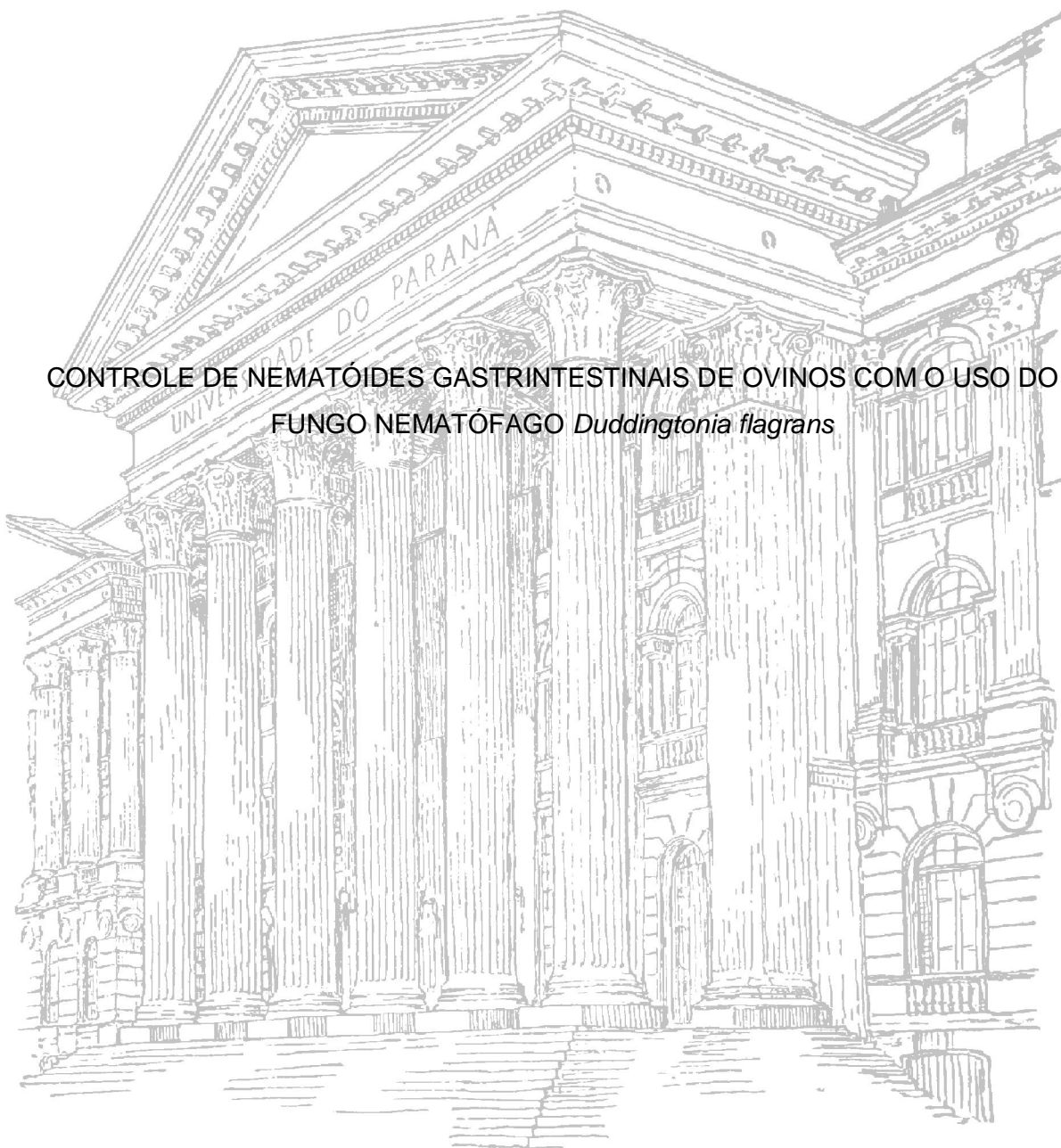


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FLÁVIA BIASOLI DE ARAÚJO

CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS COM O USO DO
FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia flagrans*



CURITIBA

2009

FLÁVIA BIASOLI DE ARAÚJO

CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS COM O USO DO
FUNGO NEMATÓFAGO *Duddingtonia flagrans*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Departamento Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre junto à Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA

2009

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho a Deus, meu referencial.

Aos meus pais, Flávio e Tania, meus mestres da vida, que sempre acreditaram em mim, parceiros leais de todas minhas jornadas.

Ao meu querido Daniel, que meras palavras que eu aqui escreva, serão insignificantes diante do que representou nessa etapa e do que representa na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Marcelo Beltrão Molento, que com sua experiência, profissionalismo e competência, ensinou-me como ter ética e disciplina diante da magnitude de uma pesquisa.

Ao Dr. Clóvis de Paula Santos que, incansavelmente, contribuiu para a elaboração desse trabalho, além de subsidiá-lo parte do mesmo.

Ao Professor Alexander Welker Biondo por aceitar o convite como membro da banca.

Ao Professor Ivan Barros por fazer parte do meu comitê de orientação.

Ao Professor Ivan Deconto, por estar como membro suplente.

Ao Diretor do Hospital Veterinário, Prof. Rogério Ribas Lange.

À D. Maria Rosa Câmara, Técnica do Laboratório de Doenças Parasitárias, amiga de todas as horas, pessoa imprescindível nessa etapa da minha vida.

À Maria José Maeda, Secretária do Curso de Pós-Graduação, pelo carinho, paciência, e por tratar, nós alunos, com tanta atenção e dedicação.

A todos os estagiários do Laboratório, especialmente a Fernanda Freda Pereira, minha conterrânea e amiga.

As minhas colegas de mestrado Helen Aline, Sandra, Vanessa, Marco Antônio e toda turma que ingressou no mesmo ano comigo.

A todo pessoal da Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), pela hospitalidade e cordialidade recebidas.

À Simone Amadeu, Bibliotecária do Setor de Ciências Agrárias, pela disponibilidade.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária.

Aos funcionários da Secretaria do Hospital Veterinário.

Pela imensa disposição e carinho dos funcionários do Setor de Grandes Animais, do Hospital Veterinário.

A todos os funcionários responsáveis pela limpeza, manutenção, ordem e segurança da Faculdade de Veterinária.

À Capes, pela concessão da bolsa.

E por último, mas nem por isso menos importante, aos animais que participaram dessa pesquisa, pois como citou Ivan Barbosa Machado Sampaio,

“Animal Experimental: sob nosso controle, ele cresce, depende e confia. Respeito haja, enquanto vivo, pois não será em vão seu sacrifício.” *

*(Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 2ª.Ed. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Zootecnia – UFMG, Belo Horizonte – MG, maio de 2002).

“É MELHOR TENTAR E FALHAR, QUE PREOCUPAR-SE E VER A VIDA PASSAR. É MELHOR TENTAR, AINDA QUE EM VÃO, QUE SENTAR-SE FAZENDO NADA ATÉ O FINAL. EU PREFIRO NA CHUVA CAMINHAR, QUE EM DIAS TRISTES EM CASA ME ESCONDER. PREFIRO SER FELIZ, EMBORA LOUCO, QUE EM CONFORMIDADE VIVER”.

MARTIN LUTHER KING

RESUMO

As perdas produtivas relacionadas com as nematodioses gastrintestinais em pequenos ruminantes, são alarmantes no mundo inteiro e os prejuízos econômicos causados são estimados em milhões de dólares. Embora existam diversas formas de controle para amenizar as infecções, o uso de anti-helmínticos é o mais tradicionalmente utilizado. As consequências geradas pelo controle químico, vêm estimulando pesquisas com métodos alternativos: fitoterápicos, tratamento seletivo, seleção genética de hospedeiros e o controle biológico. O fungo nematófago *Duddingtonia flagrans*, um controlador biológico, tem sido estudado como predador de larvas de nematóides gastrintestinais. A hipótese é que o controle com o fungo cause uma diminuição na quantidade dos nematóides nas pastagens, reduzindo a taxa de contaminação dos animais e seus potenciais efeitos deletérios. O objetivo desse trabalho foi testar a atividade de *D. flagrans* contra nematóides gastrintestinais de ovinos. Foram realizados quatro experimentos: 1- *In Vitro*: onde fezes dos animais foram expostas a diferentes concentrações do fungo, em placas de petri, sob condições laboratoriais, sem a interferência de fatores adversos; 2- *In Vivo*: foi determinada a sobrevivência de *D. flagrans* após administração oral e passagem pelo trânsito gastrintestinal dos animais; 3- Foi observada a captura e infecção de *H. contortus* pelo fungo *D. flagrans* e 4- *D. flagrans* no ambiente: onde determinou-se a eficácia do isolado em pastagem artificialmente contaminada com fezes de ovinos doadores. Os resultados confirmaram, em parte, a hipótese da atividade fúngica como controlador biológico. Nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, houve redução significativa do número de larvas em relação aos grupos controles ($p < 0,001$), embora no quarto trabalho, a redução de larvas nas pastagens tenha sido inconsistente devido à diversidade de variáveis ocorridas no período experimental. É importante conhecer a biologia do *D. flagrans*, como a capacidade de multiplicação no ambiente e suas estruturas predatórias para determinar as possibilidades de implementação desse controle. Por meio dessas análises, pôde-se atestar a eficácia nos experimentos 1 e 2 desse promissor método de controle.

Palavras-Chave: *Duddingtonia flagrans*. Nematóides gastrintestinais. Controle biológico. Pequenos ruminantes.

ABSTRACT

The productive losses related to gastrointestinal nematodioses in small ruminants, not only in Brazil, are alarming in the entire world, are alarming and the caused economic damages are estimated as millions of dollars. Although diverse forms exist to reduce the infections, the use of anti-helmitics is the most traditionally used. The consequences caused by chemical control, have been stimulating researches with alternative methods: phytotherapics, host genetic selection, selective treatment and biological control. The nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, a biological controller, has been studied as a predator of larvae of gastrointestinal nematodes. The hypothesis is that the control with the use of the fungi reduces the amount of nematodes in the pastures, reducing the animals' contamination tax and its potential deleterious effect. The objective of this work was to test the activity of the fungi in sheep against gastrointestinal nematodes of sheep. Four experiments had been carried through: 1- *In Vitro*, in which excrements of the animals had been exposed to the fungi, in plates of petri, under laboratorial conditions, without the interference of adverse factors. 2- *In Vivo*, in which the efficacy of the *D. flagrans* on gastrointestinal nematodes had been determined with oral administration to the animals. 3- The infection and capture of *H. contortus* by the fungi *D. flagrans* was observed and 4- *D. flagrans* on the environment: to determinate the efficacy of the isolated into artificially infected grazing with feces from donator sheep. The results had confirmed, in part, the hypothesis of fungal activity as a biological controller. In the *in vitro* and *in vivo* experiments, the number of larvae had significant reduction in relation to the control groups ($p < 0.001$), even though in the forth study, the reduction of pastures larvae has been inconsistent given the diversity of variable taking place in the period of the experiment. It is important to know the *D. flagrans* biology, as his multiplying capacity on the environment and his predators structures to determinate the implementation possibilities to this way of control. By means of these analyses, the efficacy of this promising control method in the experiments 1 and 2 could be confirmed.

Key-Words: *Duddingtonia flagrans*. Gastrointestinal nematodes. Nematophagous fungi. Biological control. Small ruminants.

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 3.1 –	MÉDIA DAS TRIPLICATAS E TRIPLICATAS DA CONTAGEM DE LARVAS RECUPERADAS DAS COPROCULTURAS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE <i>Duddingtonia flagrans</i> EM DIFERENTES DOSES (g) DO ENSAIO 1. LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÕES E VALORES DE R^2	68
GRÁFICO 3.2 –	MÉDIA DAS TRIPLICATAS E TRIPLICATAS DA CONTAGEM DE LARVAS RECUPERADAS DAS COPROCULTURAS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE <i>Duddingtonia flagrans</i> EM DIFERENTES DOSES (g) DO ENSAIO 2. LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÕES E VALORES DE R^2	71
GRÁFICO 4.1 –	VALORES MÉDIOS DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO), LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2	88
GRÁFICO 4.2 –	VALORES DA PRIMEIRA UNIDADE DA TRIPLICATA DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO), LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2	89
GRÁFICO 4.3 –	VALORES DA SEGUNDA UNIDADE DA TRIPLICATA DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO) LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2	90
GRÁFICO 4.4 –	VALORES DA TERCEIRA UNIDADE DA TRIPLICATA DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO) LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2	90
GRÁFICO 6.1 -	CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DURANTE TODO O PERÍODO EXPERIMENTAL	110
GRÁFICO 6.2 -	MÉDIA DE LARVAS INFECTANTES POR QUILOGRAMA DE MATÉRIA SECA, RECUPERADAS NA PASTAGEM INOCULADA COM <i>D. flagrans</i>	111

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 -	CICLO BIOLÓGICO DOS NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS.....	22
FIGURA 2.2 -	LANCETA BUCAL (PARTE ANTERIOR) DE <i>Haemonchus contortus</i>	26
FIGURA 2.3 -	BOLSA COPULATÓRIA (PARTE POSTERIOR) DE <i>Haemonchus contortus</i>	26
FIGURA 2.4 -	FUNGO NEMATÓFAGO <i>Arthrobotrys oligospora</i> COM SUAS ESTRUTURAS PREDATÓRIAS.....	35
FIGURA 2.5 -	ÓRGÃOS DE CAPTURA DE FUNGOS NEMATÓFAGOS PREDADORES.....	36
FIGURA 2.6 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CONIDIÓFOROS E CONÍDIOS EM VÁRIOS ESTÁGIOS DE DESENVOLVIMENTO COM CLAMIDÓSPOROS INTERCALADOS (SETA) DE <i>Duddingtonia flagrans</i>	39
FIGURA 2.7 -	CONTAGEM DE CLAMIDÓSPOROS PELA CÂMARA DE NEUBAUER.....	43
FIGURA 3.1 -	TUBOS DE ENSAIO CONTENDO 1 mL DE LARVAS INFECTANTES PROVENIENTES DA RECUPERAÇÃO DAS L ₃ PELA TÉCNICA DE BAERMANN APÓS REALIZAÇÃO DO ENSAIO 1.....	64
FIGURA 4.1 -	OVINOS COM BOLSAS COLÉTORAS PARA COLHEITA DE FEZES.....	82
FIGURA 5.1 -	ESPOROS DE <i>Duddingtonia flagrans</i> IDENTIFICADOS POR SETAS.....	100
FIGURA 5.2 -	ARMADILHAS ADESIVAS (SETAS) DE <i>Duddingtonia flagrans</i> EM RESPOSTA À PRESENÇA DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS.....	100
FIGURA 5.3 -	1 HORA.....	100
FIGURA 5.4 -	3 HORAS.....	100
FIGURA 5.5 -	4 HORAS.....	100
FIGURA 5.6 -	5 HORAS.....	100
FIGURA 5.7 -	10 HORAS.....	101
FIGURA 5.8 -	15 HORAS.....	101
FIGURA 5.9 -	20 HORAS.....	101
FIGURA 5.10 -	25 HORAS.....	101
FIGURA 6.1 -	CORTE DA PASTAGEM EM SUB-ÁREA DE 15 cm ² PARA OBTENÇÃO DE LARVAS E QUANTIFICAÇÃO DE MATÉRIA SECA.....	108

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 -	MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DO NÚMERO TOTAL DE LARVAS OBTIDAS A PARTIR DAS COPROCULTURAS REALIZADAS NO ENSAIO 1 DOS ANIMAIS COM OPG ACIMA DE 1000.....	66
TABELA 3.2 -	TESTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN DO ENSAIO 1, PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE QUANTIDADE DE LARVAS OBTIDAS E ADIÇÃO FÚNGICA EM DIFERENTES DOSES.....	67
TABELA 3.3 -	MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DO NÚMERO TOTAL DE LARVAS OBTIDAS A PARTIR DAS COPROCULTURAS REALIZADAS NO ENSAIO 2 DOS ANIMAIS COM OPG ACIMA DE 800.....	69
TABELA 3.4 -	TESTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN DO ENSAIO 2, PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE QUANTIDADE DE LARVAS OBTIDAS E ADIÇÃO FÚNGICA EM DIFERENTES DOSES.....	70
TABELA 3.5 -	CONTAGEM E PERCENTUAL DE REDUÇÃO (DESVIO PADRÃO) DO NÚMERO DE LARVAS DE NEMATÓIDES DE OVINOS NOS ENSAIOS 1 E 2, EM DIFERENTES DOSES DE <i>D. flagrans</i> (CLAMIDÓSPOROS POR QUILOGRAMA DE PESO VIVO EM OVINOS – CLAM/KG/PV).....	72
TABELA 4.1 -	QUANTIDADE DE CLAMIDÓSPOROS DE <i>Duddingtonia flagrans</i> ADMINISTRADOS AOS OVINOS, DE ACORDO COM SEU PESO VIVO E SEU GRUPO EXPERIMENTAL.....	81
TABELA 4.2 -	TEMPERATURAS MÁXIMAS E MÍNIMAS DOS 13 DIAS DE COLHEITAS.....	83
TABELA 4.3 -	DADOS DESCRITIVOS DA MÉDIA DE OVOS POR GRAMA DE FEZES, DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS DURANTE O PERÍODO DE ADMINISTRAÇÃO DE <i>Duddingtonia flagrans</i>	84
TABELA 4.4 -	DADOS DESCRITIVOS DA MÉDIA DE OVOS POR GRAMA DE FEZES, DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS DURANTE O PERÍODO EM QUE NÃO RECEBERAM <i>Duddingtonia flagrans</i>	85
TABELA 4.5 -	PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCULTRAS EXTRAÍDAS DA ESTUFA (28°C) A PARTIR DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>D. flagrans</i> A OVINOS	86
TABELA 4.6 -	PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCULTRAS SOB A TEMPERATURA MÉDIA DE 15°C, A PARTIR DA ADMINISTRAÇÃO DE <i>D. flagrans</i> A OVINOS.....	86
TABELA 4.7 -	PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCULTRAS, EXTRAÍDAS DA ESTUFA (28°C), NOS DIAS PÓS-ADMINISTRAÇÃO DE <i>D. flagrans</i> A OVINOS.....	87
TABELA 4.8 -	PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCULTRAS SOB A TEMPERATURA (MÉDIA DE 15°C), NOS DIAS PÓS-ADMINISTRAÇÃO DE <i>D. flagrans</i> A OVINOS.....	87
TABELA 6.1 -	QUANTIDADE DE CLAMIDÓSPOROS de <i>Duddingtonia flagrans</i> ADMINISTRADOS AOS OVINOS, DE ACORDO COM SEU PESO VIVO E SEU GRUPO EXPERIMENTAL.....	107
TABELA 6.2 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA COMPARANDO OS QUATRO TRATAMENTOS.....	112
TABELA 6.3 -	ANÁLISE DE VARIÂNCIA COMPARANDO O FATOR DIAS (TEMPO) E DIAS*TRATAMENTO.....	112
TABELA 6.4 -	PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES NA PASTAGEM POR QUILOGRAMA DE MATÉRIA SECA EM RELAÇÃO AO PRIMEIRO DIA DE COLHEITA (DIA ZERO), E SUCESSIVAMENTE, AO DIA ANTERIOR, ATÉ A ÚLTIMA COLHEITA.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

Cfb – Classificação climática

cm² - Centímetro quadrado - unidade de área

CPG – Clamidósporos por grama de fezes

g – Grama (s)

GL – Graus de liberdade

Kg – Quilograma

L₁ – Larva de primeiro estágio

L₂ – Larva de segundo estágio

L₃ – Larva infectante, de terceiro estágio

L₄ – Larva de quarto estágio

LDP – Laboratório de Doenças Parasitárias, UFPR

mL – Mililitro

mM – Milimolar

mm³ - milímetro cúbico

M – Molar

MS – Matéria seca

OPG – Ovos por grama de fezes

pH – Potencial Hidrogênioônico

PO – Via oral

PV – Peso vivo

p – Probabilidade

R² - Coeficiente de determinação

RA – Resistência anti-helmíntica

RAM – Resistência anti-helmíntica múltipla

SIMEPAR – Instituto Tecnológico SIMEPAR (antiga sigla de Sistema Meteorológico do Paraná)

SPSS - Statistical Package for the Social Sciences

UENF – Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

UFPR – Universidade Federal do Paraná

® - Marca Registrada

μm - Micrômetro

μL - Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	18
1.1	OBJETIVO GERAL.....	19
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
2	ASPECTOS GERAIS DAS NEMATODIOSES GASTRINTESTINAIS DE	
	OVINOS.....	20
2.1	SITUAÇÃO ATUAL DAS NEMATODIOSES.....	20
2.2	CICLO BIOLÓGICO DOS NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS.....	21
2.2.1	Nematóides de maior importância econômica.....	23
2.2.1.1	Taxonomia e morfologia dos nematóides de maior importância econômica.....	24
2.2.1.2	<i>Haemonchus contortus</i>	25
2.2.1.3	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	26
2.2.1.4	Distribuição das nematodioses gastrintestinais em ovinos.....	27
2.2.1.5	Métodos de controle das nematodioses gastrintestinais e a resistência anti-helmíntica (RA).....	28
2.3	CONTROLE BIOLÓGICO E OUTRAS FORMAS DE CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES.....	30
2.4	FUNGOS NEMATÓFAGOS.....	33
2.4.1	Gêneros de fungos nematófagos.....	34
2.4.2	Locais de isolamento dos fungos nematófagos.....	34
2.4.3	Biologia dos fungos nematófagos.....	34
2.4.4	Grupos dos fungos nematófagos.....	35
2.4.5	Estruturas de administração do fungo.....	37
2.4.6	Formas de administração fúngica.....	38
2.4.7	<i>Duddingtonia flagrans</i>	38
2.4.8	Atividade nematocida dos fungos nematófagos predadores.....	40
2.4.9	Vantagens do uso de fungos nematófagos.....	40
2.4.10	Fatores determinantes para o emprego de fungos nematófagos.....	41
2.4.11	Produção do fungo.....	42

REFERÊNCIAS.....	44
3 EFICÁCIA <i>IN VITRO</i> DO FUNGO <i>Duddingtonia flagrans</i> CONTRA LARVAS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS.....	60
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
3.1 INTRODUÇÃO.....	62
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
3.2.1 Ensaio 1.....	63
3.2.2 Ensaio 2.....	64
3.2.2.1 Obtenção do número de larvas.....	64
3.2.3 Análise Estatística.....	65
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.3.1 Análise do Ensaio 1.....	65
3.3.2 Análise do Ensaio 2.....	68
3.4 CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	74
4 EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i>: ANÁLISE DA EFICÁCIA DO ISOLADO <i>Duddingtonia flagrans</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES APÓS PASSAGEM PELO TRATO DIGESTÓRIO DE OVINOS.....	77
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	78
4.1 INTRODUÇÃO.....	79
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	80
4.2.1 Unidades Experimentais.....	80
4.2.2 Delineamento Experimental.....	81
4.2.2.1 Quantidade administrada aos grupos tratados com fungo e quantidade administrada ao grupo tratado com milho.....	81
4.2.2.2 Método de colheita de fezes.....	81
4.2.2.3 Administração fúngica e colheita de fezes.....	82
4.2.2.4 Análise comparativa entre temperaturas.....	83
4.2.3 Análise Estatística.....	84
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.4 CONCLUSÕES.....	91

REFERÊNCIAS.....	92
5 CINÉTICA DE CAPTURA E INFECÇÃO DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES TRICHOSTRONGILÍDEOS PELO FUNGO <i>Duddingtonia flagrans</i>.....	95
RESUMO.....	95
ABSTRACT.....	96
5.1 INTRODUÇÃO.....	97
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	98
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
5.4 CONCLUSÕES.....	101
REFERENCIAS.....	102
6 EFICÁCIA DO ISOLADO <i>Duddingtonia flagrans</i> SOBRE LARVAS DE HELMINTOS DE OVINOS NO MEIO AMBIENTE.....	103
RESUMO.....	103
ABSTRACT.....	104
6.1 INTRODUÇÃO.....	105
6.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	106
6.2.1 Local de execução.....	106
6.2.2 Dose fúngica administrada aos animais	106
6.2.3 Metodologia de contaminação da pastagem.....	107
6.2.4 Análise Estatística.....	109
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	109
6.4 CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS.....	116
CONCLUSÕES GERAIS.....	119

1 INTRODUÇÃO GERAL

O conhecimento do grau de virulência dos parasitos, assim como sua prevalência e seu ciclo evolutivo em um rebanho, são requerimentos importantes para estabelecer o manejo que melhor se adeque à propriedade. O não discernimento dos aspectos epidemiológicos dos parasitos, fez com que o uso de anti-helmínticos com amplo espectro de ação fosse utilizado sem a devida cautela. Frente ao descontrole, o uso constante e errôneo desses medicamentos, estabeleceu uma série de consequências indesejáveis, como ecotoxicidade, resistência dos parasitas frente as diferentes classes de anti-helmínticos, dentre outras (MOLENTO, 2004). Medidas profiláticas baseadas em pesquisas podem diminuir a frequência de tratamentos químicos em uma propriedade e, se ainda associadas a outras formas de controle, reduzir a dependência desses tratamentos (BARGER, 1999).

Devido a essa problemática em relação ao controle parasitário em que se encontra não somente o Brasil, mas o mundo inteiro, faz-se necessária a busca urgente de soluções estratégicas para controlar as nematodioses gastrintestinais de pequenos ruminantes. Para tanto, diversas opções estão sendo estudadas, dentre elas o controle bilológico com o uso de fungos nematófagos. Esses fungos são relatados por pesquisadores como microorganismos capazes de diminuir a população de parasitas, atuando nas formas de vida livre dos mesmos, não sendo patógenos quando administrados aos animais (LARSEN, 1999).

Em países como a Dinamarca, Suécia, França e Argentina, o uso desse tipo de controle tem se tornado uma boa alternativa de pesquisa para amenizar os riscos com perdas e/ou diminuição na produção de animais. No Brasil, pesquisas com fungos nematófagos foram pioneiras com ARAÚJO *et al.* (1992) e CHARLES *et al.* (1993a, 1993b).

Segundo ARAÚJO *et al.* (1998), o controle parasitário com fungos nematófagos parece ser promissor para animais em pastejo que estão em constante infecção. O mecanismo de ação dos fungos difere dos anti-helmínticos em relação aos estádios parasitários. O sítio de ação das drogas ocorre no hospedeiro com capacidade de eliminar grande parte da população adulta de helmintos, enquanto que a ação do controle biológico é em ovos e larvas dos helmintos, sendo portanto, fora de seu organismo (WALLER, 1998).

1.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar a atividade do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* contra nematóides gastrintestinais de ovinos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar testes *in vitro* para obtenção da eficácia da atividade nematófaga do fungo contra larvas de nematóides de pequenos ruminantes;
2. Analisar a eficácia do fungo através de sua viabilidade após passagem pelo trato gastrintestinal dos animais;
3. Avaliar a cinética de captura e infecção de larvas infectantes de trichostrongilídeos pelo fungo *D. flagrans*;
4. Analisar a eficácia do fungo no meio ambiente e fezes contendo larvas de nematóides de pequenos ruminantes da região metropolitana de Curitiba.

2 ASPECTOS GERAIS DAS NEMATODIOSES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

2.1 SITUAÇÃO ATUAL DAS NEMATODIOSES

O Brasil possui 16.239.455 ovinos, sendo a região sul detentora de 4.603.241 cabeças e o estado do Paraná possuidor de um total de 532.091 dessas (11,55%), com maior ênfase para a produção de animais tipo carne (IBGE, 2007).

