. In vitro predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third-stage larvae. Veterinary Microbiology, v. 146, p.183-186, 2010b.

BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.E.; CARVALHO, R.O; ARAÚJO, J. V.; TAVELA, A.O.; SILVA, M.E.; FERNANDES, F.M.; MELO, A.L. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, p. 389-391, 2011.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SOARES, F.E.F.; GENIÊR, H.L.A.; QUEIROZ, J.H. An extracelular serine protease of na isolate of *Duddingtonia flagrans* nematophagous fungus. Biocontrol Science and Technology, v.22,p.1131-1142,2012a.

BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; TAVELA, A.O.; ARAÚJO, J.V.; SOARES, F.E.F.; GENIÊR, H.L.A.; LIMA, W.S.; MOZER, L.R.; QUEIROZ, J.H. Atividade larvicida do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagras* sobre larvas de

primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.44,p. 383-385, 2012b.

BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; SOARES, F.E.F.; TAVELA, A.O.; FRASSY, L.N.; LIMA, W.S.; MOZER, L.R. In vitro predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 46, p. 108-110, 2013a.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SOARES, F.E.F.; ARAUJO, J.M.; FERREIRA, S.R.; TAVELA, A.O.; SILVEIRA, W.F.; QUEIROZ, J.H. Proteolytic action of the crude extract *Duddingtonia flagrans* on *Cyathostominae* (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 21, p. 143-146, 2013b.

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. First report of the interaction of nematophagous fungi on *Libyostrongylus douglassii* (Nematoda: Trichostrongilidae) of ostrich. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 22, p. 147-151, 2013c.

CALDEIRA, R.I.; MENDONÇA, C.L.G.F.; GOUVEIA, C.O.G.; LENZI, H.L.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; LIMA, W.S.; MOTA, E.M.; PECORA, I.L.; MEDEIROS, A.M.Z.; CARVALHO, O.S. First Record of molluscs naturally infected with *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935) (nematode: metastrongylidae) in Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.102, p. 887-889, 2007.

CARLISLE, M.S.; PROCIV, P.; GRENNAN, J.; PASS, M.A.; CAMPBELL, G.L.; MUDIE, A. Cerebrospinal angiostrongyliasis in five captive tamarins (*Sanguinus spp*). Australian Veterinary Journal, v.76, p.167-170, 1998.

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.

CHEN, H.T. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n. g. nsp. des rats de Canton. Annales de Parasitologie Humaine et Comparee, v.13, p.312-317, 1935.

CIARAVOLO, R.M.C.; PINTO, P.L.S.; MOTA, D.J.G. Meningite eosinofílica e a infecção por *Angiostrongylus cantonensis*: Um agravo emergente no Brasil. Vector: Informativo Técnico Científico-SUCEN, v.8, p.7-8, 2010.

COGNATO, B.B.; MORASSUTTI, A.L.; SILVA, A.C.A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.46, p.664-665, 2013.

COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key of nematode-destroying fungi. Transactions of the British Mycological Society, v.47, p.61-74, 1964.

DAUGHERTY, B.L.; SICILIANO, S.J.; DE MARTINO, J.A.; MALKOWITZ, L.; SIROTINA, A.; SPRINGER, M.S. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. Journal of Experimental Medicine, v.183, p. 2349-2354, 1996.

DIAZ, J.H., 2008. Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. The Journal of the Louisiana State Medical Society, v.160, p. 333-342, 2008.

DIMANDER, S.O.; HOGLUND, J.; UGGLA.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastrointestinal nematode parasite control strategies for first season grazing cattle in Sweden. Veterinary Parasitology, v.11, p.192-209, 2003.

DORTA-CONTRERAS, A.J.; NÚÑEZ-FERNÁNDEZ, F.A.; PÉREZ-MARTIN, O.; LASTRE-GONZÁLEZ, M.; MAGRANER-TARRAU, M.E.; BU-COIFIÚ FANEGO, R.; NORIS-GARCÍA, E.; PADILLA-DOCAL, B.; INTERIÁN-MORALES, M.T.; MARTÍNEZ-DELGADO, F.F.; SÁNCHEZ-ZULUETA, E. Peculiaridades de la meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis* en América. Revista de Neurología, v.45, p.755-763, 2007.

DRECHSLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free living terricolous nematode. *Mycologia*, v. 23, p.447-552, 1937.

ER-HUJ.; QIANG, M.A.; DA-GING, M.A.; WEN, H.E.; AI-PING, J.I.; CHENG-HONG, Y. Magnetic resonance imaging of eosinophilic meningoencephalitis caused by *Angiostrongylus cantonensis* following eating freshwater snails. *Chinese Medical Journal*, v.121, p. 67-72, 2008.

ESPIRITO-SANTO, M.C.C.; PINTO, P.L.S.; MOTA, D.J.G.; GRYSHECK, R.C.B. The first case of *Angiostrongylus cantonensis* eosinophilic meningitis diagnosed in the city of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.55, p.129-132, 2013.

FERNANDES, F.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; GAZZINELLI-GUIMARÃES, P.E.; ARAUJO, J.M.; FERREIRA, S.R.; CARVALHO, R.O.; MELLO, I.N.K.; FUJIWARA, R.T. *In vitro* biological control of infective larvae of *Ancylostoma ceylanicum*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.21, p.283-286, 2012.

FISCHER, M.L.; COLLEY, E. Diagnóstico da ocorrência do caramujo gigante Africano *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) na APA de Guaraqueçaba, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 26, p. 43-50, 2004.

FORONDA, P.; LÓPEZ-GONZÁLES, M.; MIGUEL, J.; TORRES, J.; SEGOVIA, M.; ABREU-COSTA, N.; CASANOVA, J.C.; VALLADARES, B.; MA-COMA, S.; BARGUES, M.D.; FELI, C. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). *Acta Tropica*, v.114, p.123-127, 2010. from China. *Mycological Research*, v.100, p. 274-276, 1996.

GRAEFF-TEIXEIRA, C.; SILVA, A.C.A.; YOSHIMURA, K. Update on Eosinophilic Meningoencephalitis and its clinical relevance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, p.322-348, 2009.

GRAY, N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, v. 62, p. 245-304, 1987.

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

HINRICHSEN, S. L., NETO. J. M. J.; ROLIM, H. Varíola. *In: Hinrichsen, S. L. org. DIP: Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 126-133, 2005.

HUNG, T.P.; CHEN, E.R. "*Angiostrongylus cantonensis* (*Angiostrongylus cantonensis*)" *Handbook of Clinical Neurology. Microbes and Disease*, v.52, p. 545-562, 1988.

HWANG, K.P.; CHEN, E.R. Clinical studies on *angiostrongyliasis cantonensis* among children in Taiwan. *Southeast Asian International. Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v.22, p.194-199, 1991.

JITPIMOLMARD, S.; SAWANYAWISUTH, K.; MORAKOTE, N.; VEJAJIVA, A.; PUNTUMETAKUL, M.; SANCHAISURIYA, K.; TASSANEEYAKUL. W.; KORWANICH, N. Albendazole therapy for eosinophilic meningitis caused b.; *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology research*, v.100, p. 293-1296, 2007.

KIM, D.Y.; STEWART, T.B.; BAUER, R.W.; MITCHELL, M. *Parastrongylus* (*Angiostrongylus*) *cantonensis* now endemic in Louisiana wildlife. *The Journal of Parasitology*, v. 88, p. 1024-1026, 2002.

KOO, J.; PIEN, F.; KLIKS, M.M. *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) eosinophilic meningitis. *Infectious Diseases*, v.10, p.1155-1162, 1988.

KOSLOSKI, M.A.; FISCHER, M.L. Primeira ocorrência de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) no litoral do Estado do Paraná (Mollusca; Stylommatophora; Achatinidae). *Estudos de Biologia*, v. 24, p. 65-69, 2002.

KUBERSKI, T.; BART, R.D.; BRILEY, J.M.; ROSEN, L. Recovery of *Angiostrongylus cantonensis* from cerebrospinal fluid of child with eosinophilic meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.9, p.629-631, 1979.

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

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, n.120, p.121-131, 2000.

LEONE, S.M.M.; GHIRGA, P.; NICASTRI, E.; ESPOSITO, M.; NARCISO, P. Eosinophilic meningitis in a returned traveler from Santo Domingo: case report and review. *Journal of Travel Medicine*, v.14, p. 407-410, 2007.