Embora a demanda por produtos de ovinos venha crescendo, há entraves que dificultam o pleno desenvolvimento, um dos principais, as infecções por endoparasitas. WAGHORN *et al.* (2003), relatam o parasitismo ser um fator limitante nos sistemas de produção de animais criados a campo no mundo e o mesmo ocorre nos estados do Brasil, como Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná (SANTOS *et al.*, 2003). No Brasil, as larvas infectantes das principais espécies de nematóides, estão disponíveis nas pastagens praticamente durante o ano todo, servindo de fonte de infecção contínua para os animais (LIMA, 1989). GIRÃO *et al.* (1992), associam as altas perdas econômicas na ovinocultura ao parasitismo gastrointestinal, enquanto que TORINA *et al.* (2004), estimam essas perdas mundiais anuais em milhões de dólares. Segundo MCLEOD (1995), a estimativa feita na Austrália é que o prejuízo causado por helmintos possa chegar a AUS\$222 milhões/ano para a indústria ovina.

As consequências das helmintoses gastrintestinais estão relacionadas ao número e espécies de larvas a que o animal é exposto assim como a quantidade de parasitos que se estabelecem em seu trato gastrointestinal. Por outro lado, o grau de infecção adquirido pelos animais é dependente de uma série de fatores que muitas vezes se interrelacionam, e estes incluem efeitos diretos e indiretos de condições climáticas que podem determinar a taxa de contaminação da pastagem, comportamento de pastejo dos animais, infecções prévias e estado fisiológico dos mesmos (WALLER, 2005).

Entretanto, assim como o uso de drogas químicas variam de acordo com a localidade (sua eficácia pode ser maior em uma localidade do que em outra e esse fator vai depender da pressão de seleção dos parasitos existentes no rebanho), existem técnicas estratégicas para o controle das verminoses para aumentar a produtividade e diminuir o nível de mortalidade dos animais. Esse fato é decorrente

do desequilíbrio populacional de parasitos, causados por alterações do ambiente ou de manejo errôneo. Portanto, existem variações nos esquemas de tratamentos profiláticos, variando de uma região para outra, de acordo com os sistemas de criação (PADILHA, 1996a), sendo de fundamental importância o conhecimento desses requerimentos para uma implementação do controle parasitário. Os tratamentos periódicos com antiparasitários nos animais são realizados sempre nas mesmas épocas do ano, não respeitando a epidemiologia dos parasitas, e ainda aliados a rápida rotação de compostos químicos, contribuem para o grande problema em que se encontra a atual situação parasitária (MOLENTO, 2000). SOTOMAIOR e SOCCOL (1998), ainda ressaltam que o manejo com a superlotação na criação de ovinos contribua para o alto índice de larvas nas pastagens e seja uma fonte de constante contaminação.

Embora os anti-helmínticos desempenhem um importante papel no controle desses organismos, as limitações são muito grandes: resíduos em sub-produtos animais (PADILHA, 1996b), efeitos tóxicos a organismos não alvos no meio ambiente (STRONG *et al.*, 1996) e resistência parasitária (KAPLAN, 2004; MOLENTO, 2004). Ademais, embora existindo vários métodos de controle, o químico, através do uso de anti-helmínticos, ainda é o mais amplamente utilizado (JACKSON, 2004). Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal (SINDAN, 2006), o mercado internacional de produtos veterinários é de aproximadamente 15 bilhões de dólares, sendo que 27% destes são gastos com compostos antiparasitários e calcula-se que no Brasil, o volume comercializado possa a chegar 600 milhões de dólares, dos quais 29% são destinados à aquisição de parasiticidas.

2.2 CICLO BIOLÓGICO DOS NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS

O ciclo de vida dos nematóides gastrintestinais de ovinos é direto, sem migração corporal e pode ser dividido em fase parasitária e fase de vida livre (Figura 2.1). Os parasitas adultos localizam-se em algum segmento do sistema gastroentérico, onde copulam e liberam ovos nas pastagens contidos nas fezes. Posteriormente, ocorre a eclosão das larvas, com subseqüentes mudas, que são os desenvolvimentos das larvas de primeiro estágio (L₁) até larvas infectantes (L₃),

entre cinco a quatorze dias, infectando então seus hospedeiros de forma passiva por via oral (URQUHART *et al.*, 1998). As larvas de primeiro e segundo estádios (L₁ e L₂), alimentam-se de bactérias e outros materiais orgânicos dentro das fezes. Estes dois estádios não são protegidos e são vulneráveis às condições microclimáticas adversas dentro do bolo fecal (LEVINE, 1963). As L₃ retêm a cutícula da fase L₂. Essa bainha larval é relativamente resistente às condições adversas do microclima no bolo fecal e às condições climáticas locais. As condições de clima que influenciam o nível de L₃ no pasto incluem umidade relativa, pluviosidade e temperatura (KRECEK *et al.*, 1992). Sob circunstâncias ideais, o desenvolvimento do ovo à L₃ pode acontecer dentro de até uma semana. A L₃ não se alimenta e requer um meio de umidade tal, como a chuva ou o orvalho pesado para migrar para fora do bolo fecal (HSU; LEVINE, 1997).

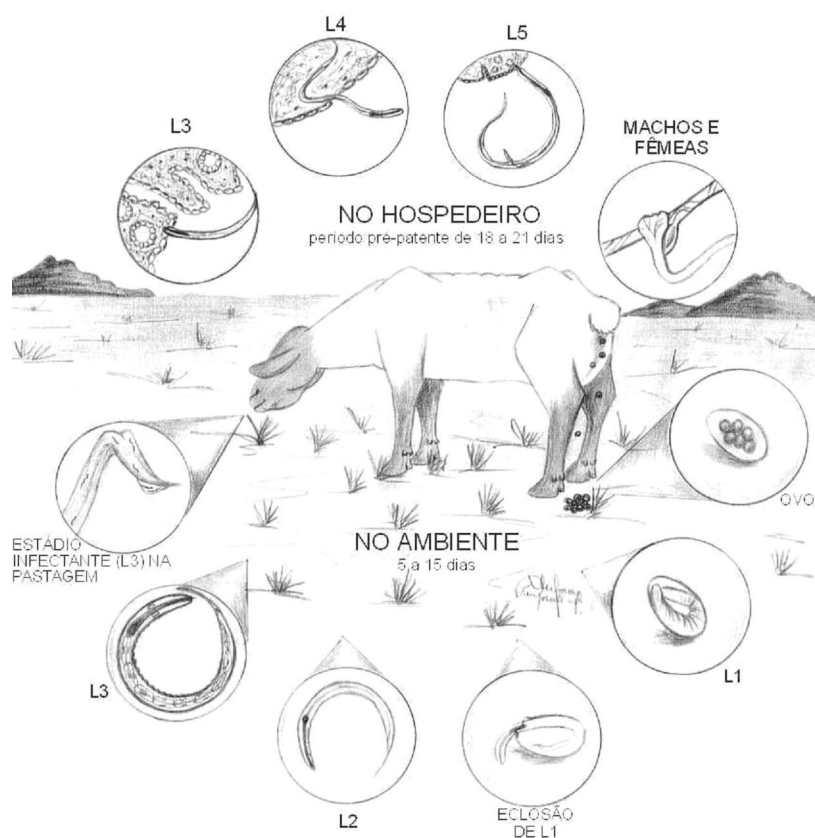


FIGURA 2.1 – DIAGRAMA DO CICLO BIOLÓGICO DOS NEMATÓIDES GASTRINTestinais DE RUMINANTES INDICANDO AS FASES DOS PARASITOS E SUA LOCALIZAÇÃO. FONTE: MORAES, 2002.

As L₃ ao abandonarem a massa fecal, migram horizontal e verticalmente nas pastagens, por meio das quais podem alcançar a parte da vegetação que será ingerida pelo hospedeiro, e assim dar continuidade ao seu ciclo evolutivo (CASTRO *et al.*, 2002), migrando até 40 cm do bolo fecal (SOULSBY, 1965).

A epidemiologia do local é de extrema importância para o ciclo evolutivo completo das larvas. URQUHART *et al.* (1998), ressaltam como os elementos mais importantes para o desenvolvimento larval do ambiente externo: a temperatura (ótima entre 18° a 26° C), e a umidade (ideal a 100%), salientando que em tempos secos, o microclima das fezes ou da superfície do solo pode ter umidade suficiente para permitir o desenvolvimento das larvas. Segundo AMARANTE e BARBOSA (1995), em períodos quentes e com alta pluviosidade comuns na primavera e verão, a contagem de larvas no pasto tende a diminuir, com o carreamento das mesmas da pastagem para o solo. Nesse período, há um crescimento das pastagens, que dispersa mais facilmente as larvas, uma vez que é aumentada a matéria seca por área. MOTA *et al.* (2003), preconizam não somente o conhecimento sobre as exigências climáticas para a eclosão das larvas, como também a disponibilidade e a viabilidade das mesmas no ambiente, a detecção de fontes de infecção e o sistema de produção, para que possa ser estabelecido um conhecimento epidemiológico e um controle efetivo dos parasitas.

O tempo gasto para o desenvolvimento desde a infecção no animal até os parasitos adultos maduros produzirem ovos, é denominado período pré-patente, sendo sua duração dependente de cada espécie de nematóide. O período é de duas a três semanas tanto para *Haemonchus* sp. como para *Trichostrongylus* sp. (TAYLOR *et al.*, 2007), sendo esses, os nematóides mais prevalentes em todas as regiões do Brasil, juntamente com *Strongyloides* spp., *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum columbianum* (AMARANTE *et al.*, 1997; RAMOS, *et al.*, 2004).

2.2.1 Nematóides de maior importância econômica

Os nematóides de maior patogenicidade e que causam maior impacto econômico não somente em ovinos como também em caprinos são: *Haemonchus contortus*, parasita do abomaso e *Trichostrongylus colubriformis*, parasita do intestino delgado. Embora o *H. contortus* seja o parasito de maior importância na

ovinocultura, encontrado em 75% a 100% dos exames de contagem de ovos por grama de fezes (MORTENSEN *et al.*, 2003), AMARANTE (2004) o destaca em primeiro lugar na ordem de prevalência e de patogenicidade em todo o território nacional. Ocupando em segundo lugar, a espécie *T. colubriformis*, muito embora, as infecções serem mistas e comum o parasitismo de *H. contortus* e *T. colubriformis* estar associado a *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp. e *Strongyloides papillosus*.

A ação expoliativa dos parasitos é verificada pelo baixo aproveitamento nutricional, redução da conversão alimentar, reduzido ganho ponderal, déficit na produção de carne, lã e leite (VLASSOF *et al.*, 2001), custos com tratamentos profiláticos e curativos e, em casos extremos, morte dos animais (MACRAE, 1993). Ainda, SYKES e COOP (1976, 1977) e ECHEVARRIA, (1988), ressaltam que a perda de peso em cordeiros pode variar entre 20% e 60%, devido a essa categoria ser uma das mais susceptíveis.

2.2.1.1 Taxonomia e morfologia dos nematóides de maior importância econômica

Taxonomicamente esses nematóides encontram-se no Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida, Subordem Strongylina, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae, Gênero *Haemonchus* e *Trichostrongylus*, Espécie *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* (URQUHART *et al.*, 1998).

A locomoção dos trichostrongilídeos, assim chamados por constituírem a Família Trichostrongylidae, é efetuada por movimentos ondulantes de contração e relaxamento musculares. Morfologicamente são pequenos, de forma cilíndrica. O líquido presente na cavidade do corpo do nematóide é o que mantém a alta pressão responsável pela sua turgidez e sua forma. Têm sistema digestório completo, ou seja, com presença de boca e ânus. As fêmeas possuem ovário, oviduto e útero. Todas as espécies na junção do útero com a vagina, possuem o ovojector, que auxilia a postura dos ovos (URQUHART *et al.*, 1998). Os machos possuem bolsa copulatória bem desenvolvida e dois espículos geralmente iguais, aos quais são usados para diferenciação entre as espécies.

O ciclo de vida é direto e usualmente não fazem migrações para outros órgãos que não de eleição sendo o estágio infectivo L₃ (TAYLOR *et al.*, 2007).

2.2.1.2 *Haemonchus contortus*

A espécie *H. contortus* parasita o abomaso de pequenos ruminantes. As fêmeas apresentam de 18 a 30 mm e os machos de 10 a 20 mm (UENO; GONÇALVES, 1994). Possuem lanceta bucal (Figura 2.2), e em ambos os sexos, há presença de papilas cervicais na região anterior do nematóide. O macho apresenta bolsa copulatória com um lobo dorsal assimétrico e espículos em ganchos (Figura 2.3). Os espículos são órgãos de sensibilidade e de fixação dos dois sexos durante a cópula. Abrem o conduto vaginal feminino para nele penetrar o líquido espermático lançado pelo canal ejaculador (FORTES, 2004). As fêmeas possuem ovários brancos que se enrolam em espiral ao redor do intestino repleto de sangue (LICHTENFELS, *et al.*, 1994), apresentando processo vulvar (LE JAMBRE; WHITLOCK, 1968).

A carga parasitária em um animal com hemoncose é controlada pela relação da quantidade de larvas ingeridas e pela mortalidade dos parasitas adultos, ocorrendo, portanto, um equilíbrio dinâmico entre a taxa de ingestão de larvas e a taxa de mortalidade e reposição, dos parasitas adultos (SMITH, 1988). Esse processo regulatório é válido para o parasito *H. contortus*, pois nem todos os tricostrongilídeos têm a população parasitária regulada por esse processo (BARGER *et al.*, 1985).

A virulência de *H. contortus* está relacionada à hematofagia. A lanceta bucal é responsável não somente por sugar o sangue, como também por lançar uma substância anticoagulante capaz de impedir a formação da rede de fibrina no local que estava sendo sugado. Cada verme pode remover cerca de 0,05 ml de sangue ao dia por ingestão e por perda pelas lesões da região do abomaso do hospedeiro. Exemplificando, um ovino com 5.000 *H. contortus* pode perder cerca de 250 ml ao dia. Em casos hiperagudos, pode ocorrer morte súbita por gastrite hemorrágica (TAYLOR *et al.*, 2007). Têm-se observado, em decorrência deste parasitismo, alterações na concentração de proteínas séricas (ABBOTT *et al.*, 1988; RAHMAM, 1991); como volume globular total (VG), volume corpuscular médio (VCM) e

concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), (ALTAIF *et al.*, 1980; RAHMAM; COLLINS, 1991; WALLACE *et al.*, 1996; WANYANGU *et al.*, 1997; HOSTE; CHARTIER, 1998). Devido a essas alterações nos constituintes plasmáticos, destaca-se a diminuição da concentração de proteína sérica total e, por consequência, hipoalbuminemia com desenvolvimento de edema particularmente na face (edema sub-mandibular), (HOLMES, 1985).



FIGURA 2.2 - LANCETA BUCAL (PARTE ANTERIOR) DE *Haemonchus contortus*
FONTE: URQUHART *et al.*, 1998.



FIGURA 2.3 – BOLSA COPULATÓRIA (PARTE POSTERIOR) DE *Haemonchus contortus*
FONTE: URQUHART *et al.*, 1998.

2.2.1.3 *Trichostrongylus colubriformis*

T. colubriformis parasita o intestino delgado. As fêmeas medem de 5 a 12 mm e os machos, 4 a 8 mm (UENO; GONÇALVES, 1994).

O parasito faz atrofia nas vilosidades do intestino delgado, causa redução na absorção de nutrientes e, por consequência, diarreia e debilidade. A anemia não é primária como na hemoncose, e sim, caso houver, secundária a má absorção nutricional. Na infecção por *Trichostrongylus* sp., o animal diminui gradativamente a produção de carne, leite, lã, entra em reprodução tardiamente, dentre outros sinais

clínicos, embora as taxas de mortalidade e morbidade não sejam tão elevadas como na hemonose (CHARLES, 1992).

2.2.1.4 Distribuição das nematodioses gastrintestinais em ovinos

A distribuição dos parasitos durante todo o ano é dependente dos aspectos ambientais. Segundo um estudo realizado no planalto Catarinense, RAMOS *et al.* (2004), verificaram que a espécie *H. contortus*, predomina no final da primavera até o início do inverno, com maiores intensidades no verão, influenciada principalmente pelas temperaturas médias acima de 15°C e precipitação pluviométrica com mais de 50mm³, enquanto que as espécies *T. axei* e *T. colubriformis* predominam no outono até o final do inverno, devido à maior adaptação às baixas temperaturas e pela menor concorrência com *H. contortus*. Portanto, o conhecimento da época do ano em que as larvas ocorrem em maior ou menor número nas pastagens, constitui um dado essencial para o entendimento da dinâmica populacional dos parasitas em uma dada região assim como no estabelecimento de medidas de controle estratégico, já que o fato mais importante que influencia a carga parasitária dos animais, é o número de larvas infectantes ingeridas da pastagem diariamente (BARGER, 1999).

Também deve ser levado em consideração que, independentemente da estacionalidade dos parasitas, esses não se distribuem de maneira uniforme em um rebanho, mesmo que seus hospedeiros sejam de mesma raça e idade. O número de parasitas geralmente apresenta uma distribuição binomial negativa, ou seja, a maioria dos hospedeiros alberga poucos parasitas, enquanto que poucos animais albergam a maior proporção da população total dos mesmos (AMARANTE *et al.*, 1998; STEAR *et al.*, 1998). ROCHA *et al.* (2007), em uma pesquisa, ressaltaram a importância da identificação de animais susceptíveis em um rebanho, pois esses são responsáveis por grande parte da contaminação de uma pastagem e, uma vez identificados, devem ser removidos do rebanho.

Entretanto, animais parasitados nem sempre significam animais doentes. A grande maioria encontra-se em boas condições de saúde e isto ocorre pelo fato dos hospedeiros terem mecanismos imunológicos que permitam manter a população de endoparasitos sob controle (AMARANTE, 2005), sendo denominados animais

resilientes. Segundo CASTELLS (2002), resiliência é a habilidade do animal de manter níveis produtivos aceitáveis apesar da infecção parasitária. Os animais resilientes têm a capacidade de manter a sua produção de forma independente do grau de infecção parasitária.

A aquisição de imunidade contra nematóides é controlada geneticamente, variando entre diferentes raças, assim como em animais da mesma raça (STEAR; MURRAY, 1994). ROCHA *et al.* (2004) avaliaram ovelhas Ile de France e Santa Inês, ambas no período periparto e lactação, em resposta às infecções naturais por nematóides gastrintestinais. As ovelhas Santa Inês apresentaram melhores valores de volume globular, nível de proteína, requerendo portanto, menores doses de anti-helmíntico. Portanto, o controle biológico propõe estabelecer uma situação em que os animais em regime de pasto sejam expostos a um baixo nível de larvas infectantes e que não causem danos, mas assegurem o desenvolvimento da imunidade natural adquirida (THAMSBORG *et al.*, 1999).

A taxa de infecção ainda depende da densidade animal, estado nutricional dos animais, assim como a categoria em que se encontram (PADILHA; MENDOZA-DE-GIVES, 1996).

2.2.1.5 Métodos de controle das nematodioses gastrintestinais e a resistência anti-helmíntica (RA)

São utilizadas diversas formas para controlar as endoparasitoses de ruminantes, embora o uso de anti-helmínticos seja o mais amplamente utilizado (JACKSON, 2004). Entretanto, a tecnologia química tem trazido sérias consequências e um fato preocupante mundial, que é a resistência anti-helmíntica (RA) (KAPLAN, 2004). A RA foi registrada pela primeira vez em 1964, nos Estados Unidos, por DRUDGE *et al.* (1964), quando avaliaram a eficácia de diversos anti-helmínticos em ovinos. Observaram que uma cepa de *H. contortus* foi resistente ao tratamento com tiabendazole na dosagem de 44mg/Kg, enquanto outras espécies de parasitas gastrintestinais foram eliminadas com o mesmo tratamento. No Brasil, o primeiro relato ocorreu em ovinos, no estado do Rio Grande do Sul (DOS SANTOS; GONÇALVES, 1967), embora MELO *et al.* (1998) e BEVILAQUA e MELO (1999), demonstraram que esse problema está disseminado por todas as regiões.

Segundo CONDER e CAMPBELL (1995), a resistência ocorre quando um princípio ativo não consegue manter a mesma eficácia contra os parasitos, sendo este utilizado nas mesmas condições, depois de determinado período. O desenvolvimento da resistência às drogas é devido a seleção de alelos de um ou mais genes (PRICHARD, 1990b; BLACKHALL *et al.*, 1998). Sob o aspecto farmacológico, a resistência é caracterizada por uma redução no potencial da droga que, normalmente é efetiva contra uma população de parasitos (SANGSTER, 1996), tendo portanto, a capacidade em sobreviver aos tratamentos nas doses terapêuticas recomendadas, devido a hereditariedade (TAYLOR; HUNT, 1989). A RA ocorre geralmente em áreas com verões chuvosos, onde o nematóide *H. contortus* é endêmico (WALLER *et al.*, 1995). Na África do Sul, a RA devido a esse helminto, está impossibilitando a criação comercial de ovinos (VAN WYK *et al.*, 1999).

Segundo PRICHARD (1990a), os três grandes grupos de produtos utilizados são: levamisole e seus análogos (morantel e pirantel), lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) e os benzimidazoles (tiabendazole), sendo os últimos e o grupo das avermectinas, os mais freqüentemente utilizados na última década (SUAREZ, 2002). Entretanto, MOLENTO (2004) e THOMAZ-SOCCOL *et al.* (1996), relataram ineficiência em diversos princípios ativos, incluindo um dos grupos químicos mais modernos, que são os representantes da família das lactonas macrocíclicas. RAMALHO *et al.* (2008), em uma pesquisa com rebanho ovino no noroeste do Paraná, verificaram que o parasita *H. contortus* apresentou 90,84% de resistência frente aos testes de eficácia ao levamisole e 100% ao closantel e a moxidectina, demonstrando a grande pressão de seleção que os parasitos foram impostos aos tratamentos demasiadamente constantes com antiparasitários.

VAN WYK *et al.* (1997a) e SANGSTER (1999), dentre outros, já relataram a resistência anti-helmíntica múltipla (RAM) no mundo inteiro. ECHEVARRIA *et al.* (1996) e MOLENTO *et al.* (2004), atribuíram o estado da resistência dos parasitos a diversos fatores como: tratamentos supressivos, uso contínuo da mesma base química do composto por longos períodos (mais de um ano), doses superiores às recomendadas pelo fabricante, descaso à categoria em que se encontra o animal ocasionando dosagens incorretas, dentre outros.

Os métodos de manejo são os principais responsáveis para a ocorrência da resistência anti-helmíntica. A criação conjunta de caprinos e ovinos é um dos principais fatores da emergência de cepas de nematóides gastrintestinais resistentes

(PRICHARD, 1990a), aumentando a taxa de lotação de pastagens e, conseqüentemente, sua contaminação por helmintos. Segundo COLES *et al.* (1994), populações resistentes, selecionadas e desenvolvidas em caprinos, podem ser transferidas para ovinos e vice-versa. MOLENTO (2000), relata que 65% dos produtores utilizam antiparasitários de forma profilática e 32% dos mesmos, esperam a ocorrência de sinais clínicos dos animais para realização do tratamento. A frequência entre tratamentos apresenta bastante amplitude, podendo os produtores utilizar essas drogas entre quatro até vinte e quatro vezes ao ano. MORAES (2002), constatou essa utilização de medicamentos administrado aos animais com caráter supressivo, a cada 15 dias. MOLENTO (2000), ressalta que essas atitudes, favorecem a seleção de parasitas, além da realização de rotação rápida de bases químicas durante o mesmo período. CUNHA FILHO (1999), ainda enfatiza que o principal fator da resistência é a eliminação dos nematóides sensíveis da população (*refugia*).

A expressão *refugia* consiste na população de larvas que não tiveram contato com nenhum tipo de antiparasitário. Segundo VAN WYK (2001), a população em *refugia* é de fundamental importância para retardar o aparecimento da resistência.

Devido às adversidades expostas para controlar as infecções pelas nematodioses gastrintestinais de ovinos, formas de controle têm sido amplamente pesquisadas contra essa enfermidade.

2.3 CONTROLE BIOLÓGICO E OUTRAS FORMAS DE CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

Devido aos inúmeros problemas listados anteriormente que o uso de drogas tem causado, outras formas de controle não-químicas têm sido pesquisadas com o objetivo de contribuir para a contenção parasitária, sendo menos prejudiciais aos animais e ao meio ambiente.

Portanto, propostas para controlar as infecções por nematóides estão sendo intensificadamente estudadas, como: 1) vacinas (KNOX; SMITH, 2001), 2) seleção genética dos hospedeiros (GASBARRE; MILLER, 1999), 3) técnicas de tratamento seletivo como Famacha (MOLENTO, 2004), 4) plantas detentoras de taninos

(ATHANASIADOU *et al.*, 2001), 5) utilização de controladores biológicos (GILL; LE JAMBRE, 1996).

1) As vacinas devem incorporar componentes que gerem resposta imune natural consistindo no reconhecimento de antígenos, na indução da resposta e na ativação dos mecanismos de defesa contra o parasita (MEEUSEN; PIEDRAFITA, 2003).

2) A seleção genética tem sido aplicada principalmente na ovinocultura (BAKER *et al.*, 2003). MORRIS *et al.* (2004), selecionaram cordeiros resilientes com base em ganho de peso e frequência de tratamentos anti-helmínticos requerida quando expostos à pastagem contaminada, o que resultou em incremento de resiliência ao rebanho.

3) O método Famacha tem por objetivo diminuir os tratamentos antiparasitários por meio da inspeção da coloração da conjuntiva dos animais. Consiste num guia manual com graus de 1 a 5, aos quais estão relacionados os graus de hematócrito e quanto maior o grau famacha, maior a urgência de tratamento. É uma estratégia de controle na ovinocaprinocultura e tem ação apenas no parasita *H. contortus* (VAN WYK *et al.*, 1997b).

4) Embora o uso de plantas seja usado no combate das nematodioses de ruminantes, esta alternativa é baseada sem comprovação científica de seus benefícios, havendo, entretanto, a possibilidade de intoxicação aguda ou crônica (CABARET *et al.*, 2002). Entre as plantas ricas em metabólitos secundários denominados taninos, a mais pesquisada é a *Fabacea* (HOSTE *et al.*, 2006). Os taninos podem exercer ação anti-helmíntica direta, ao interferir no ciclo natural dos nematóides, ou indireta, ao proteger a proteína ingerida da degradação ruminal, o que dificulta a determinação do seu real efeito antiparasitário (KETZIS *et al.*, 2006). Esses autores ainda ressaltam possíveis efeitos negativos que podem causar na performance dos animais, provocados por fatores antinutricionais do fitoterápico.

5) Os controladores biológicos são microorganismos que agem nas formas de vida livre dos parasitas presentes no ambiente (GILL; LE JAMBRE, 1996) e visam complementar os métodos tradicionais utilizados, assumindo que toda e qualquer população é regulada por antagonistas de forma espontânea na natureza, na ausência desses, uma população poderia aumentar indiscriminadamente. Sendo assim, o termo controle biológico define-se como um método ecológico que visa diminuir a população parasitária ou conservá-la em níveis não prejudiciais, com a

utilização de antagonistas naturais vivos disponíveis no ambiente (GRØNVOLD *et al.*, 1996a). As formas mais utilizadas como controle biológico são bactérias (STIRLING, 1985), artrópodes (LEHMAN; REID, 1993) e fungos nematófagos (BARRON, 1977).

Segundo LARSEN (1999), o melhor local para a atividade dos fungos nematófagos para atuação como controladores biológicos é o bolo fecal, onde a grande maioria dos nematóides de importância para os animais de rebanho passa desde os estádios de ovo até a forma infectante, antes de migrar para a pastagem. A habilidade dos esporos do fungo em germinarem e capturarem as larvas antes que elas migrem para fora do bolo fecal é vital para o controle biológico (FAEDO *et al.*, 1997).

A utilização do controle biológico com fungos nematófagos baseia-se na redução de larvas infectantes na pastagem. Portanto, técnicas que objetivam diminuir a contaminação da pastagem, significam um grande avanço no controle das helmintoses, reduzindo o uso de anti-helmínticos (CASTRO *et al.*, 2002). PADILHA e MENDOZA-DE-GIVES (1996), corroboram com a afirmação de que a redução do número de larvas infectantes seja um dos principais objetivos no controle das verminoses. Essa redução pode se dar por meio da higienização das pastagens com a ingestão passiva de larvas, pois a forragem é o maior veículo de transmissão das nematodioses aos animais (CASTRO *et al.*, 2002).

BORBA (1995), obteve redução na contaminação da pastagem, quando alternou o pastejo entre bovinos e ovinos no estado do Rio Grande do Sul, devido a especificidade parasitária dos nematóides enquanto AMARANTE (2004), verificou que pastagens com baixa contaminação por larvas infectantes beneficiam principalmente as categorias mais susceptíveis, como animais jovens e fêmeas no periparto.

JACKSON e MILLER (2006), acreditam que a utilização de formas de controle biológico com o uso de fungos nematófagos agindo contra as nematodioses gastrintestinais, pode representar uma promissora alternativa, pois diminuiria os efeitos deletérios nos animais, no meio ambiente e no homem, causado pelo uso exclusivo de anti-helmínticos. WALLER (1998), considera que estes microorganismos sejam uma importante alternativa a ser empregada em formulações biológicas para o controle de infecções parasitárias em ruminantes, podendo ser incluídos como forma auxiliar em programas de manejo sanitário.

2.4 FUNGOS NEMATÓFAGOS

Os fungos nematófagos estão classificados na divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae. Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, reproduzem-se agamicamente por esporos formados sobre ramificações do micélio (DRESCHSLER, 1937). Entretanto, GRIFFIN (1994), observou estádios de reprodução sexuada em algumas espécies destes fungos, e por esse motivo, algumas espécies pertencem ao filo Ascomycota.

Muitos fungos predadores de nematóides foram isolados e identificados durante o final do século dezenove (ZOPF, 1888), embora os estudos iniciais com fungos nematófagos como controladores biológicos de nematóides gastrintestinais tenham sido realizados na França, entre 1939 e 1942 (SOPRUNOV, 1966). Os franceses R. CAPELLE, J. DESCAZEUX, R. DESCHIENS, e E. ROUBAUD, demonstraram haver atividade de *Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium bembicodes*, *Monacrosporium ellipsosporum* sobre larvas de nematóides parasitas de bovinos, ovinos, equinos, jumentos, macacos dentre outros animais (SOPRUNOV, 1966). Além disto, desenvolveram métodos de cultivo, armazenagem e secagem de esporos desses fungos (DESCHIENS, 1939); bem como investigaram a possibilidade do conídio passar pelo trato digestório e do fungo não ter efeito patológico para o animal (DESCHIENS, 1941; DESCAZEUX e CAPELLE, 1939).

No Brasil, pesquisas com fungos nematófagos foram pioneiras com ARAÚJO *et al.* (1992), e CHARLES, *et al.* (1993a,b). Foi demonstrado que *Monacrosporium ellipsosporum* e *Arthrobotrys* spp. foram eficazes no controle de larvas de *Haemonchus placei* em condições laboratoriais, e que havia variações na capacidade predatória de diferentes isolados dentro da mesma espécie de *Arthrobotrys* (ARAÚJO *et al.*, 1992, 1993), Além disto, a eficácia de *A. oligospora* para reduzir L₃ de Cyathostomíneos era dependente da dose de esporo contida nas fezes, e que o mesmo isolado, quando comparado a *D. flagrans*, apreendia número maior de L₃ de trichostrongilídeos em menor tempo e com menor número de esporos (CHARLES *et al.*, 1993a, 1993b).

2.4.1 Gêneros de fungos nematófagos

Até 1964, a maioria dos fungos era classificada como pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella* e *Trichothecium*. Posteriormente, vários novos gêneros foram descritos, incluindo *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis* (GRAY, 1987). Atualmente são aceitos os gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactylella*, *Duddingtonia*, *Lactydina*, *Monacrosporium* e *Trichothecium* (RUBNER, 1996). Apesar do grande número de espécies de fungos estarem catalogadas em mais de 150 espécies (BARRON, 1977), a maioria dos estudos têm sido com as espécies *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys oligospora* (LARSEN, 1999, 2006).

2.4.2 Locais de isolamento dos fungos nematófagos

Segundo GRAY (1987), os fungos nematófagos são geofílicos. Vivem na matéria orgânica do solo (BARRON, 1977) e podem ser isolados de fezes de animais. SANTOS *et al.* (1998), obtiveram dois isolados no estado do Ceará de *D. flagrans*, um em fezes bovinas e outro em fezes caprinas. O padrão de colonização dos fungos é influenciado pelas condições climáticas (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999), ambientais e por competidores da fauna e flora coprófila (GOMES, 1998).

2.4.3 Biologia dos fungos nematófagos

Os fungos nematófagos podem apresentar esporos em diferentes tamanhos, colorações, formas e resistência no ambiente. A grande maioria apresenta esporos secos, emergindo de estruturas de frutificação (conidióforos), essenciais na dispersão aérea dos conídios. Crescem verticalmente, em direção perpendicular ao substrato o qual o isolado foi mantido. Algumas espécies como *A. oligospora* e *A. robusta*, produzem conidióforos que apresentam cachos de conídios (Figura 2.4), em toda a estrutura do conidióforo. As estruturas denominadas clamidósporos também podem ser produzidas como esporos de parede espessa e diferenciadas a partir das

hifas que podem aparecer em condições de estresse extremo, podendo dar origem a hifas, conidióforos e conídios (BARRON, 1977).

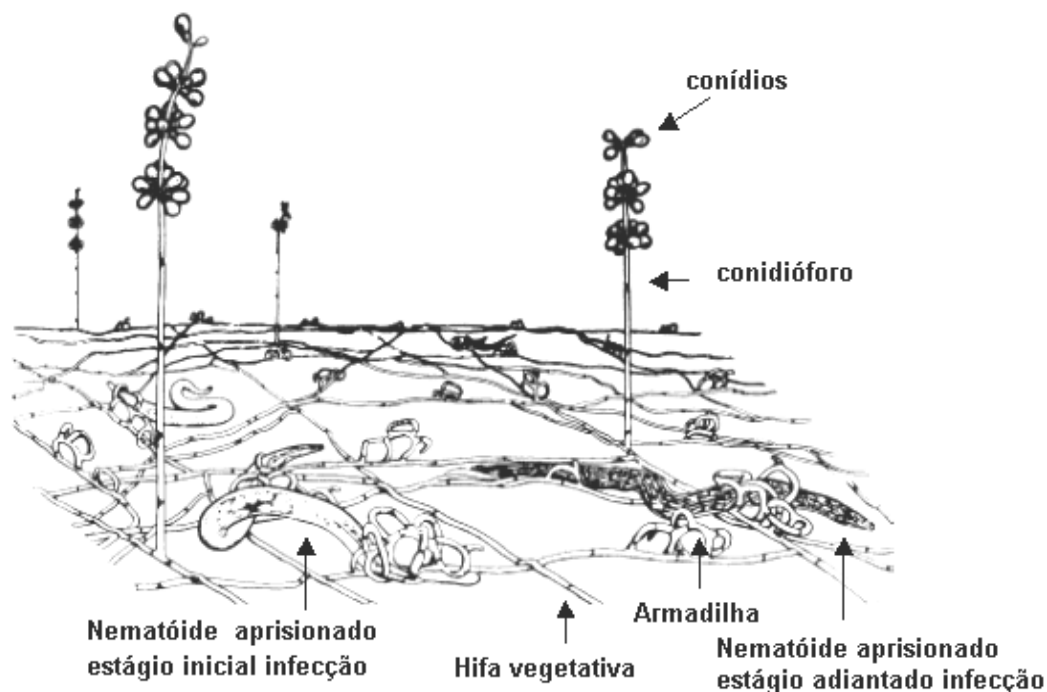


FIGURA 2.4 - FUNGO NEMATÓFAGO *Arthrobotrys oligospora* COM SUAS ESTRUTURAS PREDATÓRIAS.
 FONTE: ADAPTADO DE BARRON, 1977.

2.4.4 Grupos dos fungos nematófagos

Existem três grupos de fungos nematófagos: predadores, endoparasitas e ovícidas. O grupo dos predadores produz armadilhas, que após apreenderem o nematóide, penetram suas hifas em sua cutícula ocorrendo a digestão de seu conteúdo interno. Já o grupo dos endoparasitas, infecta os nematóides por meio de esporos, que podem aderir à cutícula ou necessitam ser ingeridos. Os ovícidas penetram suas hifas à casca do ovo por meio de poros presentes na camada vitelínica, alterando a permeabilidade da casca e expandindo seu volume, colonizando assim o conteúdo do ovo (MORGAN-JONES; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1988).

Os fungos endoparasitas se desenvolvem internamente nos nematóides após ação germinativa de esporos que os infectam por adesão à parede corporal ou por ingestão. Após o desenvolvimento do fungo dentro do nematóide, na maioria das

espécies somente hifas reprodutivas (tubo de evacuação e conidióforo) saem por meio da parede corporal para o exterior. Os esporos geralmente são pequenos e quando longos, são muito finos e com pouca reserva energética (BARRON, 1977).

Os fungos predadores produzem um extensivo sistema de hifas no meio ambiente e a intervalos, ao longo da hifa, são formadas armadilhas que capturam os nematóides mecanicamente ou por adesão (BARRON, 1977). As armadilhas são divididas em: hifas adesivas não modificadas ou não diferenciadas, ramificações hifais anastomosadas formando redes adesivas tridimensionais, ramificações adesivas que algumas vezes formam redes simples e na maioria das vezes bidimensionais, nódulos adesivos, anéis constritores e anéis não constritores (Figura 2.5).

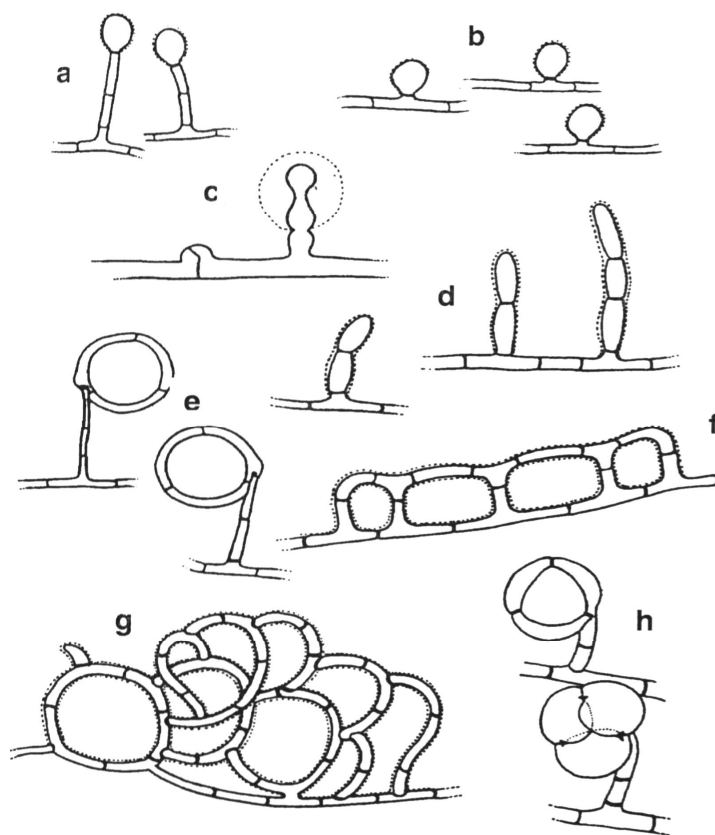


FIGURA 2.5 - ÓRGÃOS DE CAPTURA DE FUNGOS NEMATÓFAGOS PREDADORES:

- A, B, C) BOTÕES ADESIVOS
 - D) HIFAS ADESIVAS;
 - E) ANÉIS NÃO-CONSTRITORES;
 - F) HIFA ADESIVA BIDIMENSIONAL;
 - G) HIFA ADESIVA TRIDIMENSIONAL;
 - H) ANÉIS CONSTRITORES
- FONTE: ADAPTADO DE BARRON, 1977.

Os fungos nematófagos predadores são os organismos antagonistas de nematóides mais pesquisados, pois têm mostrado serem capazes de reduzir efetivamente populações de nematóides em condições de laboratório e a campo, sendo sua utilização pesquisada nos últimos anos e demonstrada como uma alternativa viável no controle de estádios pré-parasitários de diversas espécies de nematóides gastrintestinais de ruminantes (LARSEN, 1999). São também capazes de invadir e consumir nematóides quando já em decomposição, embora o processo ocorra numa velocidade muito menor que a invasão em nematóides vivos (NORDBRING-HERTZ; STÄLHAMMAR-CARLEMALM, 1978).

NANSEN *et al.* (1988), observaram que quanto maior a motilidade dos nematóides no bolo fecal, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas. Além disso, essas armadilhas podem ocorrer em resposta a diversos fatores, tais como, além da presença de nematóides, substâncias por eles liberadas, condições adversas de cultivo e escassez de água e ou nutrientes (JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1980). O fungo predador do gênero *Arthrobotrys* possui capacidade de produzir armadilhas frente a nematóides de vida livre como *Panagrellus redivivus* ou *Turbatrix acetii*, embora sendo classificado por COOKE e GODFREY (1964), como nematófago facultativo.

2.4.5 Estruturas de administração do fungo

A administração do fungo aos animais pode ser realizada não somente através de clamidósporos, mas também por massas miceliais e conídios.

Conídios e micélios de *A. robusta* e *A. conoides* também foram capazes de atravessar o trato gastrintestinal de bovinos. ARAÚJO *et al.* (1996, 1999) comprovaram a recuperação dessas estruturas nas fezes desses animais, diminuindo a população de *Haemonchus placei* quando comparado ao grupo controle. Embora tais estruturas possam ser capazes de atravessar o trato gastrintestinal dos animais, existe uma supremacia dos clamidósporos na manutenção da atividade nematófaga. Portanto, deriva desta qualidade a escolha de *D. flagrans*, como aquele fungo mais promissor para controle biológico dos nematóides gastrintestinais dos animais de produção.

2.4.6 Formas de administração fúngica

Existem diversas formas de fornecimento de material fúngico aos animais, mas ressalta-se que a melhor via para a administração de um isolado é a oral. A incorporação desse material em blocos de suplementos minerais, tem sido estudado e difundido na Austrália. Formulações minerais contendo clamidósporos do fungo *D. flagrans* têm obtido resultados positivos (WALLER; FAEDO, 1996). O maior empecilho dessa formulação está na obtenção de grandes quantidades clamidósporos pelo seu cultivo em grãos de cereais, ficando a produção cara e dificultando o controle de qualidade do produto final (STIRLING *et al.*, 1998).

Dispositivos intra-ruminais com liberação controlada de clamidósporos de *D. flagrans*, por períodos prolongados foram testados por WALLER *et al.* (2001b). Os pesquisadores observaram esporos viáveis nas fezes de ovinos que receberam os dispositivos com este mecanismo.

A formulação também pode ser adquirida adicionando o inóculo fúngico a diferentes cereais como milho, sorgo, cevada, arroz dentre outros (SANTOS, 2000), ou ainda micélio na forma de péletes em base de alginato de sódio (ARAÚJO *et al.*, 1999).

Embora existam várias as formas de administração de fungos nematófagos aos animais, além do custo como nos suplementos minerais, também deve ser levado em conta a vida de prateleira desse método de controle, pois esse fator é um percalço para o avanço das pesquisas. Na formulação de péletes, foi observada a sobrevivência dos fungos à temperatura de 4°C por até 40 meses, e à temperatura ambiente por até 4 meses (STIRLING; MANI, 1995). Enquanto que (C. P. SANTOS, comunicação pessoal), manteve por dois anos isolados de fungos predadores e endoparasitas em frascos contendo solo estéril a uma temperatura de -20°C, sendo que após esse período, somente *D. flagrans* possuía viabilidade.

2.4.7 *Duddingtonia flagrans*

Duddingtonia flagrans foi anteriormente descrito como *Tricothecium flagrans* (DUDDINGTON, 1950) e, posteriormente, *Arthrobotrys flagrans*. DUDDINGTON (1950), observou que suas formas assim como seu desenvolvimento era diferente

do gênero *Arthrobotrys*. Em *Tricothecium flagrans* não haviam presentes aglomerados de conídios formando correntes de anéis que o gênero *Arthrobotrys* continham. Portanto, o gênero passou a ser denominado *Duddingtonia*, e a espécie, ficou determinada como *Duddingtonia flagrans* (COOKE, 1969).

No meio de cultura com meal ágar (CMA), as colônias do fungo *D. flagrans* possuem coloração de branca a rosada. O micélio é composto por hifas septadas e claras, com pequeno crescimento aéreo. Os conidióforos são septados, eretos, retos e alongados com vários crescimentos subapicais (COOKE, 1969). Os conídios são produzidos na extremidade dos conidióforos com um septo mediano, possuindo morfologia de 25-50 μm de comprimento por 10-15 μm de largura (COOKE; GODFREY, 1964).

Os conídios de *D. flagrans* apresentam um formato entre elíptico e ovóide. Depois do primeiro conídio ser formado (a), um novo ponto de crescimento aparece em seu lado ou levemente abaixo, sendo o segundo conídio ali formado (b), sendo esse processo repetido várias vezes, formando cachos de conídios (c) (Figura 2.6) (COOKE, 1969).

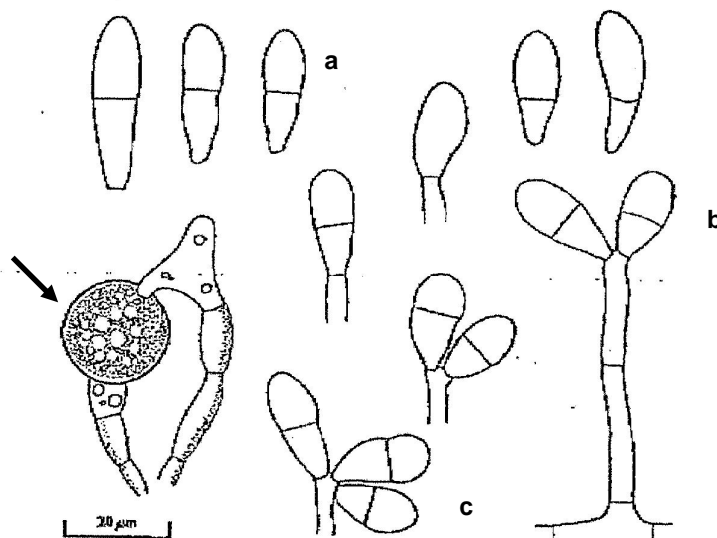


FIGURA 2.6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CONIDIÓFOROS E CONÍDIOS EM VÁRIOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO COM CLAMIDÓSPOROS INTERCALADOS (SETA) DE *Duddingtonia flagrans*.
FONTE: COOKE, 1969.

2.4.8 Atividade nematocida dos fungos nematófagos predadores

WALLER *et al.* (2001a) afirmam que a habilidade do fungo em atravessar o trato gastrintestinal do animal, é pré-requisito indispensável para o uso estratégico desses organismos como controladores biológicos nas nematodioses gastrintestinais de ovinos.

LARSEN (1999) salienta que a sobrevivência a resistir a passagem pelo trato gastrintestinal seleccione a espécie de fungo a ser utilizada. Após passagem, sem alterações, o fungo desenvolver-se-á nas fezes, juntamente com as larvas de todos os estádios, podendo então atingí-las. Isso significa que clamidósporos ou conídios ao passarem pelo trato digestório, produzem estruturas em formas de anéis constritores e não constritores, hifas e redes adesivas tridimensionais que capturam e destróem as fases pré-parasitárias de várias espécies de nematóides (LARSEN, 2000).

A penetração do fungo no nematóide, ocorre primeiramente pela aderência do fungo por uma substância fibrilar adesiva, rica em fosfatase ácida, que degrada a cutícula do nematóide (JANSSON; NORDBRING-HERTZ, 1988). O aprisionamento do nematóide nestas redes é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematóide com digestão de seu conteúdo interno e degradação mecânica (MOTA *et al.*, 2003; VEENHUIS *et al.*, 1985). Após a hifa colonizar o corpo do nematóide, ela emerge contra a superfície da cutícula do nematóide, produzindo o micélio e posteriormente os esporos (BARRON, 1977).

2.4.9 Vantagens do uso de fungos nematófagos

D. flagrans apresenta alta capacidade de produzir clamidósporos além de possuir parede mais espessa e resistente comparados com outras espécies de fungos predadores de nematóides tendo, portanto, atraído muito a atenção e sido foco de grande número de pesquisas para o controle dos nematóides de diversos animais (WOLSTRUP *et al.*, 1994; LARSEN *et al.*, 1995; NANSEN *et al.*, 1996; BAUDENA, *et al.*, 2000; FAEDO *et al.*, 2002; FONTENOT, *et al.*, 2003; CHANDRAWATHANI, *et al.*, 2004), tendo se mostrado superior à sobrevivência à

passagem pelo trato gastrointestinal de ruminantes adversa à sobrevivência do fungo, por este conferir estruturas de resistência (clamidósporos).

WALLER (1998) considera que os fungos sejam uma importante alternativa a ser empregada em formulações biológicas para o controle de infecções parasitárias, podendo ser incluídos como forma auxiliar em programas de manejo sanitário. LARSEN (1999), ainda descreve os fungos nematófagos como possuidores de características desejáveis, como alta atividade reprodutiva, ciclo de vida curto, produção de esporos para aumentar sua resistência dentro e fora dos animais, manutenção em fase saprofítica na ausência do hospedeiro e, principalmente, por não serem patógenos para os animais. Entretanto, é imprescindível que não haja efeitos nocivos com a utilização massal e com a comercialização destes fungos (FAEDO *et al.*, 1998). Pesquisas realizadas com concentrações para controle biológico, não causaram nenhum impacto ambiental significativo (LARSEN, 2002). Ademais, FAEDO *et al.* (2002) e WALLER *et al.* (2004) demonstraram que não há efeito negativo no ambiente ou invertebrados não-patogênicos ao redor das fezes de animais que receberam *D. flagrans* na dieta.

2.4.10 Fatores determinantes para o emprego de fungos nematófagos

Segundo GRØNVOLD *et al.* (1996a,b) e GOMES, (1998), os fatores determinantes para um agente ser empregado comercialmente incluem:

- a) capacidade de suportar o trânsito gastrointestinal dos animais;
- b) colonizar o bolo fecal e agir de sobre as larvas infectantes;
- c) ser produzido em larga escala;
- d) possuir capacidade de sobreviver ao período de armazenamento;
- e) possuir especificidade de ação;
- f) possuir alta capacidade reprodutiva;
- g) suportar as condições ambientais;
- h) oferecer segurança para produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente;
- i) ser efetivo no controle do organismo alvo.

O controle biológico com fungos nematófagos, embora não seja de caráter inédito, pesquisas com esse agente vêm sendo realizadas a fim de novos métodos

de controle serem implementados. Diferentes formas de controle são interessantes serem pesquisadas e exploradas, a fim de se aliar aos produtos tradicionais de mercado, para que a ovinocultura não venha sucumbir em futuro próximo.

2.4.11 Produção do fungo

D. flagrans, isolado por SANTOS *et al.* (1998), no estado do Ceará está depositado no Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia, Cenargen/Embrapa, sob número: CG 768. O produto fúngico é produzido em escala para pesquisas no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense. A metodologia consiste no cultivo do fungo em garrafas de Roux contendo milho triturado como meio para crescimento, a uma temperatura entre 23 e 27°C na ausência de luz por 21 dias. Posteriormente, o material é retirado das garrafas sendo acondicionado em camadas finas (3-4 cm) em caixas plásticas para secagem em estufa a 25°C. Após secagem, o cultivo de milho e fungo é homogeneizado e retirado amostragens de 10 gramas. Para cada amostra, é realizada uma masseração do produto em grau e pistilo, adicionando 100 mL de água destilada. A suspensão é filtrada em uma peneira com malha de 100 micras de abertura. A amostra é homogeneizada e retirada uma alíquota para contagem na câmara de Neubauer. Esta contagem é realizada apenas nos quadrantes maiores da câmara. Da contagem, obtém-se o número de clamidósporos por mL, onde posteriormente faz-se a correlação entre o volume utilizado e o peso, para obtenção da quantidade de clamidósporos por grama (SANTOS, C. P. comunicação pessoal).

Para a realização de cada pesquisa, é quantificado o número de clamidósporos por grama de milho. Para a realização desse trabalho, a quantificação final foi de 1.925.000 clamidósporos por grama de milho. A imagem da Câmara de Neubauer contendo os clamidósporos (Figura 2.7), foi obtida com uso do microscópio Zeiss Axiophoto acoplado a uma câmera fotográfica digital Canon de resolução de 10.2 Megapixels e processadas pelo programa Axiovision.

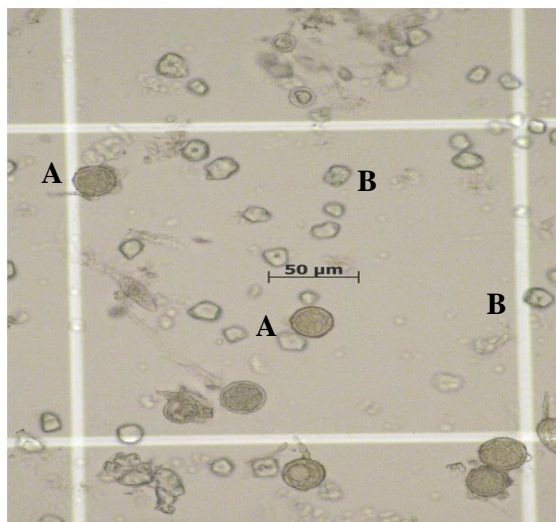


FIGURA 2.7 – CONTAGEM DE CLAMIDÓSPOROS PELA CÂMARA DE NEUBAUER.
A: CLAMIDÓSPOROS
B: RESÍDUOS DE SUBSTRATO DE CRESCIMENTO
FONTE: SANTOS, C. P. (2008).

REFERÊNCIAS

ABBOTT, E. M.; PARKINS, J. J.; HOLMES, P. H. Influence of dietary protein on the pathophysiology of haemonchosis in lambs given continuous infection. **Research Veterinary Science**, London, v. 45, n. 1, p. 41-49, 1988.

ALTAIF, K. I.; AL-ABBASSY, S. N.; ABOUD, H. B. The response of Awassi sheep to reinfection with *Haemonchus contortus* larvae. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 80, p. 223-240, 1980.

AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A. Seasonal variations in populations of infective larvae on pasture and nematode faecal egg output in sheep. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 7, p.127-133, 1995.

AMARANTE, A. F. T.; BAGNOLA JUNIOR, J.; AMARANTE, M. R. V.; BARBOSA, M. A. Host specificity of sheep and cattle nematodes in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 73, p. 89-104, 1997.