LIMA, A.R.M.C.; MESQUITA, S.D.; SANTOS, S.S.; AQUINO, E.R.P.; ROSA, L.R.S.; DUARTE, F.S.D.; TEIXEIRA, A.O.; COSTA, Z.R.S.; FERREIRA, M.L.B. Neuroinfestation by *Angiostrongylus cantonensis* in Recife, Pernambuco, Brazil., *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v.67, p.1093-1096, 2009.

MALDONADO, A. Jr.; SIMÕES, R.O.; OLIVEIRA, A.P. M.; MOTTA, E.M.; FERNANDEZ, M. A.; PEREIRA, Z.M.; MONTEIRO, S.S.; TORRES, E.J.L.; THIENGO, S.C. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.105, p. 939-941, 2010.

MALEK, E. A.; CHENG, T. C. *Medical and economic malacology*. New York: Academic Press. Chicago (Author-Date, 15th ed). 388 pp, 1974.

MENDONZA-DE-GIVES, P.; DAVIES, K. G.; CLARCK, S. J.; BEHNKE, J. M. Predatory behaviour of trapping fungi against *srf* mutants of *Caenorhabditis*

elegans and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology*, v.119, p. 95-104, 1999.

MOREIRA, V.L.C.; GIESE, E.G.; MELO, F.T.V.; SIMÕES, R.O.; THIENGO, S.C.; MALDONADO, A. Jr.; SANTOS, J.N. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: Natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. *Acta Trópica*. v. 125, p. 90-97, 2013.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES-KÁBANA, R. Infections events in the fungus-nematode system. *In*: Poinar O.G. & Borne J.H. (ed.) *Diseases of Nematodes*, p. 59-62. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1988.

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

MOTA, M.A.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V. Atividade predatória de fungos *Arthrobotrys conoides* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. *Ciência Animal*, v.10, p.37-41, 2000.

MOTA, M.A.; CAMPO, A.K.; ARAÚJO, J.V. Evaluation of the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* submitted to different preservation methods against gastrointestinal parasitic nematodes of bovines. *Revista Brasileira de Parasitologia veterinária*. v.11, p.13-17, 2002.

NANSEN, P.; FOLDAGER, J.; HANSEN, J.W.; HENRIKSEN, S.A.; JORGENSEN, R.J.; Grazing and acquisition of *Ostertagia ostertagi* in calves. *International Journal for Parasitology*., v. 27, p.325-335, 1988.

NANSEN, P.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Predaceous activity of the nematode-destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematodes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, v.53, p.237-243, 1986.

NEVES, D.P. *In*: Neves D.P. (Ed). Parasitologia Humana. Editora Atheneu, 11ª Edição, São Paulo. p. 185-192, 2005.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H. B.; TUNLID, A. Nematophagous Fungi. *In*: Encyclopedia of Life Science(c). Weinheim: Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing, p. 1-11, 2006.

PRAMER, D. Nematode trapping fungi. *Science*, v.144, p.382-388, 1964.

REY, L. *In*: Parasitologia. Editora Guanabara Koogan, 2ª Edição, Rio de Janeiro. p. 473-484, 1991.

SAWANYAWISUTH, K.; KITHAWEESI, K.; LIMPAWATTANA, P.; INTAPAN, P.M.; TIAMKAO, S.; JITPIMOLMARD, S.; CHOMONGKOL. Intraocular angiostrongyliasis: clinical findings, treatments and outcomes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.101, p. 497-501, 2007.

SAXENA, G.; MITTAL, N. Trap formation by conidia of nematode trapping *Monacrosporium* spp. *Mycological Research*, v.7, p.839-840, 1995.

SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; FRASSY, L.N.; TAVELA, A.O.; CARVALHO, R.O.; CASTEJON, F.V. Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in a tropical region of the southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*. *Parasitology Research*, v.105, p.1707-1713, 2009.

SLOM, T.; JOHNSON, S. Eosinophilic Meningitis. *Current Infectious Disease Reports*, v. 5, p.322-328, 2003.

SOARES F.E.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; LIMA, W.S.; MOZER, L.R.; QUEIROZ, J.H. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium*

thumasium fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. Parasitology Research, v.110, p. 2423-2427, 2012.

SOARES, B.; CANTOS, G.A.; Qualidade parasitológica e condições higiênico-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Revista Brasileira de Epidemiologia, v.8. p, 377-384, 2005.

SOARES, F.E.F.; QUEIROZ, J.H.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J. V. The nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* and its nematicidal activity on *Angiostrongylus vasorum*. Revista Iberoamericana de Micología, p. 1130, 2013a.

SOARES, F.E.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; HUGO, L. A.; GENIÉR, A. S.; QUEIROZ, J.H. Nematicidal activity of three novel extracellular proteases of the nematophagous fungus *Monacrosporium sinense*. Parasitology Research, v.112, p.1557-1565, 2013b.

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

SUGAYA, H.; YOSHIMURA, K. T-cell-dependent eosinophilia in the cerebrospinal fluid of the mouse infected with *Angiostrongylus cantonensis*. Proceedings of the Helminthological Society of Washington, v.10, p.127-138, 1988.

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

TAYLOR, M.A.; COOP, R.L.; WALL, R.L. Parasitologia Veterinária, third ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro., 2010.

TELES, H.M.S.; FONTES, L.R. Implicações da introdução e dispersão de *Achatina fulica* (Bowdich, 1822) no Brasil. Instituto Adolfo Lutz, v.12, p. 3-5, 2002.

THIENGO, S.C.; MALDONADO, A. Jr.; MOTA, E.M.; TORRES, E.J.L.; CALDEIRA, R.; CARVALHO, O.S.; OLIVEIRA, A.P.M.; SIMÕES, R.O.; FERNANDEZ, M.A.; LANFREDI, R.M. The giant african snail *Achatina fulica* as natural intermediate host of *Angiostrongylus cantonensis* in Pernambuco, northeast Brazil. *Acta Tropica*. v.115, p.194-199, 2010.

THIENGO, S.C.; SIMÕES, R.O.; JUNIOR, A.M. *Angiostrongylus cantonensis* an rat lungworm disease in Brazil. *Hawaii Journal of Medicine & Public health* v.72 (6), p.18-22, 2013.

TOMA, H.; MATSUMURA, S.; OSHIRO, C.; HIDAKA, T.; SATO, Y. Ocular angiostrongyliasis without meningitis symptoms in Okinawa Japan. *The Journal of Parasitology*, v. 88, p. 211-213, 2002.

TSAI, H.C.; LIU, Y.C.; KUNIN, C.M.; LEE, S.S.; CHEN, Y.S.; LIN, H.H.; LIN, W.R.; HUANG, C.K.; YEN, M.Y.; YEN, C.M. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. *The American Journal of Medicine*, v.111, p.109-114, 2001.

TUNLID, A.; ROSEN, S.; EK, B.; RASK, L. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology*, v.140, p.:1687-1695, 1994.

VAN OOIJ, C. Fungal pathogenesis: Hungry fungus eats nematode. *Nature Reviews Microbiology*. v. 9, p. 766-767, 2011.

VAN OORSCHOT, C.A.N. Taxonomy of the Dactylaria complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *Studies in Mycology*, v.26, p.61-95, 1985.

VEENHUIS, M.; NORDBRING-HERTZ, B.; HARDE, W. An electron microscopical analysis of capture and initial stages of penetration of nematodes by *Arthrobotrys oligospora*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.51, p.385-398, 1985.

ZANOL., J.; FERNANDEZ, M.; OLIVEIRA, A.; RUSSO, C.; THIENGO, S. The exotic invasive snail *Achatina fulica* (Stylommatophora, Mollusca) in the State of Rio de Janeiro (Brazil): current status. *Biota Neotropica*, v.10, p.447-451, 2010.

Zhang, K.; Liu, X.; Cao, L. Nematophagous species of *Monacrosporium* from China. *Mycological Research*, v.100, p. 274-276, 1996.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar em condições laboratoriais a capacidade predatória de oito isolados de fungos nematófagos pertencentes aos gêneros *Duddingtonia*, *Monacrosporium* e *Arthrobotrys* no controle biológico de larvas (L₁) de *Angiostrongylus cantonensis* em condições laboratoriais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar em condições laboratoriais a capacidade predatória de oito isolados fúngicos, pertencentes aos gêneros *Duddingtonia* (AC001; CG768; CG722), *Monacrosporium* (*M. thaumasium* (NF34); *M. sinense* (SF53) e *Arthrobotrys* (*A. conóides* (I40); *A. cladodes* (CG719) e *A. robusta* (I31) sobre larvas (L₁) de *A. cantonensis*.