AMARANTE, A. F. T.; GODOY, W. A. C.; BARBOSA, M. A. Nematode egg counts, packed cell volume and body weight as parameters to identify sheep resistant and susceptible to infections by gastrointestinal nematodes. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 14, p. 331-339, 1998.

AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose gastrointestinal no sistema de produção de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA, 1, Paraná. **Anais...** 2004.

AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose ovina. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, Brasília, n. 34, p.19-30, 2005.

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

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

ARAÚJO, J. V.; NETO, A. P.; AZEVEDO, M. H. F. Screening parasitic nematode trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, p. 543-552, 1996.

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

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

ATHANASIADOU, S.; KYIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, p. 199-204, 2001.

BAKER, R. L.; NAGDA, S.; RODRIGUEZ-ZAS, S. L.; SOUTHEY, B. R. Resistance and resilience to gastrointestinal nematode parasites and relationships with productivity of Red Maasai, Dorper and Red Maasai X Dorper crossbred lambs in the sub-humid tropics. **Animal Science**, Sofia, v. 76, p. 119-136, 2003.

BARGER, I. A.; LE JAMBRE, L. F.; GEORGI, J. R.; DAVIES, J. Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection. **International Journal for Parasitology**, Oxon, v. 15, p. 529-533, 1985.

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

BARRON, G. L. **The nematode-destroying fungi**. Ontario: Canadian Biological Publications, p. 140, 1977.

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**, Amsterdam, v. 89, p. 219-230, 2000.

BEVILAQUA, C. M. L.; MELO, A. C. F. L. Eficácia de anti-helmínticos a base de oxfendazol e ivermectin em ovinos no Estado do Ceará. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 1999. p. 156.

BLACKHALL, W. J.; POULIOT, J. F.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin and moxidectin- selected strains. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 190, p. 42-48, 1998.

BORBA, M. F. S. Utilização racional do pastoreio no controle das parasitoses gastrintestinais no pós-parto de ovelhas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 1995, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 1995. v. 9, p. 349.

CABARET, J.; BOUILHOL, M.; MAGE, C. Managing helminths of ruminants in organic farming. **Veterinary Research**, Paris, v. 33, p. 625-640, 2002.

CASTELLS, D. Métodos alternativos para el control de endoparasitoses: "Uso de huéspedes resistentes". Em: "Reunion de especialistas em Parasitologia Veterinária de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay". Facultad de Ciencias Veterinaria Tandil, 22-24 de mayo, Argentina, 2002.

CASTRO, A. A.; ALMEIDA, L. R.; GUEDES JÚNIOR, D. S.; FARIA, M. F. R.; FONSECA, A. H. Migração vertical de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes em pastagens, durante a estação chuvosa, no município de Seropédica, RJ, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002. 1 CD-ROM.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; ADNAN, M.; WALLER, P. J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. T. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 120, p.177-187, 2004.

CHARLES, T. P. Vermínoses dos bovinos de leite. In: CHARLES, T. P.; FURLONG, J. (Ed.). **Doenças parasitárias dos bovinos de leite**. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1992. p. 55-110.

CHARLES, T. P.; SANTOS, C. de P.; ALVIM, G. P. Atividade Predatória de duas Espécies de Fungos Nematófagos nos Estágios de Vida Livre de Nematódeos

Trichostrongilídeos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, Suplemento 1, p. 46, 1993a.

CHARLES, T. P.; RODRIGUES, M. de A.; SANTOS, C. de P. Redução do número de larvas de *Cyathostominae* em fezes de eqüinos tratadas com conídios de *Arthrobotrys oligospora*. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA LÍNGUA PORTUGUESA, 6, 1993, Salvador. **Anais...** Salvador, 1993b, p. 333-334.

COLES, G. C.; BORGSTEEDE, F. H. M.; GEERTS, S. Recommendations for the control of anthelmintic resistant nematodes of fann animals in the EU. **The Veterinary Record**, London, v. 26, p. 205-206, 1994.

CONDER, G. A.; CAMPBELL, W. C. Chemoterapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. **Advances in Parasitology**, San Diego, v. 35, p.1-83, 1995.

COOKE, R. C. Two Nematode-Trapping *Hyphomycetes*, *Duddingtonia flagrans* gen. et comb. Nov. and *Monacrosporium mutabilis* sp. nov. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 53, p. 315-319, 1969.

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

CUNHA FILHO, L. F. C. Quimioresistência aos anti-helmínticos em ovinos. UNOPAR Científica, **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 1, p. 91-102, 1999.

DESCAZEUX, J.; CAPELLE, R. Contribution à l'étude des champignons prédateurs des larves des nématodes parasites des animaux domestiques. **Bull. Acad. Vet. France**, v. 12, p. 284-288, 1939.

DESCHIENS, R. Capture et destruction de larves de *Strongyloides* du singe et du boeuf para des Hyphomycetes. **Bulletin Society Pathology Exotic**, v. 32, p. 394-398, 1939.

DESCHIENS, R. Innocuité des hyphomycètes prédateurs des nemtaodes pour la végétation des pâturages et pour lê bétail. **C. R. Society Biology Paris**, v. 135, p. 830-832, 1941.

DOS SANTOS, V. T.; GONÇALVES, P. C. Verificação de estirpe de *Haemonchus* resistente ao thiabendazole no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v. 9, p. 201-209, 1967.

DRECHSLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free-living terricolous nematodes. **Mycologia**, Philadelphia, v. 29, p. 447-552, 1937.

DRUDGE, J. H.; SZANTO, J.; WYATT, Z. N. Field studies on parasite control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 25, p. 1512-1518, 1964.

DUDDINGTON, C. L. A new predacious species of *Trichotecium*. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 32, p. 284-287, 1950.

ECHEVARRIA, F. A. M. Doenças parasitárias de ovinos e seu controle. In: SIMPÓSIO PARANAENSE DE OVINOCULTURA, 1988, Guarapuava. **Anais...** Londrina: Iapar, 1988. p. 46-47.

ECHEVARRIA, F. A. M.; BORBA, M. F. S.; PINHEIRO, A. C.; WALLER, P. J.; HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America; Brazil. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 199-206, 1996.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, p. 149-155, 1997.

FAEDO, M.; BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 76, p. 129-113, 1998.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S. O.; YEATES, G. W.; HOGLUND, J.; WALLER, P. J. Growth of the fungus *Duddintognia flagrans* in soil surrounding faeces deposited by cattle or sheep fed the fungus as a means of controlling the free-living stages of nematode parasite. **Biological Control**, Orlando, v. 23, p. 64-70, 2002.

FERNÁNDEZ, A. S.; LARSEN, M.; NANSEN P.; HENNINGSEN E.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; BJORN, H. The ability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce the transmission of infective

Ostertagia ostertagi larvae from faeces to herbage. **Journal of Helminthology**, Oxon, v. 73, p. 115-122, 1999.

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

FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, p. 239, 2004.

GASBARRE, L. C.; MILLER, J. E. Genetics of helminth resistance. In: AXFORD, R.F.E.; BISHOP, S. C.; NICHOLAS, F. W.; OWEN, J. B. (Ed.). **Breeding for disease resistance in farm animals**. New York: CABI Publishing, 1999. p. 129-152.

GILL, H. S.; LE JAMBRE, L. F. Novel approaches to the control of helminth parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 26, p. 915-925, 1996.

GIRÃO, E. S.; GIRÃO, R. N.; MEDEIROS, L. P. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrintestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 22, p.197-202, 1992.

GOMES, A. P. S. **Controle biológico *in vivo* de nematódeos parasitos gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Arthrobotrys robusta* e atividade *in vitro* de isolados do fungo *Monacrosporium* sobre nematódeos**. 81 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 1998.

GRAY, N. F. Nematophagous fungi with special reference to their ecology. **Biology Revision**, v. 62, p. 245-397, 1987.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994.

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

GRØNVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRESCIANI, J.; RAWAT, H.; FRIBERT, L. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus

Duddingtonia flagrans. **Journal of Helminthology**, London, v. 70, p. 291-297, 1996b.

HOLMES, P. H. Pathogenesis of Trichostrongylosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.18, n. 2, p. 89-101, 1985.

HOSTE H.; CHARTIER, C. Response to challenge infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in dairy goats. Consequences on milk production. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 43-54, 1998.

HOSTE, H.; JACKSON, F.; ATHANASIADOU, S.; THAMSBORG, S. M.; HOSKIN, S. O. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 253-261, 2006.

HSU, C.; LEVINE, N. D. Degree day concept in development of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* under constant and cyclic conditions. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 38, p.1115-1119, 1997.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária. **Pesquisa da Pecuária Municipal**, 2007. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2007>>. Acesso em: 24/01/2009.

JACKSON, F. Antihelmintics - What's the alternative? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 62-68, 2004.

JACKSON, F.; MILLER, J. E. Alternative approaches to control – Quo vadit? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, p. 371-384, 2006.

JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Interactions between nematophagous fungi and plant parasitic nematodes: Attraction, induction of trap formation and capture. **Nematology**, Leiden, v.26, p. 383-389, 1980.

JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infections events in the fungus-nematode system. In: POINAR O. G.; BORNE J. H. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 59-62.

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

KETZIS, J. K.; VERCRUYSSSE, J.; STROMBERG, B. E.; LARSEN, M.; ATHANASIADOU, S.; HOUDIJK, J. G. Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 139, p. 321-335, 2006.

KNOX, D. P.; SMITH, W. D. Vaccination against gastrointestinal nematode parasites of ruminants using gut-expressed antigens. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 100, p. 21-32, 2001.

KRECEK, R. C.; GROENEVELD, H. T.; MARITZ, J. I. A preliminary study of the effect of microclimate on third stage larvae of *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* on irrigated pasture. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 22, p. 747-752, 1992.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; ZORN, A. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 60, p. 321-330, 1995.

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

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. **Parasitology**, Cambridge, v. 120, p.121-131, 2000.

LARSEN, M. Biological control in a global perspective – a review with emphasis on *Duddingtonia flagrans*. In: **FAO**. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. Rome: FAO, 2002. 104 p. (FAO Animal Production and Health Paper).

LARSEN, M. Biological control of nematode parasites in sheep. **Journal Animal Science**, Sofia, v. 84, p. 133-139, 2006.

LE JAMBRE, L. F.; WHITLOCK, J. H. Seasonal fluctuation in linguiform morphs of *Haemonchus contortus* cayugensis. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 54, n. 4, p. 827-830, 1968.

LEHMAN, P. S.; REID, J. W. *Phyllognathopus viguieri* (Crustácea: Harpacticoida), a predaceous copepod of phytoparasitic, entomophatogenic and free-living nematodes. **Soil & Crop Science Society of Florida Proceedings**, Bradenton, v. 52, p. 78-82, 1993.

LEVINE, N. D. Weather, climate and bionomics of ruminant nematode larvae. **Advances in Veterinary Science**, New York, v. 8, p. 215-261, 1963.

LICHTENFELS, J. R.; PILITT, P. A.; HOBERG, E. P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. **Journal Parasitology**, Lawrence, v. 80, p. 107-119. 1994.

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

MACRAE, J. C. Metabolic consequences of intestinal parasitism. **The Proceedings of the Nutrition Society**, Wallington, v. 52, p.12-130, 1993.

MCLEOD, R. S. Cost of the major parasites to the Australian livestock industries. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 25, p. 1363-1367, 1995.

MEEUSEN, E. N. T.; PIEDRAFITA, D. Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 33, p. 1285-1290, 2003.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; VILLAROEL, A. S., GIRÃO M. D. Resistência a anti-helmínticos em nematódeos gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, Estado do Ceará. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 8, p. 7-11, 1998.

MOLENTO, M. B. Guia FAMACHA para diagnóstico clínico de parasitoses em pequenos ruminantes. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, p.175-178, 2000.

MOLENTO, M. B. Multidrug resistance in *Haemonchus contortus* associated with suppressive treatment and rapid drug alternation. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 272, 2004.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus*

contortus em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

MORAES, F. R. **Uso de marcadores imunológicos na avaliação da resposta imune dos ovinos à infecção natural por nematódeos e na seleção de animais resistentes às parasitoses**. 194 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

MORGAN-JONES, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Infections events in the fungus-nematode system. In: POINAR, O. G.; BORNE J. H. **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 59-62.

MORRIS, C. A.; AMYES, N. C.; BISSET, S. A.; MACKAY, A. D. Resilience to nematode parasite challenge in industry and AgResearch selection flocks. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, Hamilton, v. 64, p. 300-303, 2004.

MORTENSEN, L. L., WILLIAMSON, L. H., TERRILL, T. H.; KIRCHER, R. A.; LARSEN, M.; KAPLAN, R. M. Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg v. 23, p. 495-500, 2003.

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

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**, Oxford, v. 27, p. 325-335, 1988.

NANSEN, P.; LARSEN, M.; ROEPSTORFF, A.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A. Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v. 82, p. 580-584, 1996.

NORDBRING-HERTZ, B.; STÄLHAMMAR-CARLEMALM, M. Capture of nematode by *Arthrobotrys oligospora* an electron microscope study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 56, p. 1297-1307, 1978.

PADILHA, T. Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil. In: PADILHA, T. (Ed.). **Controle**

dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes. Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1996a. p. 169-178.

PADILHA, T. Resíduos de anti-helmínticos na carne e leite. In: Padilha, T. (Ed). **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes.** EMBRAPA/CNPGL, Coronel Pacheco, Brasil, 1996b. p. 77-93.

PADILHA, T.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos tricostrongilídeos: Uma alternativa para higienização das pastagens. In: PADILHA, T. (Ed.). **Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes.** Coronel Pacheco: EMBRAPA/CNPGL, 1996. p. 215-237.

PRICHARD, R. K. Anthelmintic resistance in nematodes: Extent, recent understanding and future directions for control and research. **Internacional Journal Parasitology**, Oxon, v. 20, n. 4, p. 515-523, 1990a.

PRICHARD, R. K. Biochemistry of anthelmintic resistance. **Round Table Conference in VIIIth International Congress of Parasitology**, Paris, p. 141-146, 1990b.

RAHMAM, W. A. Changes in live weight gain and blood constituents and worm egg out put in goats artificially infected with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. **British Veterinary Journal**, London, v. 146, n. 6, p. 543-550, 1991.

RAHMAM, W. A; COLLINS, G. H. Changes in liveweight gain and blood constituents in experimental infection of goats with a goat – derived compared with a sheep-derived strain of *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 38, p.145-153, 1991.

RAMALHO, L.; PAVOSKI, C.; BOSO, A. L. R; LOURENÇO, F. J.; SIMONELLI, S. M.; CAVALIERI, F. L. B Resistência do *haemonchus contortus* e outros parasitas gastrintestinais ao levamisol, closantel e moxidectina em um rebanho ovino no noroeste do Paraná, Brasil. **Anais... Conbravet**, 2008.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V. SOUZA, A. P.; AVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p.1889-1895, 2004.

ROCHA, R. A.; AMARANTE, A. F. P.; BRICARELLO, P. A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around

parturition and during lactation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 55, p. 65-75, 2004.

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**, London, v. 81, p. 387-392, 2007.

RUBNER, A. Revision of predacious Hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. **Studies in Mycology**, v. 39, p. 1-134, 1996.

SANGSTER, N. C. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitology**, v. 113, Suppl: S201-16, 1996.

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

SANTOS, C. P.; SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; LARSEN, M. Nematophagous fungi in decomposing ruminant and equine feces in Brazil. In: INTERNATIONAL CONFERENCE NOVEL APPROACHES TO THE CONTROL OF HELMINTHS PARASITES OF LIVESTOCK, 2, 1998, Baton Rouge. **Proceedings...** Baton Rouge, 1998. p. 59.

SANTOS, C. P. Isolamento, identificação, produção massal de fungos nematófagos e avaliação de características biológicas do fungo *Duddingtonia flagrans*. 2000. 80f. **Tese (Doutorado). Seropédica: UFRJ, 2000.**

SANTOS, C. P.; CRUZ, D. G.; BRAGA, S. R.; LOPES, A. J. O. Curso de infecções por nematóides gastrintestinais em ovinos criados no município de Campos dos Goytacazes - Norte Fluminense. **Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 23, p. 317-318, 2003.

SINDAN - Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Saúde Animal, 2006. Disponível em: <http://www.sindan.org.br>. Acesso em: 04/02/ 2007.

SMITH, G. The population biology of the parasitic stages of *Haemonchus contortus*, **Parasitology**, Cambridge, v. 96, p. 185-195, 1988.

SOPRUNOV, F. F. **Predacious hyphomycetes and their application in the control of pathogenic nematodes**. Ashkhabad, 1958. 365p. Jerusalem: Israel

Program for Scientific Translations, 1966, 292 pp. (translate from Russian by NEMCHONOK, S.).

SOTOMAIOR, C. S.; SOCCOL, V. T. Estudo do tipo de hemoglobina como auxiliar na seleção de ovinos resistentes e susceptíveis aos helmintos gastrintestinais. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 3, p. 51-55, 1998.

SOULSBY, E. J. **Textbook of veterinary clinical parasitology**. Oxford: Blackwell, p. 1120, 1965.

STEAR, M. J. MURRAY, M. Genetic Resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal of nematodes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 54, p. 161-176, 1994.

STEAR M. J.; BAIRDEN K.; BISHOP S. C.; GETTINBY G.; MCKELLAR Q. A.; PARK M.; STRAIN S.; WALLACE D. S. The processes influencing the distribution of parasitic nematodes among naturally infected lambs. **Parasitology**, Cambridge, v. 117, p. 165-171, 1998.

STIRLING, G. R. Host specificity of *Pausteria penetrans* within the genus Meloidogyne. **Nematologica: International Journal of Nematological Research**, Leiden, v. 1, p. 203-209, 1985.

STIRLING, G. R.; MANI, A. The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate. **Nematologia**, v. 41, p. 240-250, 1995.

STIRLING, G. R.; SMITH, L. J.; LICASTRO, K. A.; EDEN, L. M. Control of root-knot nematode with formulations of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys dactyloides*. **Biological Control**, Orlando, v. 11, p. 224-230, 1998.

STRONG, L.; WALL, R.; WOOLFORD, A.; DJEDDORD, D. The effect of faecally excreted ivermectin and fenbendazole on the insect colonization of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 62, p. 253-266, 1996.

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

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Intake and utilisation of food by growing lambs with parasitic damage in the small intestine caused by daily dosing with *Trichostrongylus*

colubriformis larvae. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 86, p. 507-515, 1976.

SYKES, A. R.; COOP, R. L. Intake and utilisation of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 88, p. 671-677, 1977.

THAMSBORG, S. M.; POEPSTORFF, A.; LARSEN, M. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 84, p. 169-186, 1999.

TAYLOR, M. A.; HUNT, K. R. Anthelmintic drug resistance in the UK. **Veterinary Record**, London, v. 125, p. 143-147, 1989.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasites of sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, third edition, p. 152-165, 2007.

THOMAZ-SOCCOL, V. T.; SOTOMAIOR, C.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; SILVA, M. C. P.; MILCZEWSKI, V. Occurrence of resistance to anthelmintics in sheep in Paraná State, Brazil. **Veterinary Record**, London, v. 139, p. 421-422, 1996.

TORINA, A.; FERRANTELLI, V.; SPARAGANO, O. A. E.; REALE, S.; VITALE, F.; CARACAPPA, S. Climatic conditions and gastrointestinal nematode egg production. Observation in breeding sheep and goats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1026, p. 203-209, 2004.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. 3. ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, p. 84, 1994.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 292, 1998.

VAN WYK, J. A.; MALAN, F. S.; RANGLES, J. L. How long before resistance makes it impossible to control some field strains of *Haemonchus contortus* in South Africa with any of the modern anthelmintics? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 70, p.111-122, 1997a.

VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? In: WORKSHOP OF MANAGING

ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES, 1997, Sun City, South Africa. **Proceedings...** Sun City, 1997b. p.51-63.

VAN WYK, J. A.; STENSON, M. O.; VAN DER MERWE, J. S.; VORSTER, R. J.; VILJOEN, P. G. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Onderstepoort, v. 66, p. 273-284, 1999.

VAN WYK, J. A. *Refugia* – Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Onderstepoort, v. 68, p. 55-67, 2001.

VEENHUIS, M.; NORDBRING-HERTZ. 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.

VLASSOFF, A.; LEATHWICK, D. M.; HEATH, A. C. G. The epidemiology of nematode infections of sheep. **New Zealand Veterinary Journal**, Wellington, v. 49, n. 6, p. 213-221, 2001.

WAGHORN, T. S.; LEATHWICK, D. M.; CHEN, L. Y.; SKIPP, R. A. Efficacy of de nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastrointestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 118, p. 227-234, 2003.

WALLACE, D. S.; BAIRDEN, K.; DUNCAN, J. L.; FISHWICH, G.; GILL, M.; HOLMES, P. H.; Mc KELLAR, Q. A.; MURRAY, M.; PARKINS, J. J.; STEAR, M. J. Influence of soyabean meal supplementation on the resistance of Scottish Blackface lambs to haemonchosis. **Research Veterinary Science**, London, v. 60, n. 2, p.138-143, 1996.

WALLER, P. J.; DASH, I. A.; BARGER, K. M.; LE JAMBRE, L. F.; PLANT, J. Anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep: learning from de Australian experience. **Veterinary Record**, London, v. 136, p. 411-413, 1995.

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

WALLER, P. J. Possible means of using nematophagous fungi to control nematode parasites of livestock. In: Biological control of gastrointestinal nematodes ruminants

using predacious fungi, **19 FAO Animal Production and Health**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1998, p. 11-14.

WALLER, P.J.; KNOX, M. R.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 321-330, 2001a.

WALLER, P. J.; FAEDO, M.; ELLIS, K. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 102, p. 299-308, 2001b.

WALLER, P.J.; SCHWAN, O.; LJUNGSTRÖM, B. L.; RYDZIK, A.; YEATES, G. W. Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the island of Gotland, Sweden. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 126, p. 299-315, 2004.

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

WANYANGU, S. W., MUGAMBI, J. M., BAIN, R. K., DUNCAN, J. L., MURRAY, M., STEAR, M. J. Response to artificial and subsequent natural infection with *Haemonchus contortus* in Red Maasai and Dorper ewes. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 69, p. 275-282, 1997.

WOLSTRUP, J.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; BØGH, H. O.; ILSØE, B. An attempt to implement the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in biological control of trichostrongyle infections of first year grazing calves. **Journal of Helminthology**, London, v. 68, p. 175-180, 1994.

ZOPF, W. Zur Kenntnis der Infektions-Krankheiten niederer Thiere und Pflanzen. **Nova Acta der Kaiserlichen Leopoldinischen- Carolinischen Akademie der Naturforscher**, v. 52, p. 314-376, 1888.

3 EFICÁCIA *IN VITRO* DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* CONTRA LARVAS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS

RESUMO

Os trabalhos *in vitro* relacionados a predação de fungos nematófagos em nematóides são restritos, contudo, constituem uma importante alternativa a ser testada para o conhecimento prévio da viabilidade do mesmo quando realizado *in vivo*. O objetivo deste trabalho foi determinar a eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* em teste *in vitro* contra nematóides gastrintestinais presentes em fezes de ovelhas naturalmente infectadas. Amostras fecais (10g) com ovos por grama de fezes (OPG) acima de 1000 foram selecionadas, homogêneas e semeadas em placas de Petri, sendo posteriormente inoculado *D. flagrans* em nove doses: 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4g (Ensaio 1). As dosagens foram obtidas a partir do cálculo do peso médio dos animais (40 kg), multiplicado pela quantidade em gramas de milho (substrato fúngico contendo 350 mil clamidósporos), dividido pela média de fezes eliminadas pelos animais diariamente (1,200 kg) e multiplicado pela quantidade de fezes em cada placa. Estas foram incubadas com fungo a 28°C e 80% de umidade por 14 dias. Após esse período, as larvas foram recuperadas pela técnica de Baermann, identificadas e quantificadas. Todos os testes foram realizados em triplicata. O experimento foi realizado com doses adicionais de 0,00625; 0,0125 e 0,025g (Ensaio 2). Os resultados revelaram uma correlação negativa entre concentração fúngica e número de larvas, em ambos os ensaios. No ensaio 1, por meio da correlação por postos de Spearman, obteve-se valor de $R= 0,626$, significativo a 1% de probabilidade ($p<0,001$). No segundo ensaio foi aplicada a mesma correlação, e o valor obtido foi de $R=0,855$, significativo a 1% de probabilidade ($p<0,001$), demonstrando que a redução de larvas foi significativa na presença de *D. flagrans*. A dosagem de fungo utilizada em ensaios *in vitro* baseados em cálculos *in vivo*, foi otimizada para aprimorar uma dose padrão a ser administrada aos animais. *D. flagrans* demonstrou ser o método mais efetivo de controle biológico no combate ao grande problema que são as endoparasitoses de pequenos ruminantes.

Palavras-chave: *Duddingtonia flagrans*. Ovinos. Nematóides.

ABSTRACT

The *in vitro* works related to the nematophagous fungus predation in nematodes are restricted, even though they constitute an important alternative to be tested as a previously known to the viability of it when carried through *in vivo*. The objective of this work was to determine the effectiveness of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* using an *in vitro* assay against gastrointestinal parasites present in naturally infected sheep's feces. Fecal samples (10g) with more than 1000 eggs per gram of feces (EPG) were selected, distributed in plates and inoculated with *D. flagrans* in nine doses: 0.0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 and 6.4g (Assay 1). The dosages had been calculated by the animal average weight, multiplied for the corn's grams quantity (fungi's substratum with 350 thousand chlamydospores), divided by the daily average of feces produced per animal (1.2 Kg), and multiplied for the amount of excrements in each plate. These were incubated with fungi at 28°C and 80% of humidity for 14 days. After this, the larvae were recovered by means of the Baermann's technique, identified and quantified. All the assays were performed in triplicates. The experiment was carried through with additional doses of 0.00625, 0.0125, 0.025g (Assay 2). The results had disclosed to a negative correlation between fungal concentration and number of larvae, in both assays. In assay 1, value of $R=0.626$ was obtained by means of Spearman's correlation, significant at a 1% of probability ($p < 0.001$). In as the assay the same correlation was applied, and the value obtained was 0.855, significant at a 1% of probability ($p < 0.001$), demonstrating that the reduction of larvae was significant in the presence of *D. flagrans*. The fungus dosage used in *in vitro* assays based in *in vivo* calculations, was optimized to improve a standart dosage to be administered to the animals. *D. flagrans* demonstred to be the most effective method of biological control against the big problem that are the endoparasitosis on small ruminants.

Key Words: *Duddingtonia flagrans*. Sheep. Nematodes.

3.1 INTRODUÇÃO

Estudos *in vitro* têm demonstrado a capacidade do fungo *Duddingtonia flagrans* em predar nematóides e reduzir do número das larvas nos estádios de vida livre dos mesmos (LARSEN, 1999, 2002).

GRØNVOLD *et al.* (1996a), demonstraram a capacidade de *D. flagrans* em produzir armadilhas e clamidósporos em presença de larvas infectantes de *Teladorsagia ostertagi*, chamando atenção de pesquisadores como um possível controlador biológico de nematóides gastrintestinais de ruminantes. GRØNVOLD *et al.* (1996b), demonstraram que o fungo apresentou uma taxa de crescimento entre 15 e 60 mm por semana em temperaturas entre 20° e 30°C, sendo a produção de suas armadilhas induzida pela simples presença de nematóides com seus movimentos vigorosos, com suas excretas, tensão de gás carbônico local, dentre outros fatores que provocam essa indução de armadilhas. À temperatura de 30°C, produziu de 700 a 800 armadilhas por cm², em dois dias, na presença de 20 nematóides por centímetro quadrado. Segundo BARRON (1977), após a captura dos nematóides, as hifas penetram sua cutícula, colonizando o interior do corpo emergindo novamente na superfície da cutícula do nematóide, produzindo esporos e ramos miceliais.

Foi observado o comportamento predatório de *D. flagrans* por meio de constricções e inserções de suas hifas em larvas infectantes de *Ostertagia ostertagi* (FERNÁNDEZ *et al.*, 1999), *Trichostrongylus* sp. (FAEDO *et al.*, 1997), *Nematodirus* sp. (GITHIGIA *et al.*, 1997), em cultivos fecais.

Estudos *in vitro* com outros gêneros de fungos nematófagos também foram realizados tendo obtido sucesso, embora *D. flagrans* tenha se mostrado mais promissor. ARAÚJO *et al.* (1992), avaliaram a atividade de um isolado de *Monacrosporium ellypsosporum* sobre larvas de *Haemonchus placei*, observando uma alta eficácia no controle das larvas infectantes. *Arthrobotrys robusta* predou uma percentagem elevada de 92,33% do nematóide *H. contortus* em sete dias de interação (MENDOZA-DE-GIVES *et al.*, 1992).

O objetivo deste trabalho foi determinar a eficácia do fungo nematófago *D. flagrans*, em testes *in vitro*, em diferentes concentrações, contra nematóides gastrintestinais presentes em fezes de ovinos naturalmente infectados e programar um intervalo entre os tratamentos como controlador biológico.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois ensaios, nos quais foi utilizada a dosagem de 350.000 clamidósporos do fungo *D. flagrans* e 20 unidades experimentais da espécie *Ovis domesticus*, fêmeas, mestiças, de pesos variados e com idade entre 1 e 2 anos, naturalmente infectadas por nematóides gastrintestinais de propriedade da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

Os animais se alimentavam de silagem, concentrado de milho além da pastagem, dispunham de água *ad libitum*, e não receberam tratamentos antiparasitários. Todavia, estes foram avaliados clinicamente pelo Método Famacha (MOLENTO *et al.*, 2004) e condição corporal. Os animais foram tratados somente entre os intervalos dos experimentos, dois meses anteriores aos eventos, com Moxidectina a 0,2% (Cydectin[®], Fort Dodge), de acordo com a dose recomendada pelo fabricante: 1 mL para cada 10 quilogramas de peso corporal.

O ensaio 1 consistiu de fezes de animais com contagem de ovos por grama de fezes (OPG), segundo Técnica de GORDON e WITHLOCK (1939), acima de 1000. O ensaio 2, com fezes de animais com OPG acima de 800.

3.2.1 Ensaio 1

Para esse ensaio, amostras de 10 gramas de fezes foram misturadas e aleatoriamente semeadas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, sob discos de papel absorvente utilizados em laboratório, acrescido de substrato fúngico (composto de milho e clamidósporos de *D. flagrans*), em nove doses distintas: 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 e 6,4g, sendo essas doses correspondentes respectivamente a 0,0 (grupo controle), 292.000, 584.000, 1.168.000, 2.336.000, 4.672.000, 9.344.000, 18.688.000 e 37.376.000 clamidósporos/quilograma/peso vivo. Essas doses foram calculadas a partir da média do peso dos animais (40 kg) multiplicado por 0,18 gramas do substrato fúngico. O valor obtido foi dividido pela quantidade de fezes eliminadas por esses animais ao dia (aproximadamente 1,2kg). O valor obtido foi multiplicado por 10, que foi a quantidade de fezes, em gramas, inoculada em cada placa. Os testes foram realizados em triplicata para cada uma das doses. As placas foram incubadas à 28°C e umidade relativa do ar de 80% por

14 dias. Após esse período, foi realizada a Técnica de Baermann (CORT *et al.*, 1922) para recuperação e identificação dos gêneros das larvas L₃ (UENO; GONÇALVES, 1998), as quais, posteriormente foram acondicionadas em tubos com volume total de 1 mL, obtendo-se três tubos de cada concentração de fungo e controles, totalizando 27 tubos de 1 mL cada (Figura 3.1).

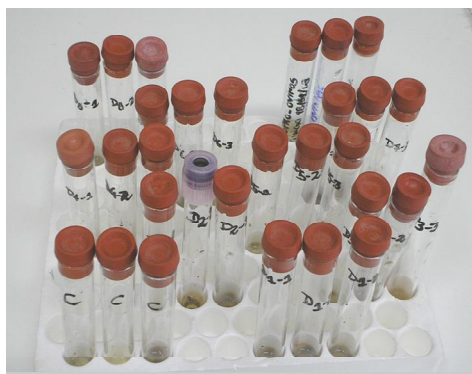


FIGURA 3.1 – TUBOS DE ENSAIO CONTENDO 1 mL DE LARVAS INFECTANTES PROVENIENTES DA RECUPERAÇÃO DAS L₃ PELA TÉCNICA DE BAERMANN APÓS REALIZAÇÃO DO ENSAIO 1.

3.2.2 Ensaio 2

Para o ensaio 2, o procedimento adotado foi semelhante ao ensaio 1, contudo, após resultados preliminares, três valores abaixo da menor concentração também foram incluídos (0,00625; 0,0125 e 0,025g) correspondendo a 36.500, 73.000 e 146.000 clamidósporos/quilograma/peso vivo, respectivamente.

3.2.2.1 Obtenção do número de larvas

Para a contagem das larvas em ambos ensaios foi realizada a deposição de 100 μ L em lâmina de vidro e observação em microscópio óptico para contagem e identificação das mesmas. O resultado foi multiplicado por dez. Ao final, obteve-se três valores do número de larvas para cada concentração, obtendo-se uma média do número de larvas em 1 mL.

3.2.3 Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 17 e o Assistat versão 7,5. A relação entre as concentrações fúngicas e a contagem de larvas foi avaliada por meio da correlação de postos de Spearman e pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade ($p < 0,05$). Foi determinada a linha de tendência avaliando a diminuição do número de larvas em função da concentração do fungo, utilizando o programa Microsoft Excel[®] e cálculo de regressão (R^2). Para ambos os ensaios foi considerado um nível $p < 0,05\%$ de significância.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Análise do Ensaio 1

A média de OPG dos animais experimentais no ensaio 1 foi 11.658 demonstrando intensa carga parasitária. Na avaliação dos animais pelo método Famacha a média foi 3,4, o que significou anemia clínica.

As percentagens dos gêneros encontrados nas coproculturas antes dos tratamentos no ensaio 1 foi de: 46,9; 43,9; 3,3; 3,3; e 1,6% para *Trichostrongylus* sp., *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp., *Bunostomum* sp. e *Chabertia* sp., respectivamente. Enquanto que após a adição do fungo as percentagens encontradas de nematóides foram: 76,4; 19,0; 2,2; 1,5 e 0,9% de *Trichostrongylus* sp., *Haemonchus* sp., *Cooperia* sp., *Chabertia* sp. e *Bunostomum* sp., respectivamente. MORAES *et al.* (1998) e OLIVEIRA *et al.* (1999) constataram que *T. colubriformis* apresenta maior prevalência que o *H. contortus* em algumas regiões do Paraná. Ainda de acordo com os resultados, ARAÚJO *et al.* (2004), demonstraram que *D. flagrans* não é seletivo para um determinado gênero, corroborando com os resultados obtidos.

A Tabela 3.1 demonstra alto valor da média de larvas obtidas nos grupos controles em relação aos tratamentos. A partir do aumento da concentração fúngica, é evidenciada a diminuição dos valores das médias de larvas entre os mesmos, apesar dessa diminuição não ter sido constante em todos os tratamentos. A primeira

dose fúngica (0,05 g) demonstrou ser eficiente para ser utilizada como método de controle de larvas, visto a grande discrepância de valores entre a média da referente concentração de *D. flagrans* e a média do grupo controle, onde o percentual de redução foi de 99,07%.

TABELA 3.1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DO NÚMERO TOTAL DE LARVAS OBTIDAS A PARTIR DAS COPROCULTURAS REALIZADAS NO ENSAIO 1 DOS ANIMAIS COM OPG ACIMA DE 1000

	0,00	0,05g	0,10g	0,20g	0,40g	0,80g	1,60g	3,20g	6,40g
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Média	3120,0	10,0	23,3	26,7	23,3	3,3	6,7	0,0	3,3
D. P.	2650,0	17,3	15,3	11,5	20,8	5,8	5,8	0,0	5,8

A diminuição larval, também pode ser observada no Gráfico 3.1, que na primeira dosagem fúngica, as linhas de tendência decrescem sensivelmente, formando um padrão linear de regressão de larvas com o aumento das dosagens. Apesar das linhas de tendência terem estimado a diminuição das larvas recuperadas, pode-se dizer que a correlação foi perfeita apenas entre as dosagens fúngicas entre 0,05g a 0,2g, embora nas dosagens subsequentes, também ter havido uma redução significativa. Esses resultados tornam-se de importante conhecimento, não somente para a obtenção da eficácia do fungo como controlador biológico, mas como também para evitar a administração desnecessária do produto.

A Tabela 3.2 reafirma os resultados demonstrados na tabela anterior. Nesta, foi obtida uma correlação negativa de 0,626, significativo ao nível de 1% ($p < 0,001$), confirmando que quanto maior a concentração fúngica utilizada, menor a quantidade de larvas recuperadas através das coproculturas, determinando que houve uma redução significativa das mesmas. MENDOZA-DE-GIVES *et al.* (1992, 1994), testaram *in vitro*, isolados do fungo nematófago predador *Arthrobotrys* sobre L₃ de *H. contortus* de ovinos e também obtiveram redução significativa de larvas comparadas às placas tratadas com as placas de grupo controle.

TABELA 3.2 – TESTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN DO ENSAIO 1, PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE QUANTIDADE DE LARVAS OBTIDAS E ADIÇÃO FÚNGICA EM DIFERENTES DOSES

Concentração	Em 1 mL
Correlação	-0,626**
p-valor	<0,001
N Total	27

O Gráfico 3.1 também corrobora o aumento da concentração fúngica à diminuição de larvas, quando demonstra que não somente a primeira dosagem estipulada de 292.000 clamidósporos foi eficiente na atividade predatória de larvas por *D. flagrans*, como também as três dosagens inferiores utilizadas e igualmente com valores de grande amplitude em relação ao grupo controle.

As linhas de tendência do Gráfico 3.1, geradas a partir de cada uma das três contagens de 1 mL de larvas, nos onze tratamentos de fungo propostos, reafirmam a premissa de que quanto maior a dosagem fúngica utilizada, maior é a atividade predatória de *D. flagrans* sobre larvas de nematóides gastrintestinais. Na primeira contagem, obteve-se um valor de 66%, sendo um valor de considerável confiança nessa primeira etapa. Já nas outras contagens, as percentagens foram similares entre elas e menores (30%), também com significado de confiança, embora menor, devido as variabilidades inerentes e decorrentes de qualquer contagem.

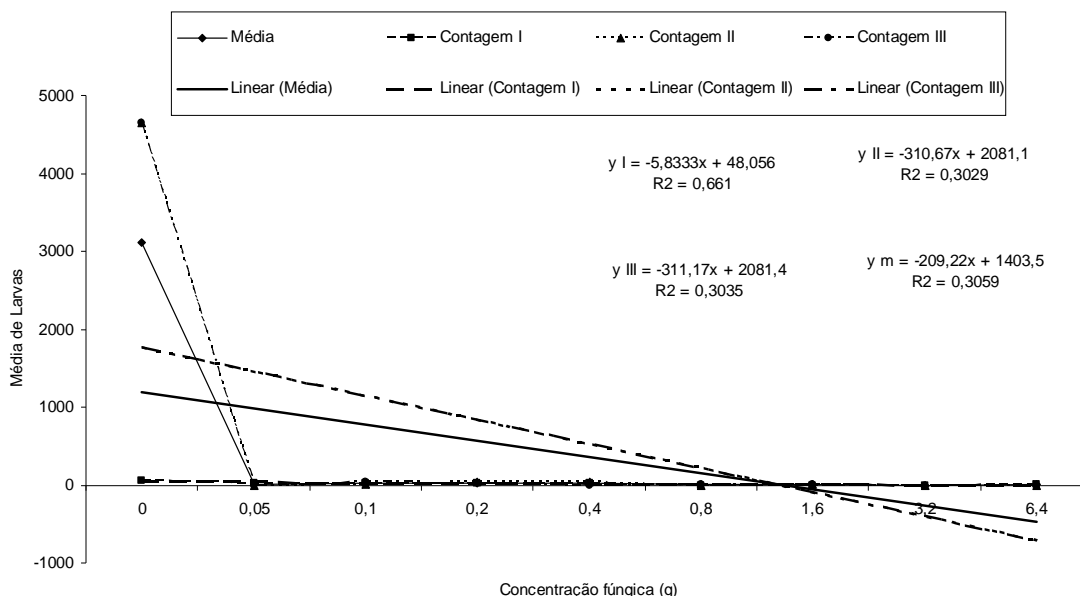


GRÁFICO 3.1 – MÉDIA DAS TRIPLICATAS E TRIPLICATAS DA CONTAGEM DE LARVAS RECUPERADAS DAS COPROCULTURAS DE NEMATÓIDES GASTRINTestinaIS DE OVinos CULTIVADAS NA PRESENÇA DE *Duddingtonia flagrans* EM DIFERENTES DOSES (g) DO ENSAIO 1. LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÕES E VALORES DE R².

3.3.2 Análise do Ensaio 2

No segundo ensaio a média do OPG dos animais foi de 9.560, também demonstrando alta carga parasitária enquanto que a média da avaliação pelo método Famacha foi de 3,6 (anemia clínica).

As percentagens dos gêneros de larvas encontradas nas coproculturas antes da adição dos tratamentos no Ensaio 2 foi de: 73,9% de *Trichostrongylus* sp., 22,7% de *Haemonchus* sp., 3,0% de *Bunostomum* sp., 0,3% de *Chabertia* sp. e 0,1% de *Cooperia* sp., enquanto que após a adição do fungo as percentagens encontradas de nematóides foram: 50,8% de *Haemonchus* sp., 37,7% de *Trichostrongylus* sp., 7,2% de *Bunostomum* sp. e 1,8% tanto para *Cooperia* sp. como para *Chabertia* sp. Esses dados sugerem a ausência de especificidade do agente em concordância com os dados obtidos por ARAÚJO *et al.*, (2004). A ocorrência da grande variação do percentual de larvas entre amostragens pode ser unicamente devido a variação individual dos animais (SOULSBY, 1965).

A Tabela 3.3 corrobora com os resultados e discussões anteriores, que concentrações de clamidósporos com valores abaixo do valor determinado (0,05g), também foram capazes de diminuir o número de larvas, comparados ao controle, mesmo embora a dose de 0,025g tendo obtido um valor discrepante em relação às duas dosagens inferiores.

TABELA 3.3 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO (DP) DO NÚMERO TOTAL DE LARVAS OBTIDAS A PARTIR DAS COPROCULTURAS REALIZADAS NO ENSAIO 2 DOS ANIMAIS COM OPG ACIMA DE 800

	0	0,00625	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Média	2426,7	50,0	130,0	253,3	30,0	26,7	26,7	30,0	6,7	0,0	3,3	0,0
D. P.	585,3	26,5	86,6	335,0	17,3	11,5	5,8	26,5	11,5	0,0	5,8	0,0

Em ambos os ensaios, a partir da dosagem 0,8g, correspondente a 4.672.000 clamidósporos, houve diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,001$), do número de larvas em relação às concentrações anteriores, indo ao encontro do trabalho de MENDOZA-DE-GIVES *et al.* (1998). Esses autores observaram redução de 88% no número de larvas infectantes de *H. contortus* em coproculturas de ovinos após administração oral de 11.350.000 clamidósporos de *D. flagrans*. Entretanto, assim como no ensaio 1, a dosagem de 0,05 g também demonstrou eficiência na diminuição de larvas, embora em dosagens menores, o mesmo tenha ocorrido, quando comparados ao grupo controle. A dose de 0,05 g de substrato fúngico (correspondentes à 292.000 clamidósporos), pode ser o marco inicial para determinação da quantidade fúngica administrada ao animal e/ou pesquisada, mesmo não tendo ocorrido a erradicação de larvas no presente estudo. Ademais, não se preconiza o extermínio dos parasitas, mas sim, mantê-los a um nível em que não prejudique a produção animal (MOLENTO, 2004; VAN WYK, 2001).

A Tabela 3.4 demonstra uma correlação negativa, significativa ao nível de 1% de probabilidade, realimentando os dados anteriormente obtidos de função inversa entre concentração fúngica e número de larvas. A correlação no segundo ensaio foi maior que a obtida no primeiro, embora ambas tenham sido significativas.

TABELA 3.4 – TESTE DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN DO ENSAIO 2, PARA AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE QUANTIDADE DE LARVAS OBTIDAS E ADIÇÃO FÚNGICA EM DIFERENTES DOSES

Concentração	Em 1 mL
Correlação	-0,855 ^{**}
p-valor	<0,001
N Total	36

Em relação ao Gráfico 3.2, também foi altamente significativa a diferença encontrada no número de larvas do grupo controle quando comparada aos grupos com diferentes dosagens de *D. flagrans*, mesmo a partir da primeira dose estipulada que foi 0,05 g, correspondentes a 292.000 clamidósporos.

Embora os coeficientes de determinação do Gráfico 3.2 das equações das contagens tenham obtido resultados com valores baixos, foram similares em todas as contagens, dando uma maior segurança em relação ao número de larvas presentes recuperadas. Outras dosagens fúngicas foram utilizadas por outros autores, embora maiores, também obtendo excelentes percentuais de reduções, levando em consideração que em trabalhos *in vitro*, como os presentes realizados, necessitaram de dosagens bem menores de fungo, pois os clamidósporos não ultrapassaram pelos mesmos obstáculos como em experimentos *in vivo*. CHANDRAWATANI *et al.* (2002), na Malásia, testaram *D. flagrans* com a administração de 9.000.000 de clamidósporos, observando reduções de até 90% no número de larvas infectantes nas coproculturas onde havia predomínio de larvas de *H. contortus*. Em uma pesquisa de MENDOZA-DE-GIVES *et al.* (1998), com ovinos, a redução foi de 88% no número de larvas infectantes da mesma espécie de nematóide após a administração oral de 11.350.000 clamidósporos de *D. flagrans*.

Diante dos trabalhos expostos, fica evidente que a dosagem fúngica ao ser administrada aos animais deve ser superior às utilizadas em testes *in vitro*, devido às adversidades encontradas pelos clamidósporos, desde a ingestão dos mesmos pelos animais até sua eliminação, como pH ruminal, peristaltismo intestinal, competição com a microbiota, dentre outros fatores relevantes. LARSEN (1999), ratifica que as conclusões de estudos em condições laboratoriais são favoráveis para a utilização de fungos como controladores de larvas de nematóides de animais domésticos. Diante da satisfatoriedade dos dados obtidos, propõe-se essas dosagens e esses cálculos desse trabalho, para um estudo *in vivo*, para testar, a

suficiência e a eficiência do fungo frente às adversidades que os clamidósporos suportariam, citadas anteriormente.

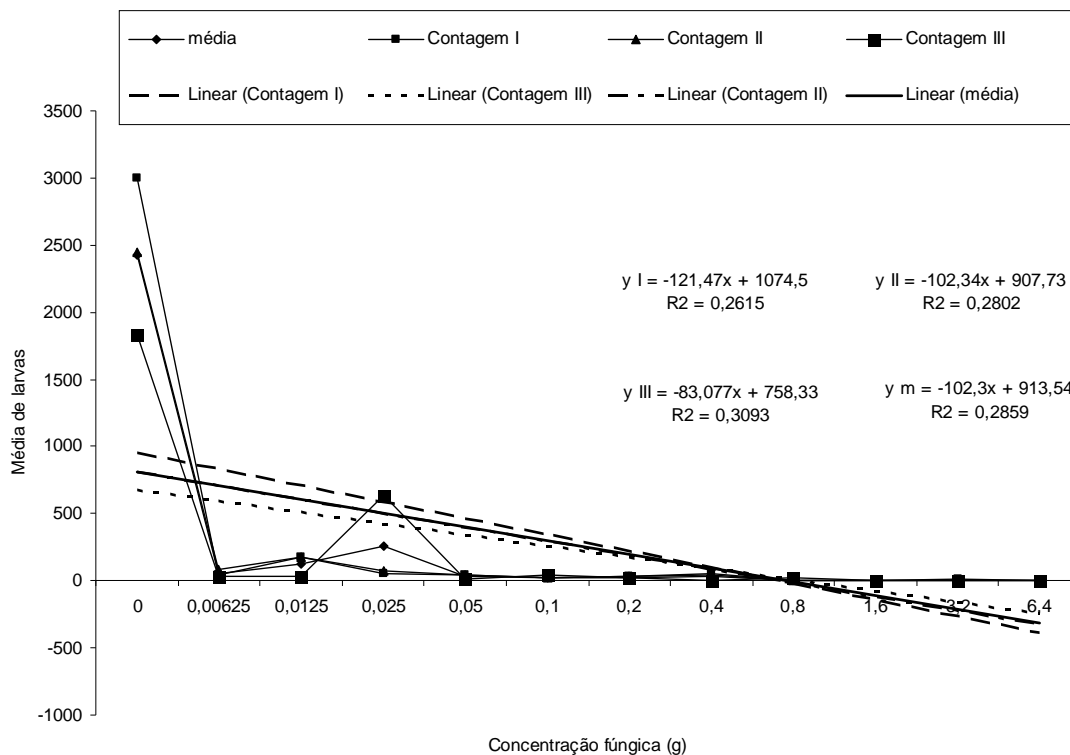


GRÁFICO 3.2 – MÉDIA DAS TRIPLICATAS E TRIPLICATAS DA CONTAGEM DE LARVAS RECUPERADAS DAS COPROCULTURAS DE NEMATÓIDES GASTRINTestinaIS DE OVINOS CULTIVADAS NA PRESENÇA DE *Duddingtonia flagrans* EM DIFERENTES DOSES (g) DO ENSAIO 2. LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÕES E VALORES DE R².

A tabela 3.5 demonstra os percentuais de redução dos dois ensaios, comparativamente. A partir dos valores obtidos por essa tabela, pôde-se observar uma redução significativa de larvas entre tratamentos e grupos controles. Os valores comprovam por outro teste a diminuição de larvas a partir do aumento da concentração fúngica.

Embora numericamente tenha havido maiores percentuais de redução de larvas com o aumento da dose fúngica, estatisticamente esses percentuais de redução foram considerados efetivamente iguais, o que dá subsídios ao pesquisador determinar a dose a ser administrada aos animais.

TABELA 3.5- CONTAGEM E PERCENTUAL DE REDUÇÃO (DESVIO PADRÃO) DO NÚMERO DE LARVAS DE NEMATÓIDES DE OVINOS NOS ENSAIOS 1 E 2, EM DIFERENTES DOSES DE *Duddingtonia flagrans* (CLAMIDÓSPOROS POR QUILOGRAMA DE PESO VIVO EM OVINOS – CLAM/KG/PV)

Cla./Kg/PV	Larvas (DP)	Redução (%)	Larvas (DP)	Redução (%)
	Ensaio 1		Ensaio 2	
0.0	3120,0 a (2650,3)	---	2426,7 a (523,6)	---
36.500 (0,00625 g)	---	---	50,0 b (23,7)	97,94
73.000 (0,0125 g)	---	---	130,0 b (77,5)	94,73
146.000 (0,025 g)	---	---	253,3 b (299,6)	89,73
292.000 (0,05 g)	26,7 b (15,5)	99,07	30,0 b (15,5)	98,79
584.000 (0,1 g)	23,3 b (13,7)	99,17	26,7 b (10,3)	98,92
1.168.000 (0,2 g)	26,7 b (10,3)	99,07	26,7 b (5,2)	98,92
2.336.000 (0,4 g)	23,3 b (18,6)	99,18	30,0 b (23,7)	98,79
4.672.000 (0,8 g)	3,3 b (5,2)	99,98	6,7 b (10,3)	99,73
9.344.000 (1,6 g)	6,7 b (5,2)	99,77	0,0 b (0,0)	100
18.688.000 (3,2 g)	0,0 b (0,0)	100	3,3 b (5,2)	99,87
37.376.000 (6,4 g)	3,3 b (5,8)	100	0,0 b (0,0)	100

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

3.4 CONCLUSÕES

- Embora tenha havido comprovação de diminuição do número de larvas a medida do aumento do número de clamidósporos, a determinação da dose de substrato fúngico administrada aos animais deve ser levada em consideração para haver otimização do produto. Nesse estudo *in vitro*, apesar de todas as dosagens terem demonstrado eficácia, a dosagem de 0,05 g (correspondente a 292.000 clamidósporos) foi considerada eleita para uso por obter uma estável correlação positiva entre custo e benefícios em ambos os ensaios;

- O teste *in vitro* correlacionado à dose oral baseada no peso vivo do animal, pode ser uma metodologia útil a ser empregada para triagem ao teste *in vivo*, já que pode oferecer, de modo simplificado, um forte indicativo de eficácia predatória do isolado testado.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; LIMA, P. A. S.; LIMA, W. S. Avaliação de tratamentos anti-helmínticos em bezerros da bacia leiteira de Muriaé. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 7-14, 1992.
- ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (*Nematoda: Trichostrongyloidea*) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 65-71, 2004.
- BARRON, G. L. **The nematode-destroying fungi**. Ontario: Canadian Biological Publications, p. 140, 1977.
- CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; HÖGLUND, J.; LARSEN, M.; ZAHARI, W. M. Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia; a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Research**, Le Ulis, v. 33, p. 685-696, 2002.
- CORT, W. W.; ACKERT, J. E.; AUGUSTINE, D. L.; PAYNE, F. K. Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v. 2, n. 1, p. 1-16, 1922.
- FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, p.149-155, 1997.
- FERNÁNDEZ, A. S.; LARSEN, M.; NANSEN P.; HENNINGSEN E.; GRØNVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; BJORN, H. The ability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce the transmission of infective *Ostertagia ostertagi* larvae from faeces to herbage. **Journal of Helminthology**, London, v. 73, p.115-122, 1999.
- GITHIGIA, S. M.; THAMSBORG, S.; M, LARSEN, M.; KYVSGAARD, N. C.; NANSEN, P. The preventive effect of the fungus *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of lambs on pasture. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 27, p. 931-939, 1997.

GORDON, N. M.; WITHLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal of the Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization**, v. 12, p. 50-52, 1939.

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

GRØNVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRESCIANI, J.; RAWAT, H.; FRIBERT, L. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, London, v. 70, p. 291-297, 1996b.

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

LARSEN, M. Biological control in a global perspective – a review with emphasis on *Duddingtonia flagrans*. In: FAO. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. **Proceedings...** Rome, Italy: FAO, 104p. (FAO Animal Production and Health Paper), 2002.

MENDOZA DE GIVES, P.; ZAVALETA-MIEJA, E.; HERRERA-RODRIGUES, D.; PERDOMO-ROLDAN, F. Interaction between the nematode destroying fungus *Arthrobotrys robusta* and *Haemonchus contortus* infective larvae *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 41, p. 101-107, 1992.