- Avaliar qual isolado utilizado, apresenta um maior percentual de redução das larvas (L₁) de *A. cantonensis* em condições laboratorias.

4. Capítulo Único

First report of the activity of predatory fungi on *Angiostrongylus cantonensis*
(Nematoda: Angiostrongylidae) first-stage larvae

ActaTropica (2013):127, 187-190 doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.04.014

4.1 Abstract

The nematode *Angiostrongylus cantonensis* causes eosinophilic meningoencephalitis in humans and thus alternative methods of control should be studied. The objective of this work was to evaluate the predatory capacity of eight fungal isolates of the species *Duddingtonia flagrans* (AC001, CG768 and CG722), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *M. sinense* (SF53) and *Arthrobotrys robusta* (I31), *A. cladodes* (CG719) and *A. conoides* (I40) on first stage larvae (L₁) of *A. cantonensis* under laboratory conditions. The treated groups contained 1000 conidia of the fungal isolates and 1000 *A. cantonensis* (L₁) in Petri dishes containing 2% water-agar medium (2% WA). The control group (without fungi) contained only 1000 *A. cantonensis* (L₁) in 2% WA. Evidence of predation was observed at the end of 7 days. Percentage reductions in L₁ were: AC001, 82.8%; CG768, 71.0%; CG722, 72.8%; NF34, 86.7%; SF53, 89.7%; I40, 48.3%; CG719, 84.7%; and I31, 80.4%. No significant difference was observed ($p > 0.01$) between the actions of the isolates used; however, a difference was noted ($p < 0.01$) in relation to the control group. The results of the present work, confirm previous reports of the effectiveness of the fungi *D. flagrans*, *M. thaumasium*, *M. sinense* and *A. robusta* in controlling larvae of potentially zoonotic nematodes, this being the first report on *A. cantonensis* L₁.

Keywords: Biological control, Zoonosis, *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Arthrobotrys*, *Angiostrongylus cantonensis*.

4.2 Introduction

Angiostrongylus cantonensis (Chen, 1935) is a potentially zoonotic nematode and considered to be the main cause of human eosinophilic meningoencephalitis, occurring mainly in Asia, Pacific Islands, North America and South America (Alicata, 1962; Koo et al., 1988; Tsai et al., 2001; Diaz, 2008; Moreira et al., 2013). In relation to its life cycle, rodents (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) have been reported as the definitive hosts of *A. cantonensis* (Yousif and Ibrahim, 1978; Foronda et al., 2010; Taylor et al., 2010). The larvae (first-stage; L₁) are released from the faeces of rodents into the environment and can be ingested by mollusks of the genera *Agroliamax*, *Limax* and *Deroceras*, and can even penetrate the tissue of these, which act as intermediate hosts. In these hosts, the larvae (L₁) will pass through two more changes until they reach their infective stage (third-stage; L₃) (Taylor et al., 2010). The life cycle is completed when the rats ingest slugs infected with L₃. Man acquires the infection after ingestion of the intermediate or paratenic host and through ingestion of rain water in the field where this nematode is present (Wang et al., 2007). In this context, the use of nematophagous fungi of the genera *Duddingtonia*, *Monacrosporium* and *Arthrobotrys* has been successfully tested, including on the *Angiostrongylus* genus, specifically on the *A. vasorum* species (Braga et al., 2009, 2011; Soares et al., 2012). The fungus *Duddingtonia flagrans* is the most studied species in the control of gastrointestinal helminths from domestic animals. This fungus captures nematodes through adhesive hyphae. The species of the genus *Monacrosporium* are characterized by producing only one conidia on the end of a conidiophore and by capturing nematodes through adhesive networks. The genus *Arthrobotrys* includes a large number of species of nematophagous fungi and captures nematodes through adhesive networks (Araújo et al., 2004).

The objective of this work was to evaluate the in vitro predatory capacity of eight fungal isolates of the genera *Duddingtonia*, *Monacrosporium* and *Arthrobotrys* on L₁ of *A. cantonensis*. This is the first report of the predatory activity of these fungi on the *A. cantonensis* species.

4.3 Materials and methods

Fungi and obtaining of the conidia the species *D. flagrans* (AC001, CG768 and CG722), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *M. sinense* (SF53) and *Arthrobotrys robusta* (I31), *A. cladodes* (CG719) and *A. conoides* (I40) were utilized. These isolates are from soil in Brazil, in the town of Viçosa and have been kept in the Veterinary Department, Federal University of Viçosa. Nematophagous fungi produce traps and vegetative structures (conidia and/or chlamydospores) in the presence of nematodes, which are routinely used in the laboratory for this purpose (Braga et al., 2012). Thus, culture plates of 4 mm in diameter were extracted from fungal isolates maintained in test tubes containing 2% corn-meal-agar and transferred to Petri dishes of 9.0 cm in diameter containing 20 ml of 2% potato dextrose-agar kept at 25°C in the dark for 10 days. After growth of the isolates new culture plates of 4 mm in diameter were transferred to Petri dishes of 9.0 cm diameter containing 20 ml of 2% water-agar (2% WA). Daily, 1 ml of distilled water containing 1000 larvae *Panagrellus redivivus* was added during a period of 21 days to induce formation of conidia. When the complete fungal development was observed, 5 ml of distilled water were added to each Petri dish, and the mycelial fragments and conidia were removed according to the technique described by Araújo et al. (1993).

4.4 Obtaining of the *Angiostrongylus cantonensis* larvae

Larvae of *A. cantonensis* were obtained from naturally infected specimens of *Achatina fulica*, from the municipality of São Gonçalo, Rio de Janeiro, Brazil (Maldonado et al., 2010). The L₁ were recovered using the technique of artificial digestion (Graeff-Teixeira and Moreira, 1995) and inoculated by gavage in *R. norvegicus* and using *Biomphalaria glabrata* as an intermediate host in the Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz, RJ, Brazil), where the cycle has been maintained with the permission of the ethics committee for animal use (LW-24/10). The faeces of the parasitized *R. norvegicus* were collected to obtain larvae by the method of Baermann (1917) modified by Moraes (1948). The pellet was collected and centrifuged (2000 RPMI for 10 min) and analysed using a light microscope for the detection and recovery of L₁.

4.5 Experimental assay

A total of nine groups were formed in Petri dishes of 4.5 cm in diameter containing 10 ml of 2% WA: eight treatment groups and a control group, with six replicates for each group. The Petri dishes were previously marked in fields of 4 mm in diameter. In the treated groups each Petri dish contained 1000 L₁ of *A. cantonensis* and 1000 conidia of the fungal isolates (AC001, CG722, CG768, NF34, SF53, I40, CG719 and I31) in 2% WA, and the control group (without fungi) contained only 1000 L₁ in the dishes with 2% WA. For 7 days, every 24 h, 10 random fields of 4 mm in diameter on each plate of the treated and control groups were observed under light microscopy at 10x objective, and the number of non-predated L₁ were counted in each one. After 7 days, the non-predated L₁ in the content of the Petri dishes were recovered through the Baermann apparatus with water at 42°C.