MENDOZA DE GIVES, P.; ZAVALETA-MIEJA, E.; HERRERA-RODRIGUES, D.; QUIROZ-ROMERO, H. *In Vitro* trapping capability *Arthrobotrys* spp. On infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Nacobbus aberrans*. **Journal of Helminthology**, London, v. 68, p. 223-229, 1994.

MENDOZA DE GIVES, P.; FLORES-CRESPO, J.; HERRERA-RODRIGUEZ, D., VAZQUEZ-PRATS, V., LIEBANO HERNANDEZ, E., ONTIVEROS-FERNADEZ, G.E. Biological control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces by administering an oral suspension of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to sheep. **Journal of Helminthology**, London, v. 72, p. 343-347, 1998.

MOLENTO, M. B. Multidrug resistance in *Haemonchus contortus* associated with suppressive treatment and rapid drug alternation. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 272, 2004.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

MORAES, F. R.; SARNOSKI JUNIOR, S.; SAULT, J. P. E.; OLIVEIRA, V. P.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Estudo epidemiológico da verminose ovina na Região de Ponta Grossa - PR. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (EVINCI), 6., 1998, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Ed. UFPR, 1998. p. 427.

OLIVEIRA, V. P.; MORAES, F. R.; ZAGO, M.; POLLATI, L.; SOUZA, F. P.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Epidemiologia da verminose em ovinos na Região de Guarapuava - Paraná. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (EVINCI), 7., 1999, Curitiba. **Anais...** Curitiba: Ed. UFPR, 1999. v. 2, p. 494.

SOULSBY, E. J. J. **Textbook of veterinary clinical parasitology**. Oxford: Blackwell, 1965.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes**, 4 ed. Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1998.

VAN WYK, J. A. *Refugia* – Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 68, p. 55-67, 2001.

4 EXPERIMENTO *IN VIVO*: ANÁLISE DA EFICÁCIA DO ISOLADO *Duddingtonia flagrans* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES APÓS PASSAGEM PELO TRATO DIGESTÓRIO DE OVINOS

RESUMO

Os resultados obtidos sobre um isolado fúngico em relação a sua eficácia ao transitar pelo trato gastrointestinal de um animal são de fundamental importância para sua utilização como controlador biológico. O objetivo deste trabalho foi determinar a eficácia do isolado *Duddingtonia flagrans*, em três concentrações distintas, após passagem pelo trato digestório de ovinos naturalmente infectados por nematóides gastrointestinais. Oito ovelhas (n=2/grupo), receberam as seguintes dosagens fúngicas: 350.000, 700.000 e 1.000.000 de clamidósporos/kg/PV. O quarto grupo, controle, recebeu apenas substrato. Por um período de dez dias, foram colhidas fezes dos animais por meio de bolsas coletoras, uma vez ao dia. No primeiro e no segundo dia, foi determinada a contagem média de ovos por grama de fezes (OPG) e identificação de larvas por meio de coprocultura. O fungo foi administrado por via oral no 3º, 4º e 5º dias, de acordo com o peso dos animais. Os cinco dias subsequentes (6º ao 10º) consistiram na colheita de fezes, exames de OPG e coprocultura. Após esse período, foi administrado novamente a mesma dosagem de clamidósporos aos mesmos animais, assim como colheita de fezes, exames de OPG e coproculturas, em intervalos semanais, durante três semanas (dias 14, 21, 28). Para todas as colheitas, as fezes de cada grupo foram misturadas, padronizadas em um peso total de 10g e semeadas em placas de petri, para cada um dos quatro tratamentos em duas temperaturas distintas: uma considerada ideal para a atividade predatória do fungo: 28°C e 80% de umidade e outra em uma temperatura considerada menos ideal para realização das armadilhas de *D. flagrans*: média de 15°C e 60% de umidade. Foram realizadas triplicatas em cada grupo e em cada temperatura. Após 14 dias, o material das placas foi processado pela Técnica de Baermann para recuperação das larvas. Nas análises realizadas para o fator temperatura, os dados revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa, com p-valor de 0,728. Entretanto, foi observado percentual de redução de larvas nas diferentes concentrações fúngicas. Quando os clamidósporos foram administrados em dias consecutivos, houve significância estatística (p=0,017), enquanto que a administração do fungo em dias alternados, não houve diferença estatística (p=0,769). Os cinco dias subsequentes à administração fúngica, também obtiveram percentuais de redução de larvas, comprovando a eliminação de *D. flagrans* nas fezes dos animais. Embora as duas menores concentrações fúngicas administradas tenham tido menor percentual de redução comparadas a maior, todas demonstraram serem efetivas na redução da carga de nematóides gastrointestinais de ovinos.

Palavras-chave: *Duddingtonia flagrans*. Nematóides gastrointestinais. Ovinos.

ABSTRACT

An isolated fungi's obtained result related to its traffic through gastrointestinal tract passage on an animal are of basic importance for its utilization as a biological controller. The objective of this work was to determinate the efficacy isolated *Duddingtonia flagrans*, in three distinct concentrations, after going through the digestive tract of sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. Eight sheep (n=2/group), had received the following fungal dosage: 350.000, 700.000 and 1.000.000 of chlamydo spores/kg/BW. The forth group, the control, received only substratum. On a period of ten days, excrements of these animals had been collected by means of collector bags once a day. In the first and the second day, the mean counting of egg per gram of feces (EPG) was determined and the larvae identification by means of coproculture. The fungi was administered by oral mean in the 3^o, 4^o and 5^o days, according to the animals weight. The five subsequent days (6^o until 10^o) had consisted of feces collection, EPG exams and coproculture. After this period, the same chlamydo spore dosage was administered to the same animals, as was the feces collection, the EPG exams and the coprocultures, in weekly intervals, during three weeks (days 14, 21 and 28). For all the collects, the excrements of each group were mixed, standardized to a weight of 10g and sown in plates of petri, for each one of the four treatment in two distinct temperatures: one considered ideal for the fungus predating activity: 28°C and 80% of humidity and another in a temperature considered less ideal for the establishment of traps of *D. flagrans*: average of 15°C and 60% of humidity. Triplicates were made for each group and each temperature. After 14 days, the material of the plates was processed by the Technique of Baermann for larvae recovery. In the carried through analyses for the temperature factors, the data had disclosed non significant statistical difference with a 0.728 p-value. However, a larvae reduction percentage was observed in the different fungi concentrations. When the chlamydo spores were administered in consecutive days there were statistical significance (p=0.017), while the administration of the fungi in alternate days there were no statistical difference (0.769). The 5 days subsequents the fungal administration also obtained larvae reduction percentage, proving the *D. flagrans* elimination in the animal feces. Although the two smaller fungal concentrations administered had had a smaller reduction percentage compared to the biggest, all of them showed effectiveness on the reduction of gastrointestinal nematodes presence in sheep.

Key- words: *Duddingtonia flagrans*. Gastrointestinal nematodes. Sheep.

4.1 INTRODUÇÃO

No Brasil, grande parte da ovinocultura ainda é realizada em regime de pasto total ou parcial, o que leva à constantes infecções por larvas presentes nas pastagens (ANUALPEC, 2003). Os métodos químicos têm sido amplamente utilizados, mas devido a crescente tendência do mercado consumidor, por produtos livres de resíduos químicos e que não causem danos ao meio ambiente (SUAREZ, 2002), torna-se emergente o uso de alternativas para controlar o parasitismo gastrointestinal de ovinos. O uso de fungos nematófagos como controladores biológicos tem demonstrado uma viável e promissora alternativa para o controle das nematodioses gastrointestinais não somente desses animais, mas de todos os animais domésticos (LARSEN, 2000, ARAÚJO *et al.*, 2004).

Para a utilização de fungos, a forma mais prática é a administração oral, na forma de micélio, conídios ou clamidósporos. Após a passagem do material fúngico pelo do trato gastrointestinal, ocorre a colonização no bolo fecal e a predação e destruição das larvas infectantes dos nematóides, embora alguns isolados fúngicos não resistam à passagem pelo trato gastrointestinal dos animais (LARSEN *et al.*, 1992). Esse processo ocorre devido à destruição das suas estruturas fúngicas durante o processo digestório (HASHMI; CONNAN, 1989). WALLER *et al.* (1994), demonstraram que fragmentos de micélio de fungos dos gêneros *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* foram incapazes de sobreviver à incubação em líquido ruminal a 39° C.

Segundo FAEDO *et al.* (1997), a maior espessura da parede celular dos clamidósporos comparada com a dos conídios, faz com que os clamidósporos suportem melhor a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, tendo maiores condições de não serem destruídos pelo mesmo e serem eliminados juntamente com as fezes. FAEDO *et al.* (1998), ressalta que experimentos realizados por diversos pesquisadores, têm demonstrado que clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* pode sobreviver ao atravessar o trato gastrointestinal dos animais sendo eficaz, fazendo apreensões através de armadilhas em larvas presentes nas fezes.

A capacidade dos fungos predadores em combater os nematóides pode ser avaliada através da recuperação das L₃ nos cultivos fecais por meio do percentual de redução das larvas presentes, o qual indica a eficácia do fungo como controlador biológico (FONTENOT *et al.*, 2003). Diversos autores renomados obtiveram

resultados em suas pesquisas como a via oral seja a melhor para a atuação fúngica, embora durante o trânsito pelo trato gastrintestinal de ruminantes, a ingesta seja submetida a ações mecânicas, microbianas e químicas, adversas à sobrevivência do fungo (RIBEIRO, 1997).

A dosagem de esporos requeridos para se obter um controle adequado, depende da espécie do animal. PEÑA *et al.* (2002), determinaram uma dosagem até estabelecer uma dose alvo e relataram que as dosagens de 2.5×10^4 a 5×10^5 esporos/kg⁻¹/PV fornecidos diariamente, foram eficazes para controlar estágios larvares de *Haemonchus contortus* em fezes de ovinos. A redução de larvas nessas dosagens foi de 76,6 a 100%.

O objetivo desse trabalho foi verificar a eficácia de *D. flagrans* em diferentes dosagens após administração oral nos animais, com a finalidade de determinar um intervalo: a cada 24 horas, a cada 48 ou 72 horas, e em dias alternados, entre os tratamentos como controlador biológico de nematóides gastrintestinais de ovinos.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Unidades Experimentais

Para o experimento *in vivo* foram utilizados oito ovinos (*Ovis domesticus*), fêmeas, mestiças, de pesos variados, com idade entre 1 e 2 anos, naturalmente infectados por nematóides gastrintestinais, de propriedade da Universidade Federal do Paraná, UFPR.

Os animais se alimentavam de silagem, concentrado de milho além da pastagem, e dispunham de água *ad libitum*, também não receberam tratamentos antiparasitários, todavia, estes foram avaliados clinicamente para o Método Famacha (MOLENTO *et al.*, 2004), condição corporal e tratados somente entre os intervalos dos experimentos, dois meses anteriores aos eventos, com Moxidectina 0,2% (Cydectin[®], Fort Dodge), de acordo com a dose recomendada pelo fabricante: 1 mL para cada 10 quilogramas de peso corporal.

4.2.2 Delineamento Experimental

4.2.2.1 Quantidade administrada aos grupos tratados com fungo e quantidade administrada ao grupo tratado com milho.

A metodologia para administração nos animais consistiu: Grupo 1: 350 mil clamidósporos por quilograma de peso vivo (PO), ao qual correspondeu a 0,18 gramas do substrato fúngico. Grupo 2: 700.000 clamidósporos por quilograma de peso vivo (PO) correspondente a 0,36 gramas do substrato, Grupo 3: 1.000.000 de clamidósporos por quilograma de peso vivo (PO), referentes à 0,52 gramas, e Grupo 4: controle, onde não foi administrado fungo, somente o substrato milho (PO).

A dose fúngica e de milho foi dependente do grupo de animais ($n=2/\text{grupo}$) (Tabela 4.1), aos quais foram sorteados aleatoriamente, tendo o peso vivo do animal como parâmetro, avaliado em balança digital.

TABELA 4.1 – QUANTIDADE DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* ADMINISTRADOS AOS OVINOS, DE ACORDO COM SEU PESO VIVO E SEU GRUPO EXPERIMENTAL

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Peso (Kg):	24,0	20,0	25	47
Substr. Fung (g):	4,32	7,2	13	*16,6
Peso (Kg):	47,5	49,5	50	59,5
Substr. Fung (g):	8,55	17,82	23	* 21

* substrato milho

4.2.2.2 Método de colheita de fezes

Para a colheita de fezes, foram colocadas bolsas coletoras (Figura 4.1) nesses animais, com orifícios na parte de baixo da bolsa para eliminação de urina. As bolsas foram confeccionadas em nylon e sob medida para um maior conforto. O aparato foi colocado nos animais por um período de 10 horas durante os dias necessários para cada experimentação realizada. Esse período foi estipulado a

partir de uma média de tempo de trânsito gastrointestinal, desde a ingestão alimentar até sua excreção.



FIGURA 4.1 – OVINOS COM BOLSAS COLETORAS PARA COLHEITA DE FEZES.

4.2.2.3 Administração fúngica e colheita de fezes

As bolsas coletoras foram colocadas nos animais no período da manhã e retiradas no período da tarde, durante dez dias consecutivos para colheita de fezes para realização de exames de OPG e coproculturas. Os dez dias consistiram em dois dias de colheita de fezes anteriores aos tratamentos com *D. flagrans*, três dias de tratamentos com a administração de *D. flagrans* assim como cinco dias após administração do presente fungo, para determinar os percentuais de redução, correlacionando os dois dias em que não houveram administração do fungo e com os cinco dias posteriores que também não foram realizadas as administrações.

As colheitas de fezes para os exames de OPG e coproculturas, permaneceram até a quarta semana pós-tratamento, isto é, dias 14, 21 e 28. Esse método foi planejado a fim de poder se observar a infecção parasitária do animal, a partir das administrações fúngicas, anterior ao tratamento, nos dias de tratamento, até a 4^o semana pós-tratamento.

4.2.2.4 Análise comparativa entre temperaturas

O objetivo de comparar as amostras colhidas contendo fungo e cultivando-as sob temperaturas diferentes, foi demonstrar a viabilidade de implementação do fungo, em um local com condições climáticas diferentes de onde o mesmo foi isolado.

As amostras de fezes continham o peso de 10 gramas, as quais foram semeadas em placas de Petri contendo um diâmetro de 10 cm, sob disco de papel absorvente de laboratório. Os testes foram realizados em triplicata para cada animal para os três grupos de fungo existentes e controle, somando, portanto, 24 amostras, as quais foram incubadas em estufa BOD à temperatura de 28°C, considerada esta, ideal para a atividade do fungo (GRØNVOLD *et al.*, 1996). O mesmo procedimento foi realizado, obtendo-se mais 24 amostras, as quais foram mantidas no ambiente, com média de temperatura de 15°C (Tabela 4.2), perfazendo um total diário de 48 placas e um total de 480 placas ao final dos 10 dias consecutivos. A mesma metodologia foi usada para as colheitas dos dias 14, 21 e 28 após última administração fúngica. Todas as amostras foram mantidas nessas condições (estufa/ambiente) por 14 dias, período suficiente para eclosão e mudas das larvas, assim como para avaliar a atividade predatória do fungo.

TABELA 4.2 – TEMPERATURAS MÁXIMAS E MÍNIMAS DOS 13 DIAS DE COLHEITAS

Dias	Temp. Mínima (ambiente) °C	Temp. Máxima °C
1	14	28
2	11	28
3	12	28
4	12	28
5	13	28
6	17	28
7	19	28
8	17	28
9	15	28
10	14	28
1 ^a sem.	15	28
2 ^a sem.	16	28
3 ^a sem.	15	28

4.2.3 Análise Estatística

Para comparação entre os dias que foram administrados fungo consecutivamente com os dias de administração alternada, foi utilizado o programa MiniTab[®] 15.1.0., com $p < 0,05$. Para obtenção da eficácia nos diferentes níveis de concentração do isolado de *D. flagrans*, foi realizado o percentual de redução do número de L₃ recuperadas dos cultivos fecais, calculado de acordo com a equação de MENDOZA-DE-GIVES *et al.* (1999):

$$\% \text{ redução} = \left[\frac{\text{N}^\circ \text{ médio de L}_3 \text{ do controle} - \text{N}^\circ \text{ médio de L}_3 \text{ do grupo tratado}}{\text{N}^\circ \text{ médio de L}_3 \text{ do controle}} \right] \times 100$$

Também foi determinada linha de tendência avaliando a diminuição do número de larvas em função da concentração do fungo e da temperatura, utilizando o programa Microsoft Excel[®] e cálculo de regressão (R²).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 4.3 e 4.4, demonstram os valores obtidos de OPG dos animais durante todo o período experimental. Segundo AMARANTE *et al.* (1996), a contagem de ovos por gramas de fezes constitui um parâmetro que permite avaliar os níveis de infecção dos animais e o de contaminação das pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais.

TABELA 4.3 – DADOS DESCRITIVOS DA MÉDIA DE OVOS POR GRAMA DE FEZES, DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS DURANTE O PERÍODO DE ADMINISTRAÇÃO DE *Duddingtonia flagrans*

Dias de colheita de fezes	3 a 5	14	21	28
OPG – Grupo de 350.000 clam.	13.100	8.300	7.500	9000
OPG – Grupo de 700.000 clam.	12.300	7.900	7.700	8.100
OPG – Grupo de 1.000.000 clam.	13.600	13.100	10.000	6.600
OPG - Grupo Controle	12.000	9.600	6.900	6.000

TABELA 4.4 – DADOS DESCRITIVOS DA MÉDIA DE OVOS POR GRAMA DE FEZES, DOS ANIMAIS EXPERIMENTAIS DURANTE O PERÍODO EM QUE NÃO RECEBERAM *Duddingtonia flagrans*

Dias de colheita de fezes	1 a 2	6 a 10
OPG	14.612	10.200

Diante dos resultados das Tabelas 4.5 e 4.6, pôde-se observar que a administração diária do fungo foi mais eficaz do que a administração em dias isolados. Entre os dias 3 a 5, que foram os três dias consecutivos que os animais receberam clamidósporos, houve um percentual de eficácia em quaisquer dos tratamentos administrados, assim como em ambas temperaturas analisadas. O percentual de redução em dias isolados, só foi obtido na maior dosagem fúngica e não em todas as administrações, concluindo que a administração diária do fungo pode requerer uma menor dose de administração e ainda manter níveis satisfatórios de eficácia do fungo contra larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos.

Para análise de comparação dos dias de administração fúngica, o p-valor na análise de variância, para os dias consecutivos foi 0,017, enquanto que em dias alternados o p-valor foi de 0,769. Esses resultados vão ao encontro de TERRIL *et al.* (2004), que observaram que o fornecimento diário (20 dias de observações) do presente fungo obtinha maiores reduções larvais: 48,99%, do que tratamentos intermitentes com *D. flagrans*: 34,54% a cada 2 dias e 26,15% a cada 3 dias. CHANDRAWATHANI *et al.* (2003), na Malásia, também obtiveram eficácia no tratamento diário de ovinos com *D. flagrans* na redução de L₃. Nos exames de OPG's, os animais que receberam tratamento, obtiveram valores de até 500 ovos por grama, enquanto que os que não recebiam chegavam a níveis que excediam a 3000 ovos por grama de fezes. Nos Estados Unidos, FONTENOT *et al.* (2003), relataram uma redução de larvas infectantes na pastagem e em culturas fecais após administração diária de *D. flagrans*, superior a 80%.

CRUZ *et al.* (2004), compararam dois isolados de *D. flagrans* a outros dois isolados brasileiros de *Arthrobotrys* sp. (*A. oligospora* e de *A. musiformis*). Em condições semelhantes, apenas os isolados de *D. flagrans* reduziram significativamente o número de L₃ nos cultivos fecais, sendo os índices superiores a 90%, comprovando a eficiência de *D. flagrans* após passagem pelo trato digestório de ovinos.

TABELA 4.5 – PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCOLTAS EXTRAÍDAS DA ESTUFA (28°C) A PARTIR DA ADMINISTRAÇÃO DE *D. flagrans* A OVINOS

Dias de administração fúngica	3 a 5	14	21	28
Tratamento de 350.000 clam.	30	0	0	0
Tratamento de 700.000 clam.	12,53	0	0	0
Tratamento de 1.000.000 clam.	50,5	94,84	0	0

TABELA 4.6 – PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCOLTAS SOB A TEMPERATURA MÉDIA DE 15°C, A PARTIR DA ADMINISTRAÇÃO DE *D. flagrans* A OVINOS

Dias de administração fúngica	3 a 5	14	21	28
Tratamento de 350.000 clam.	43,79	0	0	0
Tratamento de 700.000 clam.	14,3	0	0	0
Tratamento de 1.000.000 clam.	70,79	87,5	51,83	0

Os valores obtidos das Tabelas 4.7 e 4.8, demonstraram que houve redução de larvas nos dias em que não houve administração fúngica, corroborando com LARSEN *et al.* (1998), que isolaram fungos de fezes de ovinos a partir da décima segunda hora após a administração oral de clamidósporos de *D. flagrans*. As reduções identificadas nas tabelas citadas foram significativas e se interrelacionam ao serem comparadas sob temperaturas distintas, demonstrando que esse efeito não teve interferência na redução de larvas. OJEDA-ROBERTOS *et al.* (2008), quantificou clamidósporos por grama de fezes (CPG) por meio de câmara de McMaster após administração de clamidósporos por via oral. Os autores observaram a excreção do fungo 24 horas pós-administração, e que esses esporos nas fezes permaneceram presentes durante 5–6 dias após a administração da última dosagem, indo ao encontro dos resultados obtidos por esse trabalho.

A qualidade da ingesta do animal é muito importante e deve ser considerado, pois é diretamente proporcional à sua digestão. RIBEIRO (1997), destaca que o trânsito dos alimentos desde a sua ingestão até a eliminação nas fezes pelo reto tem uma duração variável, de acordo com o que foi consumido pelo animal. Um feno de baixa qualidade de fibras tende a ter um trânsito mais lento que forragens de melhor qualidade. O trânsito total entre ingestão e eliminação é rápido para alguns alimentos (média de 15 horas), podendo durar dois dias ou mais para outros. Portanto, uma das hipóteses de eliminação do fungo em dias de não administração, pode ser resultado da qualidade da alimentação dos ovinos. Portanto, a alimentação

do animal é de extrema importância para poder se determinar o horário de colheita de fezes a fim de ser observada a eliminação do fungo.

TABELA 4.7 – PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCOLTAS, EXTRAÍDAS DA ESTUFA (28°C), NOS DIAS PÓS-ADMINISTRAÇÃO DE *D. flagrans* A OVINOS

Dias de administração fúngica	6 a 10
Grupo de 350.000 clam.	56,7
Grupo de 700.000 clam.	0
Grupo de 1.000.000 clam.	51,35

TABELA 4.8 – PERCENTUAL MÉDIO DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DAS COPROCOLTAS SOB A TEMPERATURA (MÉDIA DE 15°C), NOS DIAS PÓS-ADMINISTRAÇÃO DE *D. flagrans* A OVINOS

Dias de administração fúngica	6 a 10
Grupo de 350.000 clam.	53,47
Grupo de 700.000 clam.	8,09
Grupo de 1.000.000 clam.	47,77

Em relação a atividade do fungo frente as temperaturas testadas, os dados revelaram a partir da análise de variância um p-valor 0,728, demonstrando não ter havido diferença estatisticamente significativa para este fator. Em determinados dias, a quantidade de larvas era maior em temperatura considerada ideal, porém, sob as mesmas condições, a quantidade de larvas era maior em dias frios, ou considerados menos ideais para a atividade (anelamento) do fungo às larvas.

O Gráfico 4.1 ratifica o resultado da análise de variância das temperaturas ao demonstrar não ter havido uma simetria entre temperatura e apreensão de larvas, embora tenha demonstrado uma diminuição na contagem das mesmas ao longo dos dias. GRØNVOLD *et al.* (1996), observou grande quantidade de armadilhas feitas pelo fungo na temperatura de 20-30°C em apenas 2 dias, e poucas armadilhas na temperatura de 10°C em 10 dias, o que significa que em temperaturas mais elevadas, a ação nematocida do fungo é mais rápida com maior eficácia.

A linha de tendência do Gráfico 4.1, demonstra ter havido uma regressão linear dos dados para concentração do fungo e diminuição das larvas, a partir das equações $y = -56,487x^2 - 161,03x + 12278$ e $R^2 = 0,6061$ (28°C) e $y = -152,25x^2 + 1629,5x + 4951,5$ e $R^2 = 0,7097$ (15°C).

Diante das declividades das linhas de tendência do Gráfico 4.1, pode-se prever que a linha sob análises em estufa, foi menos constante que a linha sob

análises em dias com menor temperatura. Pelos coeficientes de determinação (R^2), pôde-se demonstrar que nesse experimento, houve uma predação menor, embora sutil, em temperaturas mais amenas do que em temperaturas mais elevadas, embora GRØNVOLD *et al.* (1996), afirmem maior atividade predatória do fungo sob maiores temperaturas.

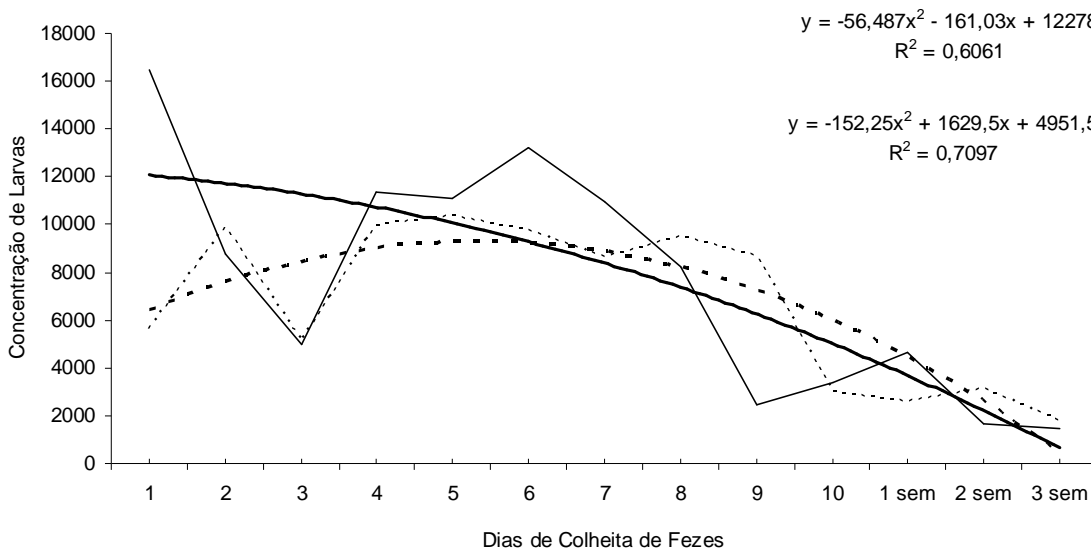


GRÁFICO 4.1 – VALORES MÉDIOS DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO), LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2 .

Os Gráficos quadráticos 4.2, 4.3 e 4.4 ilustram os valores obtidos das larvas recuperadas de cada uma das três unidades de leitura de larvas que compuseram a triplicata realizada no experimento, respectivamente. Da média desses, obteve-se o Gráfico 1, anteriormente já explicitado e descrito.

Em todos os Gráficos subsequentes, as linhas de tendência demonstraram que ocorreu uma diminuição de larvas a medida em que foi aumentada a concentração fúngica, seguindo o padrão inicial do trabalho.