4.6 Statistical analysis

The average number of *A. cantonensis* L₁ recovered was calculated. The data were interpreted by analysis of variance with significance levels of 1% and 5% probability (Ayres et al., 2003). The efficiency of predation on L₁ compared with control was assessed by the Tukey test at 1% and 5% probability. Thereafter, the percentage of reduction from the average of L₁ was calculated according to the following formula:

$$\% \text{ Reduction} = \frac{(\text{average of L}_1 \text{ recovered from control} - \text{average of L}_1 \text{ recovered from treatment})}{\text{Average of L}_1 \text{ recovered from control}} \times 100$$

4.7 Results

The isolates of the predatory fungi tested, *D. flagrans* (AC001, CG722 and CG768), *M. thaumasium* (NF34), *M. sinense* (SF53), and *A. conoides* (I40), *A. cladodes* (CG719) and *A. robusta* (I31), were able to prey on the *A. cantonensis* L₁ in the in vitro experimental assay. Evidence of predation was observed at the end of the experiment (7 days), where the following percentages of reduction of non-predated L₁ were observed: AC001, 82.8%; CG768, 71.0%; CG722, 72.8%; NF34, 86.7%; SF53, 89.7%; I40, 48.3%; CG719, 84.7%; and I31, 80.4% (Fig. 1). It was observed no significant difference ($p > 0.01$) between the actions of isolates used at the end of 7 days; however, a difference was noted ($p < 0.01$) compared with the control group. On the other hand, it was observed that the action of the CG722 isolate was statistically similar to the action of the I40 isolate. Every 24 h, predation and the formation of traps were visualized in all plates of the groups treated with the different genera of fungi used and control (Fig. 2a–d). However neither the presence nor formation of traps of nematophagous fungi in the control group was noticed. Regarding daily predation, the results for the activity of the eight fungal isolates tested are shown in Table 1. In this particular case, there were significant differences ($p < 0.01$) between the groups treated with the fungi and the control group on days 1, 2, 5, 6 and 7. However, in the interval of the third day, it was observed that the isolates CG722 and CG719 showed no difference ($p > 0.01$) compared with the control group. Moreover, in the interval of the fourth day the isolates AC001, CG768, CG722, NF34, I31 and I40 showed no difference ($p > 0.01$) compared with the control group.

4.8 Discussion

D. flagrans (AC001) showed at the end of 7 days a reduction of 80.3% (Braga et al., 2009) in comparison with 82.8% (AC001) found in this study on *A. cantonensis*. However, there are no reports of the use of isolated CG768 on *A. cantonensis*, and so comparisons with other potentially zoonotic helminth larvae should be performed. Thus, the activity of this isolate was tested on *Ancylostoma* spp. L₃ with a percentage reduction of 92.8% (Maciel et al., 2009), this result is

consistent with our report where it was observed a percentage reduction of 72.8%, demonstrating its effectiveness even on another helminth L₃. Finally, for the isolate CG722, in this work was found a percentage reduction in L₁ *A. cantonensis* of 70.9%; however, there are no reports of its predation on larvae of potentially zoonotic helminths. Following this line of reasoning, for *Monacrosporium* genus, the species *M. thaumasium* (NF34) and *M. sinense* (SF53) were successfully tested on *A. vasorum* L₁ by Braga et al. (2009). NF34 and SF53 reduced *A. vasorum* L₁ by 74.5% and 74.2%, respectively, compared with 86.8% and 89.7% reductions in *A. cantonensis* L₁ in the present work. For the genus *Arthrobotrys*, the species *A. robusta* (I31) has proved to be effective on *A. vasorum* L₁, showing a reduction of 71.8% (Braga et al., 2009) compared with the present study (80.4%). The species *A. cladodes* (CG719) and *A. conoides* (I40) were tested on *Ancylostoma spp.* L₃ in vitro; at the end of the experiment percentage reductions of 71.3% and 76.9% were obtained (Carvalho et al., 2009), whereas the percentages obtained were 89.7% and 48.3%, respectively. On the other hand, reduction in the number of L₁ per 4 mm diameter field in the control group, during the work, was caused by larval migration to the periphery of the Petri dishes, where the moisture level was higher, which was also reported by Araújo et al. (2006) in an in vitro assay carried out in Petri dishes. In the interval of the fourth day the isolates AC001, CG768, CG722, NF34, I31 and I40 showed no difference ($p > 0.01$) compared with the control group. This strongly suggests that the motility of *A. cantonensis* L₁ was not fully effective; in this case the low production of traps and consequently the reduced efficacy of these fungi, in this particular 2 days, may be explained. Evidence of predatory activity of all fungal isolates tested could be observed at the end of the experiment through the recovery of non-predated L₁. These results are in agreement with Gomes et al. (1998) who observed no significant reductions in infective larvae (L₃) of *Oesophagostomum sp.* of cattle in the pasture for this genus. In these work, the isolates used belonged to the genus *Arthrobotrys* and variations in predatory behaviour of isolates from different species are common (Araújo et al., 1993), which could explain the results found for the isolate of *M. sinense*. This work is an important step in understanding the interaction of fungi versus *A. cantonensis* L₁, even as an experimental design. In this context, the applicability of nematophagous fungi is suggested, highlighting the use of any tested isolate

(AC001, CG768 and CG722) from *Duddingtonia* genus (NF34 and SF53), *Monacrosporium* genus (I31, CG719) and *Arthrobotrys* genus that is able to destroy *A. cantonensis* L₁ in laboratory conditions. However, perfect conditions on the use of these fungi in controlling *A. cantonensis* L₁ must still be studied exhaustively.

5. Conclusão

- A aplicação de fungos nematófagos pertencentes aos gêneros: *Duddingtonia* (isolados: AC001, CG768 e CG722), *Monacrosporium* (isolados: NF34 e SF53) e *Arthrobotrys* (isolados: I31 e CG719) no controle de larvas de *A. Cantonensis* é sugerida, uma vez que estes foram capazes de reduzir a população desse parasito em experimento *in vitro*.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPEMIG, CAPES and CNPq for financial support.

6 References

Alicata, J.E., 1962. *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) as a causative agent of eosinophilic meningitis of man in Hawaii and Tahiti. Can. J. Zool. 40, 5-8.

Araújo, J.V., Assis, R.C.L., Alves, P.H., Campos, A.K., Gandra, J.R., 2004. Controle biológico de trichostongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56, 467-471.

Araújo, J.V., Assis, R.C.L., Campos, A.K., Mota, M.A., 2006. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e

Duddingtonia sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. Arq. Bras. Med. Vet.Zootec. 58, 373-380.

Araújo, J.V., Santos, M.A., Ferraz, S., Maia, A.S., 1993. Antagonistic effect of predacious fungi *Arthrobotrys* on infective *Haemonchus placei* larvae. J. Helminthol. 67,136-138.

Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2003. Aplicações Estatísticas nas Áreas de Ciências Biológicas, fifth ed. Sociedade Civil Mamirauá, Brasília.

Baermann, G., 1917. Eine Einfache Methode zur Auffindung von *Ankylostomun* (Nematoden) Larven in Erdpnoben, Mededeel. mit h. Geneesk. Lab Weltreve Feestbundel, Batavia, pp. 41-47.

Braga, F.R., Araújo, J.M., Tavela, A.O., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Geniêr, H.L.A., Lima,W.S., Mozer, L.R., Queiroz, J.H., 2011. Atividade larvicida do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagras* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 383-385.

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

Braga, F.R., Carvalho, R.O., Araújo, J.M., Silva, A.R., Araújo, J.V., Lima, W.S., Tavela, A.O., Rodrigo, S.F., 2009. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first stage larvae. J. Helminthol. 83, 303-308.

Carvalho, R.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Araujo, J.M., Silva, A.R., Tavela, A.O., 2009. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp: evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. J. Helminthol. 83, 231-236.

Chen, H.T., 1935. Un nouveau nématode pulmonaire, *Pulmonema cantonensis* n. g. nsp. des rats de Canton. Ann. Parasitol. Hum. Comp. 13, 312-317.

Diaz, J.H., 2008. Helminth eosinophilic meningitis: emerging zoonotic diseases in the South. J. La. State Med. Soc. 160, 333-342.

Foronda, P., López-González, M., Miguel, J., Torres, J., Segovia, M., Abreu-Costa, N., Casanova, J.C., Valladares, B., Ma-Coma, S., Bargues, M.D., Feli, C., 2010. Finding of *Parastrongylus cantonensis* (Chen, 1935) in *Rattus rattus* in Tenerife, Canary Islands (Spain). Acta Trop. 114, 123-127.

Gomes, A.P.S., Araújo, J.V., Guimarães, M.P., 1998. Biological control of bovine gastrointestinal parasites in southeastern Brazil by nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 7, 117-122.

Graeff-Teixeira, C., Moreira, P., 1995. Métodos de diagnóstico em ácido clorídrico para isolamento e larvas de *Metastrongylidae*. Biociências. 3, 85-89.

Koo, J., Pien, F., Kliks, M.M., 1988. *Angiostrongylus* (*Parastrongylus*) eosinophilic meningitis. Rev. Infect. Dis. 10, 1155-1162.

Maciel, A.S., Araújo, J.V., Campos, A.K., Lopes, E., Freitas, L.G., 2009. Predation of *Ancylostoma spp.* dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. Vet. Parasitol. 161, 239-247.

Maldonado Jr., A., Simões, R.O., Oliveira, A.P., Mota, E.M., Fernandez, M.A., Pereira, Z.M., Monteiro, S.S., Torres, E.J., Thiengo, S.C., 2010. First report of *Angiostrongylus cantonensis* (Nematoda: Metastrongylidae) in *Achatina fulica* (Mollusca: Gastropoda) from Southeast and South Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 938-941.

Moraes, R.G., 1948. Contribuição para o estudo do *Strongyloides stercoralis* e da strongyloidose no Brasil. Rev. Serv. Saúde. Públ. 1, 507-624.

Moreira, V.L., Giese, E.G., Melo, F.T., Simões, R.O., Thiengo, S.C., Maldonado Jr., A., Santos, J.N., 2013. Endemic angiostrongyliasis in the Brazilian Amazon: natural parasitism of *Angiostrongylus cantonensis* in *Rattus rattus* and *R. norvegicus*, and sympatric giant African land snails, *Achatina fulica*. *Acta Trop.* 125, 90-97.

Soares, F.E.F., Braga, F.R., Araújo, J.V., Lima, W.S., Mozer, L.R., Queiroz, J.H., 2012. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitol. Res.* 110, 2423-2427.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2010. *Parasitologia Veterinária*, third ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Tsai, H.C., Liu, Y.C., Kunin, C.M., Lee, S.S., Chen, Y.S., Lin, H.H., Tsai, H.C., Lin, W.R., Huang, C.K., Yen, M.Y., Yen, C.M., 2001. Eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*: report of 17 cases. *Am. J. Med.* 111, 109-114.

Wang, Q.P., Chen, X.G., Lun, Z.R., 2007. Invasive fresh water snail. *China Emerg. Infect. Dis.* 13, 1119-1120.

Yousif, F., Ibrahim, A., 1978. The first record of *Angiostrongylus cantonensis* from Egypt. *Parasitol. Res.* 56, 73-80.

7. Anexos

Table 1. Daily mean and standard deviations of non-predated first stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* during the period of seven days in treatments with the fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001, CG768 and CG722), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *M. sinense* (SF53), *Arthrotrrys robusta* (I31), *A. cladodes* (CG719) and *A. conoides* (I40) and in control under Petri dishes of 4.5 cm in diameter containing 10 ml of 2% water-agar (2% WA).

Table 1

Daily mean and standard deviations of non-predated first stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis* during the period of seven days in treatments with the fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001, CG768 and CG722), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *M. sinense* (SF53), *Arthrotrrys robusta* (I31), *A. cladodes* (CG719) and *A. conoides* (I40) and in control under Petri dishes of 4.5 cm in diameter containing 10 ml of 2% water-agar (2% WA).

Fungi	Time (Days)						
	1	2	3	4	5	6	7
AC001	7.83 ^A ± 7	8.8 ^A ± 10	4.2 ^A ± 6	3.5 ^A ± 4	2.8 ^A ± 3	2.8 ^A ± 4	2.3 ^A ± 4
CG768	14.5 ^{BA} ± 10	6.9 ^A ± 5	4.0 ^{AB} ± 3	5.5 ^A ± 3	6.3 ^A ± 7	6.1 ^A ± 10	2.7 ^A ± 7
CG722	14 ^{BA} ± 11	16.9 ^{BB} ± 15	20.6 ^{BA} ± 22	11.3 ^B ± 13	11.0 ^{BA} ± 7	14.1 ^B ± 14	11.5 ^{BA} ± 16
NF34	14.0 ^{BA} ± 8	7.7 ^{AAB} ± 9	5.2 ^{AAB} ± 5	4.6 ^{AA} ± 3	2.2 ^{AB} ± 2	2.7 ^A ± 3	4.0 ^{AB} ± 4
SF53	11.0 ^{AAAA} ± 12	4.5 ^{AABA} ± 3	4.2 ^{AABA} ± 4	2.7 ^{AA} ± 2	2.3 ^{AB} ± 1	1.6 ^A ± 1	1.5 ^{AB} ± 1
I31	6.3 ^{ABBA} ± 5	11.5 ^{AAAA} ± 5	4.4 ^{ABBA} ± 9	9.2 ^{BABAB} ± 11	5.7 ^{AB} ± 4	7.7 ^{AB} ± 12	6.4 ^{AB} ± 11
CG719	9.0 ^{AAAAAA} ± 7	16.4 ^{BBABBA} ± 10	13.9 ^{BBBBBA} ± 11	14.7 ^{BBBABA} ± 11	11.8 ^{BA} ± 10	8.2 ^{BAB} ± 7	9.7 ^{BAB} ± 9
I40	10.0 ^{AAAAAA} ± 7	17.7 ^{BBABBA} ± 12	12.0 ^{BBBBBA} ± 13	10.8 ^{BBBABA} ± 12	10.3 ^{BABA} ± 9	7.4 ^{AB} ± 8	6.0 ^{AB} ± 9
Control	30.8 ^C ± 16	24. ^C ± 16	18.3 ^{CBAB} ± 12	8.2 ^{AABABA} ± 8	63.8 ^C ± 22	34.1 ^C ± 11	27.2 ^C ± 28

Means followed by the same letter (A, B and C) in the columns were not statistically different ($P > 0.01$).

Figura 1. Mean number of non-predated first stage larvae (L_1) of *Angiostrongylus cantonensis* recovered in medium 2% water–agar on the seventh day after the treatments with the different isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001, CG768 and CG722), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *M. sinense* (SF53), *Arthrobotrys robusta* (I31), *A. cladodes* (CG719) and *A. conoides* (I40) and of control (without fungi). Barr e presents the standard deviation. Means followed by the same letter (A, B and C) in the lines were not statistically different ($P > 0.05$).

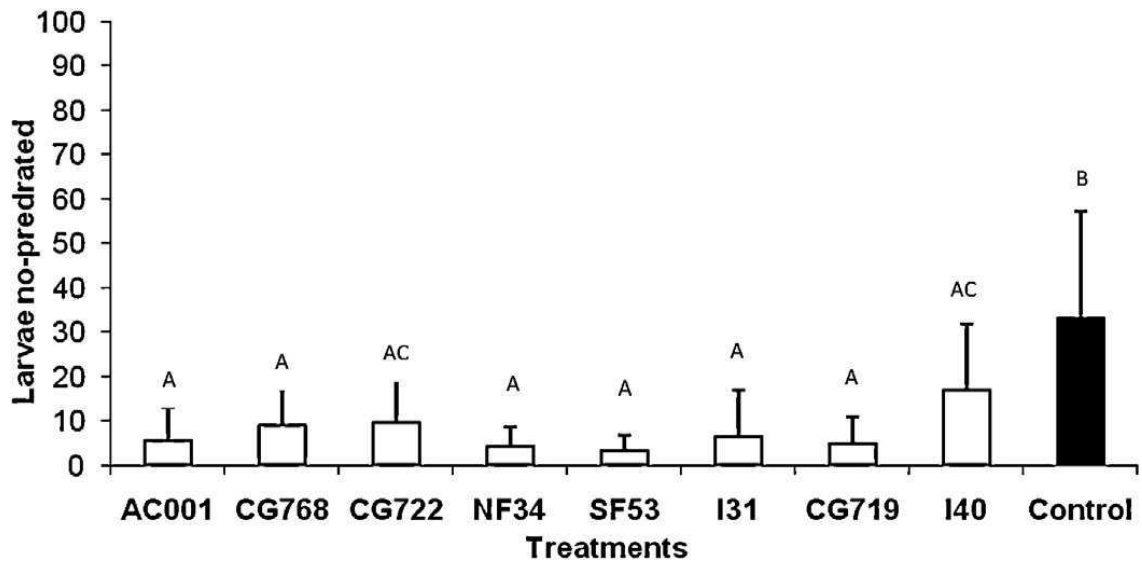
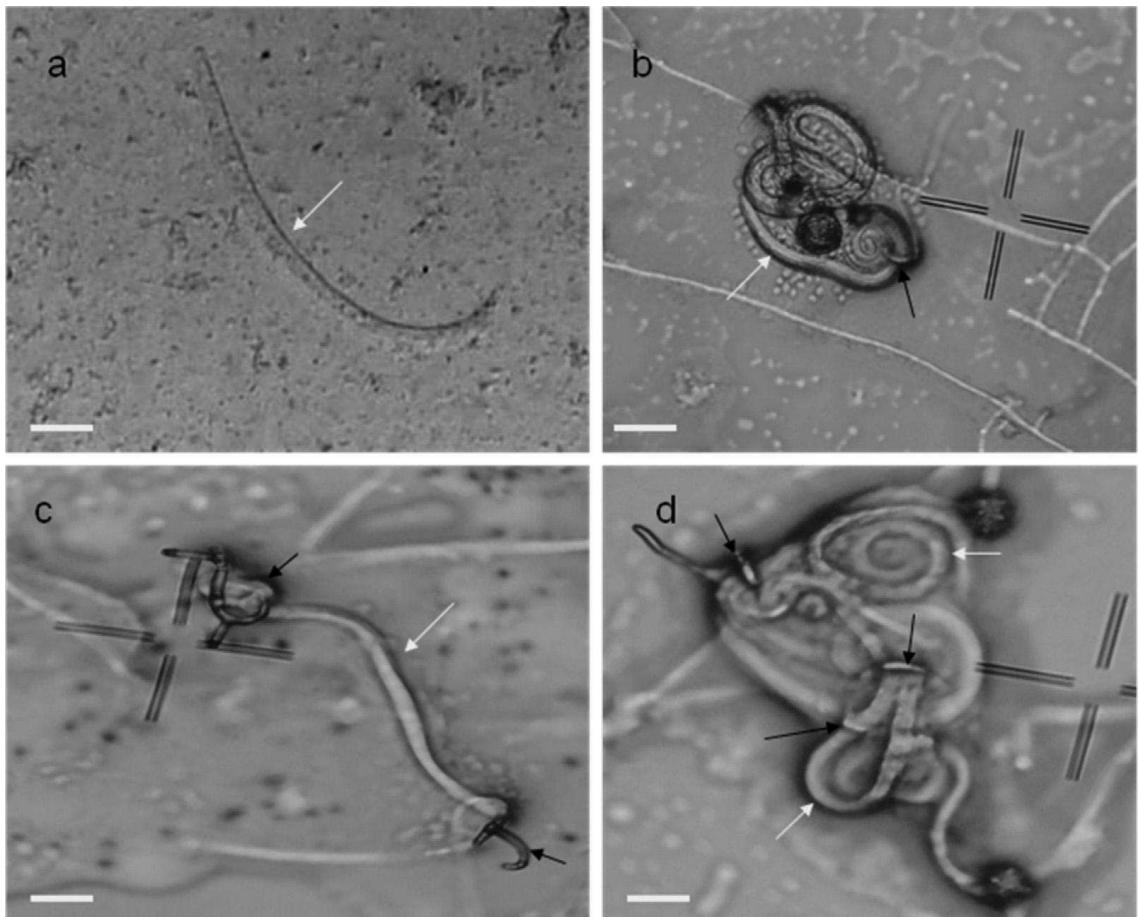