Observou-se que a concentração de larvas infectantes recuperadas nas três amostragens (unidades) foram similares, podendo então, estimar mais precisamente a atividade predatória do fungo nas diferentes dosagens administradas. *D. flagrans* foi efetivo constantemente diante dos testes efetuados.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos, se assemelham. Nos Gráficos 4.2 e 4.3, o referido coeficiente demonstrou-se um pouco mais elevado, obtendo portanto, um resultado de atividade do fungo maior sob temperatura de 28°C. Já no Gráfico 4.4, ocorreu o inverso, assim como no Gráfico 4.1, de médias, com maior atividade fúngica sob temperatura média de 15°C. Isso reafirma que a temperatura não foi fator influente na atividade predatória sobre larvas infectantes por *D. flagrans*. Também, o desvio padrão dos coeficientes correspondentes as respectivas temperaturas (28°C e 15°C), de cada gráfico, foi baixo.

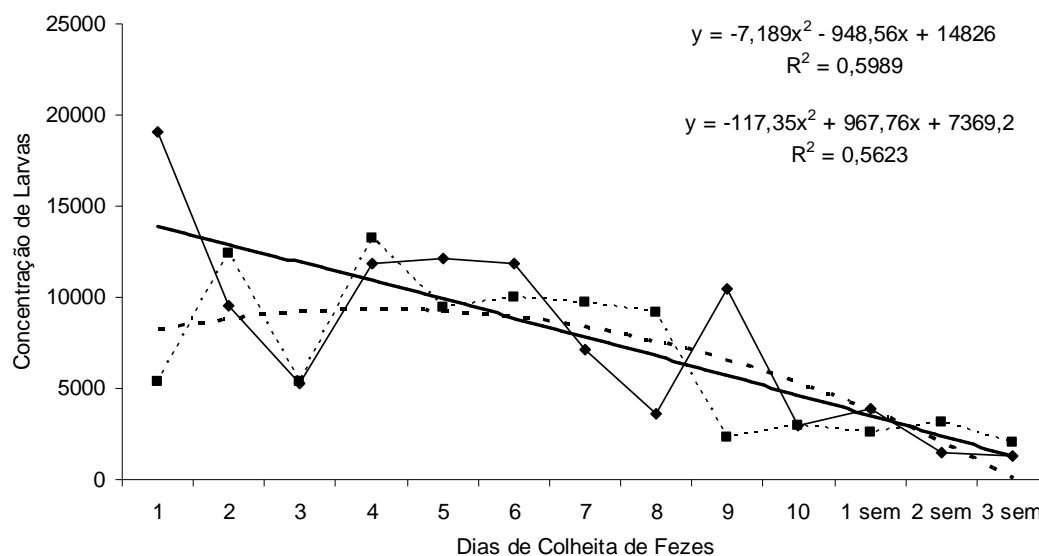


GRÁFICO 4.2 – VALORES DA PRIMEIRA UNIDADE DA TRIPPLICATA DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO), LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2 .

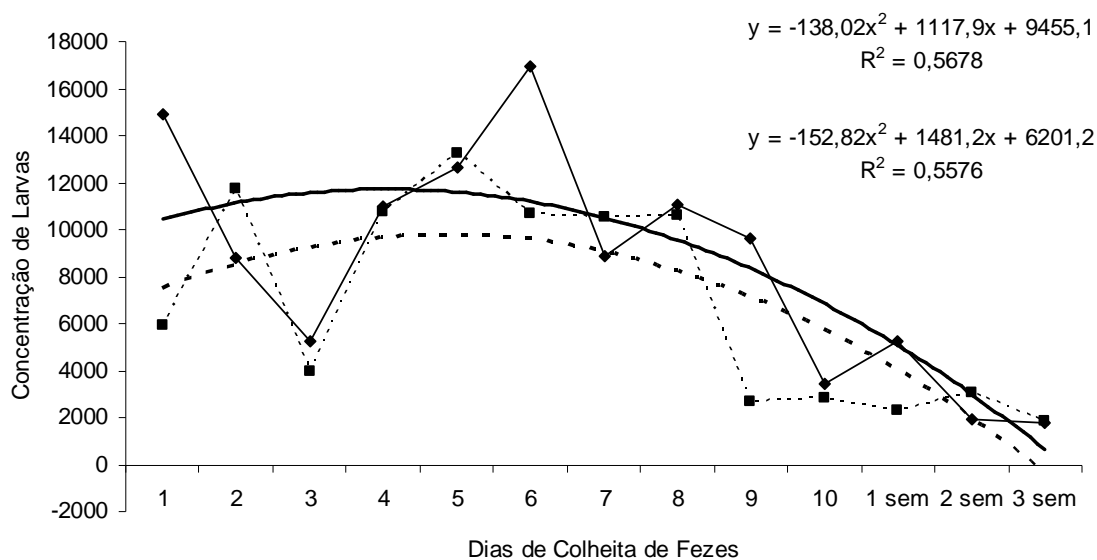


GRÁFICO 4.3 – VALORES DA SEGUNDA UNIDADE DA TRIPPLICATA DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO) LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2 .

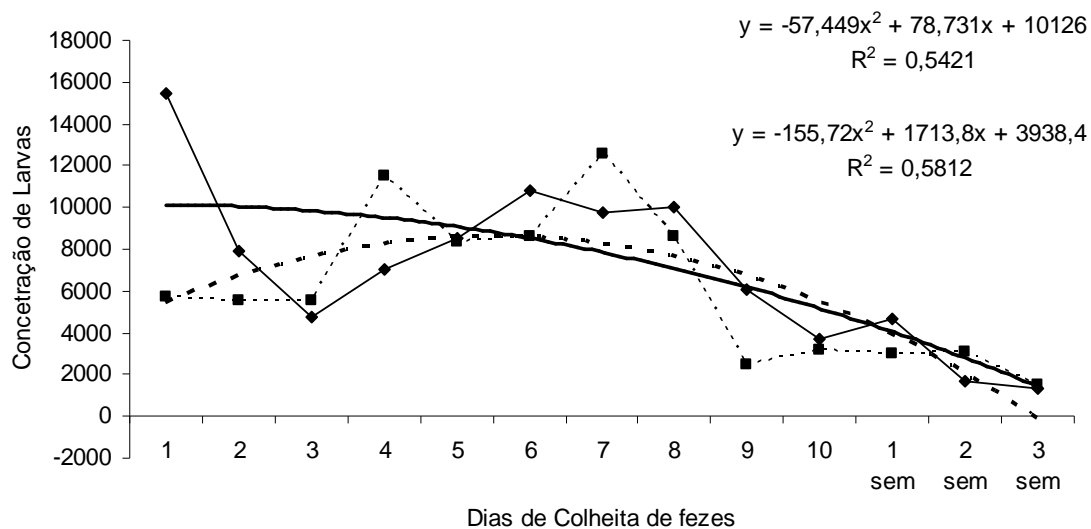


GRÁFICO 4.4 – VALORES DA TERCEIRA UNIDADE DA TRIPPLICATA DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS RECUPERADAS DE COPROCULTURAS EM TEMPERATURAS DISTINTAS: 28°C (ESTUFA) E 15°C (FRIO) LINHA DE REGRESSÃO DOS DADOS, INCLUINDO EQUAÇÃO E VALOR DE R^2 .

4.4 CONCLUSÕES

- *Duddingtonia flagrans* demonstrou ser capaz de suportar o estresse do trato gastrointestinal dos animais como pH, peristaltismo, fermentação e, de acordo com os resultados obtidos, houve redução de larvas nas concentrações utilizadas quando comparados aos achados do grupo controle;

- A administração fúngica em períodos consecutivos teve uma maior eficácia ao preda larvas gastrintestinais de ovinos, quando comparadas à administrações do fungo em dias isolados.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T.; PADOVANI, C. R.; BARBOSA, M.A. Contaminação de pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais parasitos de bovinos e ovinos em Botucatu - SP. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 2, p. 25-73, 1996.

ANUALPEC 2003: Anuário estatístico da produção animal. São Paulo: FNP-Consultoria & Comércio, 2003. p. 380.

ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 13, p. 165-171, 2004.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P. J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. T.; ZAHARI, W. M. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 117, p. 173-183, 2003.

CRUZ, D. G.; CORDEIRO, R. C; LOPES, A. J. O.; ROCHA, L. V.; SANTOS, C. P. Evaluation of the survival and nematophagous efficacy of *Duddingtonia flagrans* isolates and *Arthrobotrys* spp. after passage through the ovine digestive tract. In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSSES, 1., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto, 2004. p. 258.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P. J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans* **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 72, p.149-155, 1997.

FAEDO, M.; BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 76, p.129-113, 1998.

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

GRØNVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRESCIANI, J.; RAWAT, H.; FRIBERT, L. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, London, v. 70, p. 291-297, 1996.

HASHMI, H. A.; CONNAN, R. M. Biological control of ruminant trichostrongylidae by *Arthrobotrys oligospora*, a predacious fungus. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 28-30, 1989.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasite nematodes. **Journal of Helminthology**, London, v. 66, p. 137-141, 1992.

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P. J.; HENNESSY, D. R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 76, p. 121-128, 1998.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious microfungi. **Parasitology**, Cambridge, v. 120, p. 121-131, 2000.

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

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

OJEDA-ROBERTOS, N. F.; TORRES-ACOSTA, J. F. J.; AYALA-BURGOS, A.; AGUILAR-CABALLERO, A.J.; COB-GALERA L. A.; MENDOZA-DE-GIVES P. A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in sheep faeces. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 152, p. 339-343, 2008.

PEÑA, M. T.; MILLER, J. E.; FONTENOT, M. E.; GILLESPIE, A.; LARSEN, M. Evaluation of *Duddingtonia flagrans* in reducing infective larvae of *Haemonchus contortus* larvae in feces off sheep. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 103, p. 259-265, 2002.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura**: criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 1997.

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

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

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

5 CINÉTICA DE CAPTURA E INFECÇÃO DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES TRICHOSTRONGILÍDEOS PELO FUNGO *Duddingtonia flagrans*

RESUMO

A visualização da interação do nematóide com o fungo em diferentes momentos de atividade de *Duddingtonia flagrans*, é de fundamental importância em uma pesquisa, pois objetiva constatar e comprovar as hipóteses do trabalho. Para observação da captura dos trichostrongilídeos pelo fungo nematófago, larvas infectantes com movimentos vigorosos foram selecionadas e inoculadas em placas de petri contendo o fungo *D. flagrans* e meio ágar-água como substrato. As placas foram posteriormente monitoradas sob microscópio óptico em horários distintos: 1^a, 3^a, 4^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a e 25^a hora. Os resultados demonstraram que quanto maior o tempo de contato físico do nematóide com o fungo, maior a proporção de destruição das larvas pelas hifas fúngicas, as quais invadiram o corpo do nematóide completamente na 25^a hora. Já nos primeiros momentos de contato físico entre ambos, observou-se que a presença das larvas com seus movimentos sigmóides, suas excretas, dentre outros fatores, fizeram com que o fungo construísse armadilhas em forma de botões e redes adesivas, anéis constritores e não-constritores, a fim de capturar os nematóides trichostrongilídeos. Em todos os momentos de observação da cinética de captura, a 5^a hora de interação foi crucial para a larva, pois as armadilhas de *D. flagrans* lesaram a cutícula externa do nematóide, ocorrendo um descolamento do seu corpo. Essa estrutura do nematóide é imprescindível tanto para a infecção no animal, como para sua sobrevivência no ambiente, portanto, admite-se que, a partir desse momento, mesmo as larvas permanecendo vivas e ativas nos horários de observações subsequentes, na 5^a hora, a larva perdeu seu poder infectante. Na 15^a hora de interação, foi observado que apesar da grande invasividade de hifas fúngicas pelo corpo do nematóide, a larva ainda permaneceu viva, com movimentos ativos, entretanto sequer, nenhuma viabilidade de continuidade de seu ciclo evolutivo. Portanto, embora os resultados dos horários em que ocorreram a destruição total do nematóide pelo fungo sejam de extrema relevância para o conhecimento dos momentos de penetração das hifas no corpo do nematóide, conclui-se que não são necessários tempos exacerbados de interação para que a larva perca sua viabilidade, o que evidencia a grande capacidade de *D. flagrans* como predador de nematóides.

Palavras-chave: Momentos de interação. Nematóides. Armadilhas.

ABSTRACT

The visualization of the interaction of nematode with fungi at different moments of activity of *Duddingtonia flagrans*, has a great importance in a research, therefore objective to evidence and to prove the hypotheses of the work. To observe the capture of the trichostrongilídeos for nematophagous fungi, infecting larvae with vigorous movements had been selected and inoculated in petri plates containing fungi *D. flagrans* and agar-water mean as substratum. After that, the plates had been monitored under optic microscope in distinct hours: 1^a, 3^a, 4^a, 5^a, 10^a, 15^a, 20^a and 25^a hour. The results had demonstrated that the bigger the time of physical contact of nematode with fungi, the greater the ratio of destruction of the larvae by fungal hyphas, which had completely invaded the body of nematodes in 25^a hour. Already at the first moments of physical contact between both, it was observed that the presence of the larvae with its sigmoid movements, its excrements, amongst other factors, had made the fungi build traps in form of buttons and adhesive nets, constricting rings and non-constricting, in order to capture trichostrongilid nematodes. In all the moments of observation of the kinetic of the capture, 5^a interaction hour was crucial for the larvae, therefore the traps of *D. flagrans* had injured external cuticle of nematode, occurring a deattachment of its body. This structure of nematode is essential in such a way for the infection in the animal, as for its survival in the environment, therefore, it admits that, from this moment, exactly the alive and active larvae remained in the schedules of subsequent observation, in the 5^a hour, the larvae lost its infecting power. In 15^a interaction hour, was observed that although the great invasivity of fungal hyphas on the body of nematode, the larvae still remained alive, with active movements, however at least, without viability of continuity of its evolutive cycle. Therefore, even so the results of the hours when they had occurred the total destruction of nematode for fungi are of extreme relevance for the knowledge of the moments of penetration of hyphas in the body of nematode, conclude that they are not necessary e times of interaction so that the larvae loses its viability, showing evidences of the great capacity of *D. flagrans* as predator of nematodes.

Key - Words: Interaction moments. Nematodes. Traps.

5.1 INTRODUÇÃO

As estruturas de predação dos fungos nematófagos são importantes dados a serem constituídos e catalogados, pois reflete na prática o que ocorre natural e fisiologicamente no bolo fecal dos animais. Segundo COOKE; GODFREY (1964), FAEDO *et al.* (2002), o solo é um excelente ambiente à proliferação de fungos nematófagos, e onde houver matéria orgânica em devida proporção, a probabilidade é ainda maior de ocorrer essa proliferação. Portanto, as fezes constituem um meio rico para a germinação fúngica.

As espécies de fungos nematófagos predadores variam em sua capacidade de capturar nematóides (GRØNVOLD *et al.*, 1996). Produzem armadilhas ao longo de suas hifas, embora muitos desses fungos não as produzam em cultura pura. A diferenciação das hifas podem ocorrer em 24 horas e numerosas estruturas de captura podem ser produzidas (PRAMER, 1964). A formação de armadilhas era atribuída apenas às hifas, mas recentemente, DACKMAN e NORDBRING-HERTZ (1992), relataram que a formação de armadilhas também pode ser atribuída aos esporos. A formação dessas redes estruturais ocorre em resposta à presença de nematóides ou de substâncias deles derivadas e também em condições adversas de cultivo, como escassez de água e/ou nutrientes (BALAN; GERBER, 1972). No ambiente, onde predominam condições estressantes para o desenvolvimento fúngico, a habilidade em predação nematóides os propiciam vantagens adicionais de sobrevivência. Algumas espécies de fungos nematófagos, desenvolvem essas estruturas de captura como resultado à estímulos externos, como citados pelos autores BALAN e GERBER, (1972). Outras, apenas as desenvolvem espontaneamente, sendo as mais dependentes de nematóides como fonte de nutrientes (MOTA *et al.*, 2003). Essas estruturas predatórias do fungo são responsáveis pela sua atividade nematocida.

Portanto, informações ilustrativas que elucidem o que ocorre no percurso de uma pesquisa, são de extrema importância para o entendimento final do trabalho.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para permitir a interação do fungo nematófago *D. flagrans* com larvas infectantes de *H. contortus*, nematóides gastrintestinais de ovinos em placas de Petri contendo o meio ágar-água 2% foram cultivadas, sendo posteriormente fixadas em glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4%, cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,2.

O monitoramento das interações ocorreu durante 1, 3, 4, 5, 10, 15, 20 e 25 horas, com microscópio óptico sob aumento de 40x e registro fotográfico.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos resultados morfológicos do nematóide *H. contortus* após adição do fungo nematófago *D. flagrans*, estes foram proporcionais ao tempo de interação entre ambos.

A Figura 5.1 é representada pela presença de esporos de *D. flagrans* na placa de petri, enquanto que a figura 5.2 demonstra a presença de armadilhas adesivas tridimensionais em resposta à presença de *D. flagrans*. Com apenas uma hora de interação do fungo, foram observados anéis constritores no nematóide (Figura 5.3), o mesmo ocorrendo com três horas de interação com maior número de redes adesivas ao longo do nematóide (Figura 5.4). Na quarta hora de interação (Figura 5.5), o nematóide ainda encontrava-se com movimentos sigmóides vigorosos apesar da presença das redes adesivas. Com 5 horas de interação, houve um descolamento parcial da cutícula da porção anterior da larva infectante (Figura 5.6). Mesmo esta estando viva e mantendo suas estruturas intactas internas, a dificuldade da sua sobrevivência no ambiente, torna-se completamente comprometida pela perda de parte de sua proteção, diminuindo em grandes proporções as chances de infectar um animal. Com 10 horas de interação entre fungo e nematóide, este ainda encontra-se vivo (Figura 5.7). Entretanto, com 15 horas de interação (Figura 5.8), a região de penetração demonstrou alteração das células de *H. contortus*. A hifa penetrou a cutícula do nematóide na região anterior de seu corpo demonstrando aparência amorfa, embora a região posterior ainda permanecesse intacta. Já com 20 horas de interação, houve completa ocupação das hifas pelo corpo do nematóide

(Figura 5.9). Na vigésima quinta hora, o mesmo encontrava-se completamente destruído, estando suas estruturas amorfas, sem potencial infectivo (Figura 5.10).

NANSEN *et al.* (1986), compararam a atividade predatória do isolado *Arthrobotrys oligospora* sobre larvas infectantes do trichostrongilídeo *Cooperia oncophora* (L₃) e de nematóides de vida livre *Rhabditis wohlgemuthi* e *Panagrellus redivivus*. As larvas de *Cooperia* permaneceram ativas por até 20 horas após serem capturadas nas armadilhas, enquanto os nematóides de vida livre foram rapidamente invadidos e destruídos pelo fungo. Esse fato é devido as larvas infectantes possuírem dupla cutícula remanentes da muda anterior.

O ponto chave para o discernimento de quando o nematóide não está mais viável para infectar os animais, não é o momento em que as hifas do fungo invadem seu corpo e este encontra-se sem mobilidade, mas sim, o momento em que o nematóide sofre alguma alteração morfológica direta. A cutícula externa, responsável pela manutenção da viabilidade do nematóide, caso injuriada, prejudicaria não somente sua sobrevivência no ambiente como também sua infecção no hospedeiro.



FIGURA 5.1- ESPOROS DE *Duddingtonia flagrans* IDENTIFICADOS POR SETAS

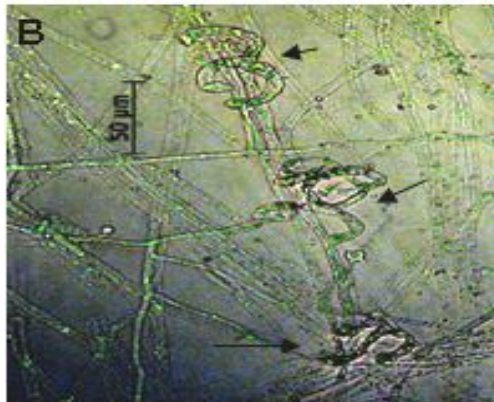


FIGURA 5.2 – ARMADILHAS ADESIVAS (SETAS) DE *Duddingtonia flagrans* EM RESPOSTA À PRESENÇA DE NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE OVINOS

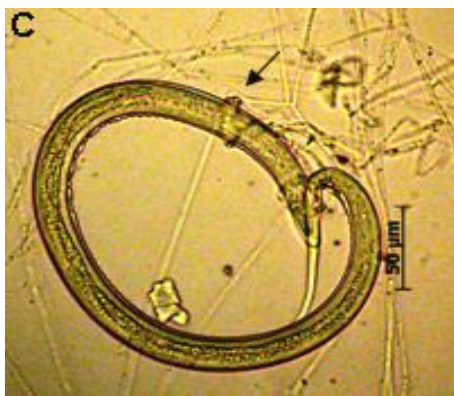


FIGURA 5.3 - 1 HORA*

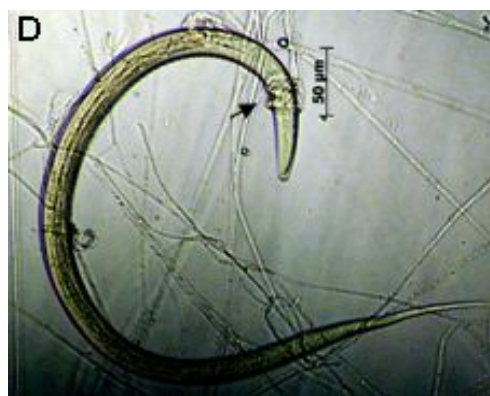


FIGURA 5.4 - 3 HORAS*



FIGURA 5.5 - 4 HORAS*



FIGURA 5.6 - 5 HORAS*

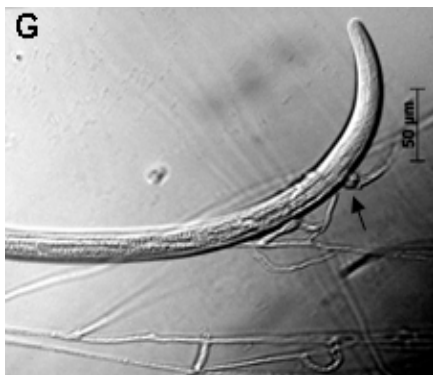


FIGURA 5.7 - 10 HORAS*



FIGURA 5.8 - 15 HORAS*



FIGURA 5.9 - 20 HORAS*



FIGURA 5.10 - 25 HORAS*

* :Tempo de contato físico do nematóide *Haemonchus contortus* aderido à superfície do fungo *D. flagrans* por meio de substâncias fibrilares adesivas.

Setas: Indicam as constrições realizadas por *D. flagrans* em presença do nematóide.
Figuras: aumento 40x.

5.4 CONCLUSÕES

- O fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* demonstrou ser efetivo no controle de larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos, sendo comprovado pelas imagens obtidas;

- *Haemonchus contortus*, nematóide de maior patogenicidade em pequenos ruminantes, foi completamente destruído pelo referente fungo, sendo portanto, aprovado seu uso como controlador biológico.

REFERÊNCIAS

- BALAN, J.; GERBER, N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactyloides*. **Nematologica**, v. 18, p. 163-173, 1972.
- COOKE, R. C.; GODFREY, B. E. S. A key of nematode of nematode destroying fungi. **Transactions British Mycological Society**, Cambridge, v. 47, p. 61-74, 1964.
- DACKMAN, C.; NORDBRING-HERTZ, B. Conidial traps -a new survival structure of nematode trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*, **Mycological Research**, v. 96, p.194-198, 1992.
- FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S. O.; YEATES, G. W.; HOGLUND, J.; WALLER, P. J. Growth of the fungus *Duddintognia flagrans* in soil surrounding faeces deposited by cattle or sheep fed the fungus as a means of controlling the free-living stages of nematode parasite. **Biological Control**, Orlando, v. 23, p. 64-70, 2002.
- GRØNVOLD, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; BRESCIANI, J.; RAWAT, H.; FRIBERT, L. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, London, v. 70, p. 291-297, 1996.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.
- NANSEN, P.; GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; WOLSTRUP, J. Predacious activity of the nematode-destroying fungus, *Arthrobotrys oligospora*, on preparasitic larvae of *Cooperia oncophora* and on soil nematode. **Proceedings of the helminthological Society of Washington**, v. 53, n. 2, p. 237-243, 1986.
- PRAMER, D. Nematode trapping fungi. **Science**, v. 144, p. 382-388, 1964.

6 EFICÁCIA DO ISOLADO *Duddingtonia flagrans* SOBRE LARVAS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE OVINOS NO MEIO AMBIENTE

RESUMO

A diminuição de larvas infectantes na pastagem a níveis seguros aos animais é de extrema importância para reduzir o grau de infecção e possibilitar a manutenção da produção. Portanto, o presente trabalho objetivou analisar a eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* sobre larvas gastrintestinais no meio ambiente, obtidas de fezes de ovinos naturalmente infectados e semeadas em pastagens naturais. Foram administrados clamidósporos fúngico em associação com grãos de milho para 8 animais, sendo a dosagem correspondente ao peso vivo, em quatro concentrações distintas: 350.000 clamidósporos/kg/PV, 700.000 clamidósporos/kg/PV, 1.000.000 clamidósporos/kg/PV, e grupo controle, que só recebeu milho. Os animais (n=2) foram sorteados aleatoriamente para obtenção de ovos de helmintos. As fezes dos animais foram recuperadas por meio de bolsas coletoras e misturadas de acordo com seu grupo, sendo posteriormente semeado um quilograma de fezes para cada área de 1m², perfazendo um total de 12 áreas (4 tratamentos x 3 repetições). Após 14 dias, foram colhidas duas amostras (A1 e A2) de pastagens de uma área de 15 cm² e a cada dois dias, até o dia 24 pós-tratamento. A amostra A1 foi processada pela Técnica de Baermann para recuperação das larvas, enquanto A2 foi enviada para estufa de secagem, a 65°C, durante 72 horas, para determinação da matéria seca. Os dados obtidos foram transformados em número de larvas por quilograma de matéria seca (n/kg/MS/grupo). Nos resultados obtidos, não houve variação significativa nas diferentes doses e períodos do experimento. Devido a grande variação climática em que a pesquisa foi realizada, não se pode atestar a ação nematocida de *Duddingtonia flagrans* no meio ambiente contra larvas de helmintos em ovinos. Trabalhos futuros devem determinar a viabilidade de *D. flagrans* em diferentes estações climáticas.

Palavras-chave: *Duddingtonia flagrans*. Nematóides gastrintestinais. Ovinos.

ABSTRACT

The reduction of infective larvae in the pasture into safe levels to the animals is of extreme importance for to reduce the infection degree and to enable the maintenance of the production. Therefore, the present work objectified to analyze the effectiveness of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on gastrointestinal larvae in the environment, obtained from feces of naturally infected sheep and sown in natural pastures. Fungal chlamyospores were administered in association with maize grains to 8 animals, being the dosage correspondent to the BW (bodyweight), in four distinct concentrations: 350.000 chlamyospores/kg/BW, 700.000 chlamyospores/kg/BW, 1.000.000 chlamyospores/kg/BW, and control group, that received only maize. The animals (n=2) had been drafted randomly for acquisition of helminths' eggs. The feces of the animals had been recouped by means of collecting bags and mixed in accordance to its group, being then sown as one kilogram of excrements for each area of 1m², to make up a total of 12 areas (4 treatments x 3 repetitions). After 14 days, two samples (A1 and A2) of pastures of an area of 15 cm² e to each two days, until day 24 post-cure. The A1 sample was processed for the Technique of Baermann for recovery of the larvae, while A2 was sent for drying greenhouse, 65°C, during 72 hours, for determination of the dry substance. The gotten data had been transformed into number of larvae for kilogram of dry substance (n/kg/MS/group). In the gotten results, it did not have significant variation in the different doses and periods of the experiment. Had the great climatic variation where the research was carried through, if it cannot certify the nematocid action of *Duddingtonia flagrans* in the environment against larvae of helminths in sheep. Future works must determine the viability of *D. flagrans* in different climatic seasons.