Figura. 2. (a) Control (white arrow), (b) trap formation (black arrow) by the tested fungal isolates *Duddingtonia*, (c) *Monacrosporium*, (d) *Arthrobotrys* and predated first stage larval of *A. cantonensis* (white arrow). Optical microscopy – 40× objective lens. Bars: (A) 14 μm ; (B) 4.2 μm ; (C) 14.2 μm and (D) 7.2 μm .



7. APÊNDICE

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Coluna 1= isolado AC001

Coluna 2= isolado CG768

Coluna 3= isolado CG722

Coluna 4= isolado NF34

Coluna 5= isolado SF53

Coluna 6= isolado I31

Coluna 7= isolado CG719

Coluna 8= isolado I40

Coluna 9= Controle

Comparação das médias de larvas de *A. cantonensis* não predadas observadas nos campos aleatórios das placas de petri contendo os diferentes isolados e do controle no primeiro dia de interação.

(Teste de Tukey com 1% e 5% de probabilidade).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	8	25.4 e+03	31.8 e+02
Erro	531	53.5 e+03	100.691
F =	31.5760		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	7.8333		
Média (Coluna 2) =	14.5833		
Média (Coluna 3) =	14.0000		
Média (Coluna 4) =	14.0333		
Média (Coluna 5) =	11.0500		
Média (Coluna 6) =	6.3500		
Média (Coluna 7) =	9.0667		
Média (Coluna 8) =	9.9333		
Média (Coluna 9) =	30.8833		

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	6.7500	5.2106	< 0.01
Médias (1 a 3) =	6.1667	4.7603	< 0.05
Médias (1 a 4) =	6.2000	4.7860	< 0.05
Médias (1 a 5) =	3.2167	2.4831	Ns
Médias (1 a 6) =	1.4833	1.1450	Ns
Médias (1 a 7) =	1.2333	0.9521	Ns
Médias (1 a 8) =	2.1000	1.6211	Ns
Médias (1 a 9) =	23.0500	17.7931	< 0.01
Médias (2 a 3) =	0.5833	0.4503	Ns
Médias (2 a 4) =	0.5500	0.4246	Ns
Médias (2 a 5) =	3.5333	2.7275	Ns
Médias (2 a 6) =	8.2333	6.3556	< 0.01
Médias (2 a 7) =	5.5167	4.2585	Ns
Médias (2 a 8) =	4.6500	3.5895	Ns
Médias (2 a 9) =	16.3000	12.5825	< 0.01
Médias (3 a 4) =	0.0333	0.0257	Ns
Médias (3 a 5) =	2.9500	2.2772	Ns
Médias (3 a 6) =	7.6500	5.9053	< 0.01
Médias (3 a 7) =	4.9333	3.8082	Ns
Médias (3 a 8) =	4.0667	3.1392	Ns
Médias (3 a 9) =	16.8833	13.0328	< 0.01
Médias (4 a 5) =	2.9833	2.3029	Ns
Médias (4 a 6) =	7.6833	5.9310	< 0.01
Médias (4 a 7) =	4.9667	3.8339	Ns
Médias (4 a 8) =	4.1000	3.1649	Ns
Médias (4 a 9) =	16.8500	13.0071	< 0.01
Médias (5 a 6) =	4.7000	3.6281	Ns
Médias (5 a 7) =	1.9833	1.5310	Ns
Médias (5 a 8) =	1.1167	0.8620	Ns
Médias (5 a 9) =	19.8333	15.3100	< 0.01
Médias (6 a 7) =	2.7167	2.0971	Ns
Médias (6 a 8) =	3.5833	2.7661	Ns
Médias (6 a 9) =	24.5333	18.9381	< 0.01
Médias (7 a 8) =	0.8667	0.6690	Ns
Médias (7 a 9) =	21.8167	16.8410	< 0.01
Médias (8 a 9) =	20.9500	16.1720	< 0.01

Comparação das médias de larvas de *A. cantonensis* não predadas observadas nos campos aleatórios das placas de petri contendo os diferentes isolados e do controle no segundo dia de interação. (Teste de Tukey com 1% e 5% de probabilidade).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	8	20.0 e+03	25.0 e+02
Erro	531	58.0 e+03	109.236
F =	22.9260		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	8.8500		
Média (Coluna 2) =	6.9000		
Média (Coluna 3) =	16.9667		
Média (Coluna 4) =	7.7167		
Média (Coluna 5) =	4.5833		
Média (Coluna 6) =	11.5000		
Média (Coluna 7) =	16.4167		
Média (Coluna 8) =	17.6833		
Média (Coluna 9) =	24.3833		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	1.9500	1.4452	Ns
Médias (1 a 3) =	8.1167	6.0155	< 0.01
Médias (1 a 4) =	1.1333	0.8399	Ns
Médias (1 a 5) =	4.2667	3.1621	Ns
Médias (1 a 6) =	2.6500	1.9640	Ns
Médias (1 a 7) =	7.5667	5.6079	< 0.01
Médias (1 a 8) =	8.8333	6.5466	< 0.01
Médias (1 a 9) =	15.5333	11.5122	< 0.01
Médias (2 a 3) =	10.0667	7.4607	< 0.01
Médias (2 a 4) =	0.8167	0.6053	Ns
Médias (2 a 5) =	2.3167	1.7169	Ns
Médias (2 a 6) =	4.6000	3.4092	Ns
Médias (2 a 7) =	9.5167	7.0530	< 0.01
Médias (2 a 8) =	10.7833	7.9918	< 0.01
Médias (2 a 9) =	17.4833	12.9574	< 0.01
Médias (3 a 4) =	9.2500	6.8554	< 0.01
Médias (3 a 5) =	12.3833	9.1776	< 0.01
Médias (3 a 6) =	5.4667	4.0515	Ns
Médias (3 a 7) =	0.5500	0.4076	Ns
Médias (3 a 8) =	0.7167	0.5311	Ns

Médias (3 a 9) =	7.4167	5.4967	< 0.01
Médias (4 a 5) =	3.1333	2.3222	Ns
Médias (4 a 6) =	3.7833	2.8039	Ns
Médias (4 a 7) =	8.7000	6.4478	< 0.01
Médias (4 a 8) =	9.9667	7.3866	< 0.01
Médias (4 a 9) =	16.6667	12.3521	< 0.01
Médias (5 a 6) =	6.9167	5.1261	< 0.01
Médias (5 a 7) =	11.8333	8.7700	< 0.01
Médias (5 a 8) =	13.1000	9.7088	< 0.01
Médias (5 a 9) =	19.8000	14.6743	< 0.01
Médias (6 a 7) =	4.9167	3.6439	Ns
Médias (6 a 8) =	6.1833	4.5826	< 0.05
Médias (6 a 9) =	12.8833	9.5482	< 0.01
Médias (7 a 8) =	1.2667	0.9388	Ns
Médias (7 a 9) =	7.9667	5.9043	< 0.01
Médias (8 a 9) =	6.7000	4.9655	< 0.05

Comparação das médias de larvas de *A. cantonensis* não predadas observadas nos campos aleatórios das placas de petri contendo os diferentes isolados e do controle no terceiro dia de interação (Teste de Tukey com 1% e 5% de probabilidade).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	8	19.7 e+03	24.6 e+02
Erro	531	65.7 e+03	123.793
F =	19.8993		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	4.2000		
Média (Coluna 2) =	4.0667		
Média (Coluna 3) =	20.5667		
Média (Coluna 4) =	5.1667		
Média (Coluna 5) =	4.2333		
Média (Coluna 6) =	8.4333		
Média (Coluna 7) =	13.9333		

Média (Coluna 8) = 12.0167
 Média (Coluna 9) = 18.3333

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	0.1333	0.0928	ns
Médias (1 a 3) =	16.3667	11.3943	< 0.01
Médias (1 a 4) =	0.9667	0.6730	ns
Médias (1 a 5) =	0.0333	0.0232	ns
Médias (1 a 6) =	4.2333	2.9472	ns
Médias (1 a 7) =	9.7333	6.7763	< 0.01
Médias (1 a 8) =	7.8167	5.4419	< 0.01
Médias (1 a 9) =	14.1333	9.8395	< 0.01
Médias (2 a 3) =	16.5000	11.4871	< 0.01
Médias (2 a 4) =	1.1000	0.7658	ns
Médias (2 a 5) =	0.1667	0.1160	ns
Médias (2 a 6) =	4.3667	3.0400	ns
Médias (2 a 7) =	9.8667	6.8691	< 0.01
Médias (2 a 8) =	7.9500	5.5347	< 0.01
Médias (2 a 9) =	14.2667	9.9323	< 0.01
Médias (3 a 4) =	15.4000	10.7213	< 0.01
Médias (3 a 5) =	16.3333	11.3711	< 0.01
Médias (3 a 6) =	12.1333	8.4471	< 0.01
Médias (3 a 7) =	6.6333	4.6181	< 0.05
Médias (3 a 8) =	8.5500	5.9524	< 0.01
Médias (3 a 9) =	2.2333	1.5548	ns
Médias (4 a 5) =	0.9333	0.6498	ns
Médias (4 a 6) =	3.2667	2.2742	ns
Médias (4 a 7) =	8.7667	6.1033	< 0.01
Médias (4 a 8) =	6.8500	4.7689	< 0.05
Médias (4 a 9) =	13.1667	9.1665	< 0.01
Médias (5 a 6) =	4.2000	2.9240	ns
Médias (5 a 7) =	9.7000	6.7530	< 0.01
Médias (5 a 8) =	7.7833	5.4187	< 0.01
Médias (5 a 9) =	14.1000	9.8163	< 0.01
Médias (6 a 7) =	5.5000	3.8290	ns
Médias (6 a 8) =	3.5833	2.4947	ns
Médias (6 a 9) =	9.9000	6.8923	< 0.01
Médias (7 a 8) =	1.9167	1.3344	ns
Médias (7 a 9) =	4.4000	3.0632	ns
Médias (8 a 9) =	6.3167	4.3976	< 0.05

Comparação das médias de larvas de *A. cantonensis* não predadas observadas nos campos aleatórios das placas de petri contendo os diferentes isolados e do controle no quarto dia de interação.
(Teste de Tukey com 1% e 5% de probabilidade).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	8	78.8 e+02	98.5 e+01
Erro	531	41.7 e+03	78.570
F =	12.5319		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	3.5000		
Média (Coluna 2) =	5.4833		
Média (Coluna 3) =	11.3000		
Média (Coluna 4) =	4.6000		
Média (Coluna 5) =	2.6833		
Média (Coluna 6) =	9.1667		
Média (Coluna 7) =	14.7000		
Média (Coluna 8) =	10.8167		
Média (Coluna 9) =	8.2333		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	1.9833	1.7332	ns
Médias (1 a 3) =	7.8000	6.8162	< 0.01
Médias (1 a 4) =	1.1000	0.9613	ns
Médias (1 a 5) =	0.8167	0.7137	ns
Médias (1 a 6) =	5.6667	4.9519	< 0.05
Médias (1 a 7) =	11.2000	9.7874	< 0.01
Médias (1 a 8) =	7.3167	6.3938	< 0.01
Médias (1 a 9) =	4.7333	4.1363	ns
Médias (2 a 3) =	5.8167	5.0830	< 0.01
Médias (2 a 4) =	0.8833	0.7719	ns
Médias (2 a 5) =	2.8000	2.4468	ns
Médias (2 a 6) =	3.6833	3.2188	ns
Médias (2 a 7) =	9.2167	8.0542	< 0.01
Médias (2 a 8) =	5.3333	4.6606	< 0.05
Médias (2 a 9) =	2.7500	2.4031	ns
Médias (3 a 4) =	6.7000	5.8549	< 0.01

Médias (3 a 5) =	8.6167	7.5299	< 0.01
Médias (3 a 6) =	2.1333	1.8643	ns
Médias (3 a 7) =	3.4000	2.9712	ns
Médias (3 a 8) =	0.4833	0.4224	ns
Médias (3 a 9) =	3.0667	2.6799	ns
Médias (4 a 5) =	1.9167	1.6749	ns
Médias (4 a 6) =	4.5667	3.9907	ns
Médias (4 a 7) =	10.1000	8.8261	< 0.01
Médias (4 a 8) =	6.2167	5.4326	< 0.01
Médias (4 a 9) =	3.6333	3.1751	ns
Médias (5 a 6) =	6.4833	5.6656	< 0.01
Médias (5 a 7) =	12.0167	10.5010	< 0.01
Médias (5 a 8) =	8.1333	7.1075	< 0.01
Médias (5 a 9) =	5.5500	4.8500	< 0.05
Médias (6 a 7) =	5.5333	4.8354	< 0.05
Médias (6 a 8) =	1.6500	1.4419	ns
Médias (6 a 9) =	0.9333	0.8156	ns
Médias (7 a 8) =	3.8833	3.3935	ns
Médias (7 a 9) =	6.4667	5.6510	< 0.01
Médias (8 a 9) =	2.5833	2.2575	ns

Comparação das médias de larvas de *A. cantonensis* não predadas observadas nos campos aleatórios das placas de petri contendo os diferentes isolados e do controle no quinto dia de interação.

(Teste de Tukey com 1% e 5% de probabilidade).