Key- words: *Duddingtonia flagrans*. Gastrointestinal nematodes. Sheep.

6.1 INTRODUÇÃO

O Paraná se destaca pela produção destinada à carne, com um sistema de criação intensivo ou semi-intensivo (SOCCOL *et al.*, 1999). Segundo a FAO (2004), embora tenha havido redução do número total de ovinos no Brasil entre o período de 1994 e 2003, SOCCOL *et al.* (1999), constataram que no Paraná a espécie ovina apresentou o maior crescimento entre os animais explorados zootecnicamente.

AMARANTE (2004) ressalta que na prática, 100% dos ruminantes domésticos são portadores de pelo menos uma espécie de endoparasitose. Entretanto, a infecção por nematóides gastrintestinais adquirida pelos animais assim como a probabilidade do nematóide infectá-los são dependentes de muitos fatores. Segundo WALLER (2005), o número de espécies de larvas em que os animais são expostos e a quantidade que se estabelecem em seu trato gastrintestinal, são determinantes para que haja determinado grau de infecção. Ainda há fatores que muitas vezes se interrelacionam. Estes incluem os efeitos diretos e indiretos de condições climáticas que podem influenciar a taxa de contaminação da pastagem, infecções prévias, comportamento de pastejo dos animais, além do seu estado fisiológico.

Os nematóides de ruminantes, durante a fase de vida livre, sofrem uma série de eventos para terem condições de parasitar o animal, como clima, tipo de vegetação, manejo, estratégias de tratamentos, além de fatores ligados aos animais como idade, estado nutricional e resistência inata ou adquirida (LEVINE, 1963). BRAGA (1986) corrobora e ainda ressalta que o índice pluviométrico é o principal fator pelo aumento das infecções parasitárias, pois o déficit hídrico, assim como seu excesso, prejudica significativamente o desenvolvimento de larvas infectantes no pasto, na medida em que o processo de translação, que é a taxa de contaminação dos animais com parasitas infectantes (L₃), apresenta variações decorrentes do clima.

Diante das condições exigidas para o estabelecimento do parasitismo gastrintestinal, os resultados de estudos com fungos nematófagos têm demonstrado uma boa alternativa para diminuir o grau de infestação das fases de vida livre de nematodioses de pequenos ruminantes (LARSEN, 1999).

O crescimento rápido do fungo assim como a produção de seu micélio, são importantes fatores para a disseminação e sobrevivência do mesmo em condições

ambientais, embora o crescimento micelial fúngico não esteja relacionado com a capacidade de um isolado em predação de nematóides (DACKMAN *et al.*, 1987).

Diante da tentativa de implementação do fungo nematófago *D. flagrans*, o objetivo deste trabalho foi analisar a sobrevivência e a eficácia do fungo no meio ambiente da região metropolitana de Curitiba contra parasitas de pequenos ruminantes.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Local de execução

O experimento foi realizado nos meses de setembro e outubro de 2008, no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, localizada no município de Curitiba, situado na latitude 25°24' S, longitude 49°16' W e altitude de 934 m. O clima da região, segundo a classificação de Köppen (Cfb), corresponde a um clima subtropical super úmido, com verão fresco, e geadas frequentes (média de 5 geadas/ano). A temperatura média anual é de 16,5 °C, com média do mês mais quente e mais frio de 20,1 e 12,0 °C, respectivamente. O mês mais chuvoso é janeiro e o menos, agosto.

Os subsídios para a realização desse trabalho como dados de precipitação pluviométrica, temperaturas máxima e mínima, assim como umidade relativa do ar, foram coletados na estação meteorológica do município de Curitiba de acordo com o SIMEPAR, e comparados com os dados de OPG, coproculturas e larvas recuperadas na pastagem, para cada tratamento durante todo o período experimental.

6.2.2 Dose fúngica administrada aos animais

Foram utilizados quatro tratamentos: 350.000, 700.000, 1.000.000 de clamidósporos/kg/PV e grupo controle. A metodologia para administração oral nos animais desses tratamentos foi a seguinte: O grupo I recebeu a dosagem fúngica de

350 mil clamidósporos por quilograma de peso vivo, ao qual correspondeu a 0,18 gramas do substrato fúngico. O grupo II recebeu a dosagem de 700.000 clamidósporos, correspondente a 0,36 gramas do substrato, o grupo III, recebeu 1.000.000 de clamidósporos, referente à 0,52 gramas, e o grupo IV, grupo controle, onde não foi administrado fungo, somente o substrato milho.

A dose foi dependente do peso individual dos animais (n=2/grupo), aos quais foram sorteados aleatoriamente (Tabela 6.1).

TABELA 6.1 – QUANTIDADE DE CLAMIDÓSPOROS de *Duddingtonia flagrans* ADMINISTRADOS AOS OVINOS, DE ACORDO COM SEU PESO VIVO E SEU GRUPO EXPERIMENTAL

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Peso (Kg):	24,0	20,0	25	47
Substr. Fung (g):	4,32	7,2	13	*16,6
Peso (Kg):	47,5	49,5	50	59,5
Substr. Fung (g):	8,55	17,82	23	* 21

*substrato milho

Previamente ao experimento, o exame de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizado obtendo-se o valor de 157,5.

A alimentação dos animais consistia em silagem, concentrado de milho além da pastagem, e dispunham de água *ad libitum*, também não receberam tratamentos antiparasitários, todavia, estes foram avaliados clinicamente para o Método Famacha (MOLENTO *et al.*, 2004), condição corporal e tratados somente entre os intervalos dos experimentos, dois meses anteriores aos eventos, com Moxidectina 0,2% (Cydectin[®], Fort Dodge) 1 mL para cada 10 quilogramas de peso corporal.

6.2.3 Metodologia de contaminação da pastagem

Foi semeado 12 Kg de fezes dos quatro grupos de animais (3kg fezes/grupo) em 12 áreas de 1m², (1Kg/grupo/área), em pastagem nativa com predomínio de Tifton-85 (*Cynodon* spp.), Azevém (*Lolium multiflorum*), Capim-Elefante (*Pennisetum* sp.), Trevo-Branco (*Trifolium repens*) e Aveia (*Avena sativa*). Duas semanas após a deposição dos bolos fecais, amostras aleatórias de todas as áreas foram coletadas

às 6 horas da manhã (período de maior umidade e probabilidade de recuperação de larvas), por meio de cortes rasteiros da pastagem de uma sub-área de 15 cm², escolhidas aleatoriamente (Figura 6.1). As amostras foram acondicionadas em sacos de tecido, de modo que as fibras se dispusessem horizontalmente, organizadas e espaçadas, sendo posteriormente suspensas em baldes plásticos, contendo água à 42°C, segundo a técnica de Baermann (CORT *et al.*, 1922), onde ficaram sedimentando por 24 horas, com o propósito das larvas presentes migrarem desse material por termohidrotropismo para o fundo do balde. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ficou por mais 4 horas em copos de Hoffman. Após esse período, o material foi conservado em álcool 70% para identificação e quantificação do número de larvas (MOLENTO, 2001).

Juntamente a esse procedimento, amostras das pastagens de cada área foram coletadas, com igual metodologia, e colocadas em estufa de secagem, a 65°C, durante 72 horas, para determinação da matéria seca. Os dados das contagens foram transformados em número de larvas por quilograma de matéria seca (n/kg/MS/grupo) (MOLENTO; SANTOS, 2008 – LDP; Planilha ainda não publicada).

A viabilidade do fungo foi avaliada, comparando a contagem de larvas infectantes em cada área em intervalos de dois dias, durante 10 dias.



FIGURA 6.1 – CORTE DA PASTAGEM EM SUB-ÁREA DE 15 cm² PARA OBTENÇÃO DE LARVAS E QUANTIFICAÇÃO DE MATÉRIA SECA

6.2.4 Análise Estatística

Para os dados de pastagem foi aplicada Análise de Variância para medidas repetidas, considerando os cinco dias de colheita. Para os cinco períodos de tempo a normalidade foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valor do exame de OPG foi significativamente baixo se comparado às pesquisas anteriores. Uma das hipóteses para esse evento, pode estar relacionada ao fenômeno imunológico de auto-cura dos animais (TAYLOR *et al.*, 2007). Segundo os mesmos autores, em regiões endêmicas de hemoncose, frequentemente após um período de chuvas intensas que sutilmente aparecem seus valores baixos devido os dados de colheita terem sido diários e não mensais (Gráfico 6.1), as contagens de ovos de vermes nas fezes de ovinos caem para níveis próximos a zero, em virtude da eliminação da maior parte da carga de vermes adultos.

Entretanto, não pode ser descartado um período de seca que precedeu o experimento que pôde ter contribuído para os baixos valores de OPG dos animais, como segunda hipótese. Segundo URQUHART *et al.* (1998), a seca diminui a probabilidade de eclosão das larvas em desenvolvimento até larvas infectantes, diminuindo portanto, a infecção dos animais. ROBERTS *et al.* (1952), relataram que o índice regular de precipitação pluvial é extremamente necessário para a migração de larvas para a pastagem. Já WILLIAMS e MAYEW (1967), demonstraram que limites de 50 mm³ são requeridos para eclosão das larvas e desenvolvimento das mesmas nos pastos, fatos esses não podendo ser descartados ao analisar o baixo exame de OPG dos animais.

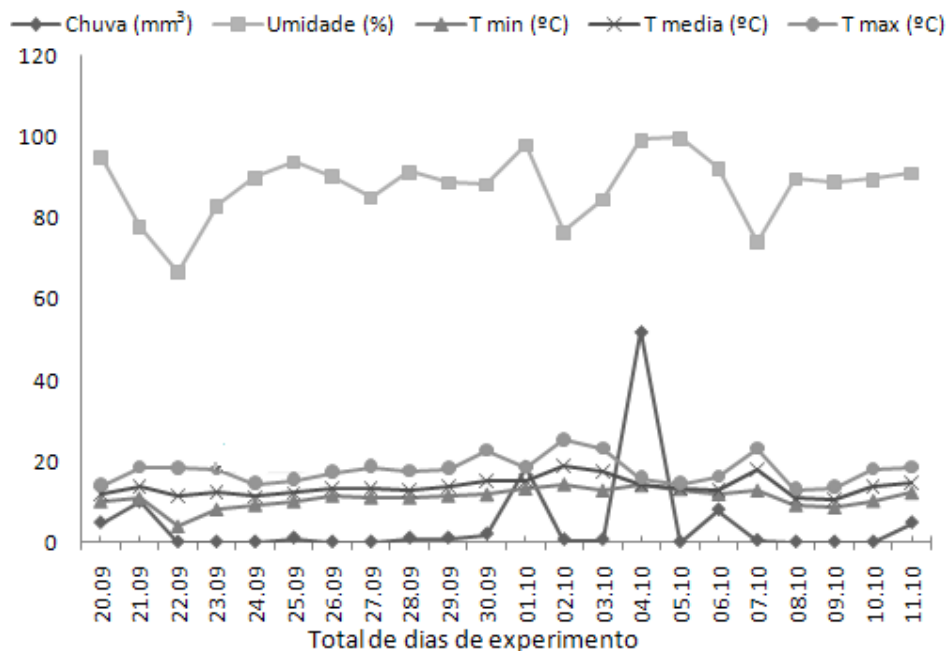


GRÁFICO 6.1 – CONDIÇÕES CLIMÁTICAS DURANTE TODO O PERÍODO EXPERIMENTAL

A Tabela 6.2, demonstra a contagem de L3/kg/MS, no decorrer dos dias por tratamento. A primeira colheita de pasto correspondeu ao dia zero do experimento. A pastagem estava isenta de fezes, porém com alta contaminação por helmintos. Entretanto, a análise estatística não determinou uma tendência estabelecida, mostrando que com o mesmo tratamento fúngico, a contagem de larvas apresentou grande variabilidade, sem comportamento definido.

Diante das análises obtidas, a maior diferença, embora não significativa, foi no número de larvas apenas na 3ª colheita (dia 16 – Gráfico 2), com p-valor=0,06 (análise por Kruskal-Wallis).

Nas demais avaliações, por uma análise não paramétrica dos dados e comparando a variação da média de larvas em cada tratamento, não houve diferença significativa.

Uma das hipóteses de não ter havido diferenças, pode estar relacionada a colheita de fezes não ter abrangido todo o período de eliminação do fungo. Em caprinos, ARAÚJO *et al.* (2006), demonstraram a passagem do fungo pelo trato gastrointestinal e sua saída nas fezes em horários bem variados e muitas vezes de forma lenta, 14, 20 e 46 após administração fúngica. Em experimentos com terneiros, ARAÚJO *et al.* (2000), isolaram fungos nas fezes desses animais no

período entre 18 e 72 horas, principalmente na 18ª hora. Embora o presente experimento tenha sido com ovinos, existe a probabilidade de que no período que essas colheitas foram realizadas, não tenha coincidido com o período ótimo de eliminação do fungo. Portanto, não pôde-se afirmar que nos horários de colheita não tenha havido eliminação de clamidósporos nas fezes dos animais.

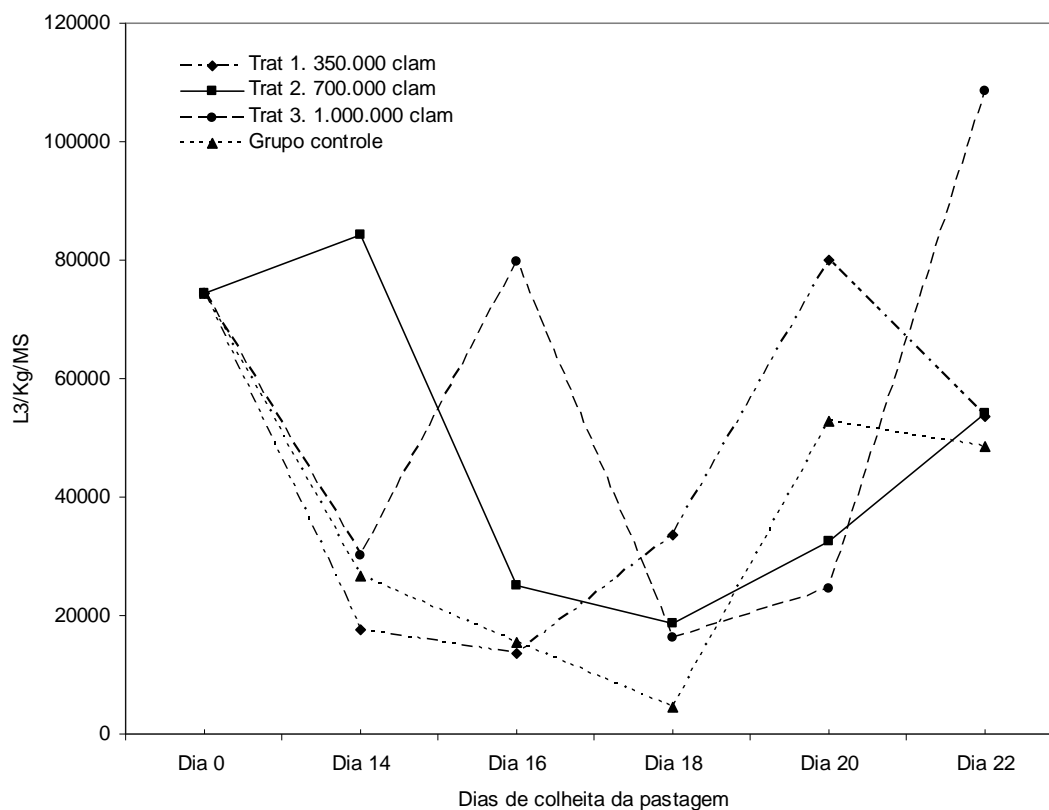


GRÁFICO 6.2 – MÉDIA DE LARVAS INFECTANTES POR QUILOGRAMA DE MATÉRIA SECA, RECUPERADAS NA PASTAGEM INOCULADA COM *D. flagrans*.

Em relação ao fator tratamento, a Tabela 6.2 demonstra que não existiu diferença estatisticamente significativa. Portanto, a menor dosagem que foi de 350.000 clamidósporos não diferiu da maior dosagem, 1.000.000 de clamidósporos. A média entre os tratamentos foi estatisticamente igual, considerando todos os períodos de colheita. A análise de variância mostra que o p-valor da comparação do contraste foi de 0,549, confirmando a equivalência entre os tratamentos em relação às larvas recuperadas.

TABELA 6.2 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA COMPARANDO OS QUATRO TRATAMENTOS

Fonte	Soma de Quadrados	GI	Quadrado Médio	F	p-valor
Intercepto	1,916E10	1	1,916E10	49,500	<0,001
Tratamento	8,877E8	3	2,959E8	0,764	0,549
Erro	2,710E9	7	3,871E8		

Os dados da Tabela 6.3 demonstram que não houve diferença estatisticamente significativa para o tempo, podendo-se considerar as médias de L3/kg/MS iguais em todos os períodos. O teste apresenta p-valor de 0,241, não significativo. Da mesma forma, não houve interação entre tempo e temperatura, definindo que o padrão de variação não mudou ao longo do tempo, sendo p-valor encontrado de 0,398.

TABELA 6.3 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA COMPARANDO O FATOR DIAS (TEMPO) E DIAS*TRATAMENTO

Fonte	Soma de Quadrados	GI	Quadrado Médio	F	p-valor
Dias	1,100E10	4	2,750E9	1,460	0,241
Dias*Tratamento	2,485E10	12	2,070E9	1,100	0,398

O número de larvas encontrado nas pastagens foi demasiadamente alto (Tabela 4 – dia 0), o que não era esperado, com exceção do grupo IV–controle, pois o OPG de todos os animais foi estimado como o menor de todas as experimentações e as colheitas dessas pastagens foram realizadas após a deposição dos bolos fecais dos animais. Todavia, a contagem de larvas do dia zero, demonstrou contaminação do pasto, apesar do descanso em que este se encontrava anterior ao experimento. SOUZA *et al.* (2000) determinaram o período necessário de descanso da pastagem para ocorrer descontaminação por larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos em campos naturais: de 42 a 56 dias na primavera e de 70 a 84 dias no verão. Já GONÇALVES e VIEIRA (1963), no Rio Grande do Sul, realizaram estudos com larvas no pasto utilizando ovinos traçadores e concluíram que durante o verão a pastagem se desinfesta totalmente ao final de dois meses, com temperatura alta (+ 25°C) e umidade relativa do ar em torno de 60%. Já no inverno, larvas de *Trichostrongylus axei* e *Ostertagia circumcincta* ainda sobreviveram com o descanso da pastagem por quatro meses. Entretanto, DONALD *et al.* (1978), demonstraram que larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos

podem sobreviver nas pastagens por seis meses ou mais, sendo que o período preciso depende muito das condições climáticas.

Devido a essa amplitude de variações climáticas, a grande variação na contagem de larvas no decorrer dos dias, certamente teve como fator principal o excesso de pluviosidade do período (Gráfico 6.1), que além de ter aumentado a contaminação da pastagem, facilitou a dissociação física do fungo ao bolo fecal, limitando sua ação. Essa dissociação do fungo com as larvas, também tem como consequência a pouca estimulação do fungo para formação de suas armadilhas (MOTA *et al.*, 2003). Contudo, o período de seca precedido ao experimento, não pode ser omitido e é notória e conclusiva a contaminação da pastagem antes do período da seca, pois nesse período, seria impossível a eclosão da alta quantidade de larvas presentes na pastagem.

A Tabela 6.4 relata a deficiência ao atestar a atividade do fungo nesse período experimental. O dia 14, no tratamento 1, este apesar de ser a menor concentração fúngica, foi obtido uma redução apreciável em relação ao número de larvas do grupo controle (tratamento 4). Entretanto, no mesmo dia 14, no tratamento 2, em que a concentração fúngica é dose superior ao primeiro exemplo, esse total de larvas também foi superior, o que não deveria ter ocorrido e assim, sucessivamente, para poder atestar a eficácia do fungo. As percentagens também deveriam ser reduzidas ao longo das colheitas, para análise do limite de tempo de eficiência do fungo, embora isso não ocorreu, e sim, valores muito dispersos ao longo do experimento. Aliado a isso, a instabilidade de valores brutos do total de larvas em relação aos tratamentos e aos dias de colheita, fizeram com que fosse difícil atestar com precisão a eficácia do fungo na pastagem.

TABELA 6.4 – PERCENTUAL DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES NA PASTAGEM POR QUILOGRAMA DE MATÉRIA SECA EM RELAÇÃO AO PRIMEIRO DIA DE COLHEITA (DIA ZERO), E SUCESSIVAMENTE, AO DIA ANTERIOR, ATÉ A ÚLTIMA COLHEITA

	<u>Tratamentos</u> 1 – 350.000 clam. 2- 700.000 clam. 3 – 1.000.000 clam. 4 – controle	<u>Total de Larvas</u>	<u>Percentagem(%): dia Zero</u>	<u>Percentagem (%): colheita anterior</u>
Dia zero	-	74.391,98	-	-
Dia 14	1	17.474,7	23,49	-
	2	84.313,73	113,34	-
	3	30.176,77	40,56	-
	4	26.631,19	35,80	-
Dia 16	1	13.692,2	18,41	78,35
	2	25.108,23	33,75	29,78
	3	79.682,54	107,11	264,05
	4	15.343,92	20,63	57,62
Dia 18	1	33.557,89	45,11	245,09
	2	18.650,79	25,07	74,28
	3	16.161,62	21,72	20,28
	4	4.444,444	5,97	28,97
Dia 20	1	80.017,92	107,56	238,45
	2	32.592,59	43,81	174,75
	3	24.470,9	32,89	151,41
	4	52.909,15	71,12	1190,46
Dia 22	1	53.580,25	72,02	66,96
	2	54.141,41	72,78	166,12
	3	10.8552,2	145,92	443,60
	4	48.498,05	65,19	91,66

6.4 CONCLUSÕES

- Os resultados demonstraram que não houve variação significativa nas diferentes doses e períodos do experimento, sendo assim, não sendo possível confirmar a eficácia do fungo *D. flagrans* nesta etapa;

- Entretanto, nesse estudo, também foi impossível afirmar sua ineficiência na cidade de Curitiba, pois o mesmo foi avaliado em apenas um período de uma estação do ano dessa cidade, sendo necessária avaliações do ano inteiro. As possibilidades desse controle biológico atuar satisfatoriamente na cidade de Curitiba, são bastantes promissoras, na medida em que o local permite condições para a

sobrevivência e atividade do fungo, mesmo este não tendo sido isolado em condições ambientais como dessa cidade.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose gastrointestinal no sistema de produção de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ESPECIALIDADES EM MEDICINA VETERINÁRIA, 1, 2004, Paraná, **Anais...** 2004.
- ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A.; SAMPAIO, W. M. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium aginate formulation of *Arthrobotrys robusta*, a nematode-trapping fungus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, p. 55-59, 2000.
- ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 3, p. 359-364, 2006.
- BRAGA, R. M. Sobrevivência de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de bovinos, sob condições naturais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 186-188, 1986.
- CORT, W. W.; ACKERT, J. E.; AUGUSTINE, D. L.; PAYNE, F. K. Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. **American Journal of Hygiene**, v. 2, n. 1, p. 1-16, 1922.
- DACKMAN, C.; OLSSON S., JANSSON, H. B.; LUNDGREN, B.; NORDBRINGHERTZ, B. Quantification of predatory and endoparasitic nematophagous fungi and their activities in soil. **Microbial Ecology**, New York, v. 13, p. 89-93, 1987.
- DONALD, A. D.; MORLEY, F. H. W.; WALLER, P. J.; AXELSEN, A.; DONNELLY, J. R. Availability to of gastrointestinal nematode infection arising from summer contamination of pastures. **Australian Journal of Agricultural Research**, Brunswick, v. 29, p. 189-204, 1978.
- FAO, 2003. Organization de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación. Disponível em: <<http://faostat.org>>2004. > Acesso em: 10/06/2004.
- GONÇALVES, P. C.; VIEIRA, J. M. S. Primeira contribuição a sobrevivência de ovos e larvas de nematódeos de ovinos na pastagem, no Rio Grande do Sul. **Revista da Faculdade Agronomia e Veterinária**, Porto Alegre, v. 2, p. 95-103, 1963.

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

LEVINE, N. D. Weather, climate and bionomics of ruminant nematode larvae. **Advances in Veterinary Science**, New York, v. 8, p. 215-261, 1963.

MOLENTO, M. B. Técnica de contagem de larvas no pasto como ferramenta para diagnóstico parasitológico. In: I Conferência Virtual da Rede de Helminologia para América Latina e Caribe., 2001, Buenos Aires, 2001.

MOLENTO, M. B.; TASCA, C.; GALLO, A.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA, E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 1139-1145, 2004.

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

ROBERTS, F. H. S.; O' SULLIVAN.; P. J.; RIEK R. F. The epidemiology of parasitic gastro-enteritis of cattle. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 3, p.187-226, 1952.

SOUZA, A. P.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; RAMOS, C. I. Período para desinfestação das pastagens por larvas de nematóides gastrintestinais de ovinos, em condições naturais nos campos de Lages, SC. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 9, p.159-164, 2000.

SOCCOL, V. T. (Coord.). **Verminose Ovina: Aspectos Epidemiológicos Resistência aos Anti-helmínticos e Marcadores para a Seleção de Animais Resistentes**. Curitiba: UFPR -1999. (EMBRAPA. Tema III: tecnificação em produção animal). Anteprojeto. Disponível em:<
<http://www.cnpsa.embrapa.br/cnpq/psgpa/004.html>>. Acesso em: 23/02/2005.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L. WALL, R. L. Parasites of sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, third edition, p. 152-165, 2007.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 292, 1998.

WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant

livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 126, p. 277-289, 2005.

WILLIAMS, J.C.; MAYHEW, R.L. Survival of infective larvae of the cattle nematodes, *Cooperia punctata*, *Trichostrongylus axei* and *Oesophagostomum radiatum*. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 28, p. 629-640, 1967.

CONCLUSÕES GERAIS

- Nas pesquisas *in vitro* e *in vivo*, foram obtidas um coeficiente de correlação negativa entre a dose fúngica e quantidade de larvas, comprovando a eficiência nematófaga de *D. flagrans*;

- Embora tenha demonstrado ser suficiente o número de unidades experimentais para comprovação da eficácia nematocida do fungo, um “n” maior de animais, poderia ter-se obtidos resultados que fossem não somente numérica, mas também estatisticamente significativos;

- Todas as pesquisas científicas são realizadas somente com animais machos devido a conformação anatômica que não permite, ou pelo menos limita, o contato de fezes/urina. Nessa pesquisa, foram utilizadas estritamente ovinos fêmeas, e os resultados obtidos em relação à predação de larvas pelo fungo, foram semelhantes ou superiores aos trabalhos realizados somente com machos;

- Esse fator se torna interessante quando se deseja implementar quaisquer que sejam os métodos pesquisados, pois não somente machos usufruirão dos produtos testados. Portanto, esse trabalho, foi um marco inicial para comprovação de que certamente a urina, assim como outros fatores interferirão nos experimentos, mas é necessário testá-los para poder atestar a sua viabilidade.