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
		18.2	
Tratamentos	8	e+04	22.7 e+03
		46.8	
Erro	531	e+03	88.145
F =	258.0693		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	2.8167		
Média (Coluna 2) =	6.3000		
Média (Coluna 3) =	11.0000		
Média (Coluna 4) =	2.2500		

Média (Coluna 5) = 2.2667
 Média (Coluna 6) = 5.6667
 Média (Coluna 7) = 11.8167
 Média (Coluna 8) = 10.3333
 Média (Coluna 9) = 63.8667

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	3.4833	2.8739	ns
Médias (1 a 3) =	8.1833	6.7516	< 0.01
Médias (1 a 4) =	0.5667	0.4675	ns
Médias (1 a 5) =	0.5500	0.4538	ns
Médias (1 a 6) =	2.8500	2.3514	ns
Médias (1 a 7) =	9.0000	7.4254	< 0.01
Médias (1 a 8) =	7.5167	6.2016	< 0.01
Médias (1 a 9) =	61.0500	50.3688	< 0.01
Médias (2 a 3) =	4.7000	3.8777	ns
Médias (2 a 4) =	4.0500	3.3414	ns
Médias (2 a 5) =	4.0333	3.3277	ns
Médias (2 a 6) =	0.6333	0.5225	ns
Médias (2 a 7) =	5.5167	4.5515	< 0.05
Médias (2 a 8) =	4.0333	3.3277	ns
Médias (2 a 9) =	57.5667	47.4949	< 0.01
Médias (3 a 4) =	8.7500	7.2191	< 0.01
Médias (3 a 5) =	8.7333	7.2054	< 0.01
Médias (3 a 6) =	5.3333	4.4002	< 0.05
Médias (3 a 7) =	0.8167	0.6738	ns
Médias (3 a 8) =	0.6667	0.5500	ns
Médias (3 a 9) =	52.8667	43.6172	< 0.01
Médias (4 a 5) =	0.0167	0.0138	ns
Médias (4 a 6) =	3.4167	2.8189	ns
Médias (4 a 7) =	9.5667	7.8929	< 0.01
Médias (4 a 8) =	8.0833	6.6691	< 0.01
Médias (4 a 9) =	61.6167	50.8363	< 0.01
Médias (5 a 6) =	3.4000	2.8051	ns
Médias (5 a 7) =	9.5500	7.8792	< 0.01
Médias (5 a 8) =	8.0667	6.6553	< 0.01
Médias (5 a 9) =	61.6000	50.8226	< 0.01
Médias (6 a 7) =	6.1500	5.0740	< 0.05
Médias (6 a 8) =	4.6667	3.8502	ns
Médias (6 a 9) =	58.2000	48.0174	< 0.01
Médias (7 a 8) =	1.4833	1.2238	ns
Médias (7 a 9) =	52.0500	42.9434	< 0.01
Médias (8 a 9) =	53.5333	44.1672	< 0.01

Comparação das médias de larvas de *A. cantonensis* não predadas observadas nos campos aleatórios das placas de petri contendo os diferentes isolados e do controle no sexto dia de interação.

(Teste de Tukey com 1% e 5% de probabilidade)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	8	48.2 e+03	60.3 e+02
Erro	531	42.5 e+03	80.010
F =	75.3549		
(p) =	< 0.0001		
Média (Coluna 1) =	2.7500		
Média (Coluna 2) =	6.0667		
Média (Coluna 3) =	14.1500		
Média (Coluna 4) =	2.7333		
Média (Coluna 5) =	1.6500		
Média (Coluna 6) =	7.5500		
Média (Coluna 7) =	8.2333		
Média (Coluna 8) =	7.3667		
Média (Coluna 9) =	34.1500		
Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	3.3167	2.8721	ns
Médias (1 a 3) =	11.4000	9.8721	< 0.01
Médias (1 a 4) =	0.0167	0.0144	ns
Médias (1 a 5) =	1.1000	0.9526	ns
Médias (1 a 6) =	4.8000	4.1567	ns
Médias (1 a 7) =	5.4833	4.7484	< 0.05
Médias (1 a 8) =	4.6167	3.9979	ns
Médias (1 a 9) =	31.4000	27.1915	< 0.01
Médias (2 a 3) =	8.0833	6.9999	< 0.01
Médias (2 a 4) =	3.3333	2.8866	ns
Médias (2 a 5) =	4.4167	3.8247	ns
Médias (2 a 6) =	1.4833	1.2845	ns
Médias (2 a 7) =	2.1667	1.8763	ns
Médias (2 a 8) =	1.3000	1.1258	ns

Médias (2 a 9) =	28.0833	24.3194	< 0.01
Médias (3 a 4) =	11.4167	9.8865	< 0.01
Médias (3 a 5) =	12.5000	10.8247	< 0.01
Médias (3 a 6) =	6.6000	5.7154	< 0.01
Médias (3 a 7) =	5.9167	5.1237	< 0.01
Médias (3 a 8) =	6.7833	5.8742	< 0.01
Médias (3 a 9) =	20.0000	17.3195	< 0.01
Médias (4 a 5) =	1.0833	0.9381	ns
Médias (4 a 6) =	4.8167	4.1711	ns
Médias (4 a 7) =	5.5000	4.7628	< 0.05
Médias (4 a 8) =	4.6333	4.0123	ns
Médias (4 a 9) =	31.4167	27.2060	< 0.01
Médias (5 a 6) =	5.9000	5.1092	< 0.01
Médias (5 a 7) =	6.5833	5.7010	< 0.01
Médias (5 a 8) =	5.7167	4.9505	< 0.05
Médias (5 a 9) =	32.5000	28.1441	< 0.01
Médias (6 a 7) =	0.6833	0.5917	ns
Médias (6 a 8) =	0.1833	0.1588	ns
Médias (6 a 9) =	26.6000	23.0349	< 0.01
Médias (7 a 8) =	0.8667	0.7505	ns
Médias (7 a 9) =	25.9167	22.4431	< 0.01
Médias (8 a 9) =	26.7833	23.1936	< 0.01

Comparação das médias de larvas de *A. cantonensis* não predadas observadas nos campos aleatórios das placas de petri contendo os diferentes isolados e do controle no sétimo dia de interação.

(Teste de Tukey com 1% e 5% de probabilidade)

FONTES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM
Tratamentos	8	29.0 e+03	36.2 e+02
Erro	531	86.6 e+03	163.151
F =	22.1990		
(p) =	< 0.0001		

Média (Coluna 1) =	2.2667
Média (Coluna 2) =	6.6667
Média (Coluna 3) =	11.5333
Média (Coluna 4) =	3.9500
Média (Coluna 5) =	1.5167
Média (Coluna 6) =	6.4167
Média (Coluna 7) =	9.7000
Média (Coluna 8) =	6.0333
Média (Coluna 9) =	27.2167

Tukey:	Diferença	Q	(p)
Médias (1 a 2) =	4.4000	2.6683	ns
Médias (1 a 3) =	9.2667	5.6196	< 0.01
Médias (1 a 4) =	1.6833	1.0208	ns
Médias (1 a 5) =	0.7500	0.4548	ns
Médias (1 a 6) =	4.1500	2.5167	ns
Médias (1 a 7) =	7.4333	4.5078	< 0.05
Médias (1 a 8) =	3.7667	2.2842	ns
Médias (1 a 9) =	24.9500	15.1304	< 0.01
Médias (2 a 3) =	4.8667	2.9513	ns
Médias (2 a 4) =	2.7167	1.6475	ns
Médias (2 a 5) =	5.1500	3.1231	ns
Médias (2 a 6) =	0.2500	0.1516	ns
Médias (2 a 7) =	3.0333	1.8395	ns
Médias (2 a 8) =	0.6333	0.3841	ns
Médias (2 a 9) =	20.5500	12.4621	< 0.01
Médias (3 a 4) =	7.5833	4.5988	< 0.05
Médias (3 a 5) =	10.0167	6.0744	< 0.01
Médias (3 a 6) =	5.1167	3.1029	ns
Médias (3 a 7) =	1.8333	1.1118	ns
Médias (3 a 8) =	5.5000	3.3354	ns
Médias (3 a 9) =	15.6833	9.5108	< 0.01
Médias (4 a 5) =	2.4333	1.4756	ns
Médias (4 a 6) =	2.4667	1.4959	ns
Médias (4 a 7) =	5.7500	3.4870	ns
Médias (4 a 8) =	2.0833	1.2634	ns
Médias (4 a 9) =	23.2667	14.1096	< 0.01
Médias (5 a 6) =	4.9000	2.9715	ns
Médias (5 a 7) =	8.1833	4.9626	< 0.05
Médias (5 a 8) =	4.5167	2.7390	ns
Médias (5 a 9) =	25.7000	15.5853	< 0.01
Médias (6 a 7) =	3.2833	1.9911	ns
Médias (6 a 8) =	0.3833	0.2325	ns
Médias (6 a 9) =	20.8000	12.6137	< 0.01
Médias (7 a 8) =	3.6667	2.2236	ns
Médias (7 a 9) =	17.5167	10.6226	< 0.01

Médias (8 a 9) = 21.1833 12.8462 < 0.01