

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉIA BUZATTI

AVALIAÇÃO DO USO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* NO CONTROLE DE  
ESTÁGIOS PRÉ-PARASITÁRIOS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE  
EQUINOS

CURITIBA  
2014

ANDRÉIA BUZATTI

AVALIAÇÃO DO USO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* NO CONTOLE DE ESTÁGIOS PRÉ-PARASITÁRIOS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Beltrão Molento

CURITIBA  
2014

**B992 Buzatti, Andréia**

**Avaliação do uso do fungo *Duddingtonia flagrans* no controle de estágios pré-parasitários de nematóides gastrintestinais de equinos. / Andréia Buzatti. – Curitiba : 2014  
97 f. il.**

**Orientador: Marcelo Beltrão Molento  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.  
Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias – Sanidade Animal e Medicina Veterinária  
Preventiva.**

**1. Parasitologia veterinária. 2. Equino - Parasito. 3. Fungos  
Nematófagos. I. Molento, Marcelo Beltrão. II. Universidade Federal  
do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias – Sanidade Animal e Medicina  
Veterinária Preventiva. III. Título**

**CDU 619.699**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**



**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"AVALIAÇÃO DO USO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* NO CONTROLE DE ESTÁGIOS PRÉ-PARASITÁRIOS DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS"** apresentada pela Mestranda **ANDRÉIA BUZATTI** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 5 de março de 2014

Professor Dr. Marcelo Beltrão Molento  
Presidente/Orientador

Professora Dra. Silvana Krychak Furtado  
Membro

Professor Dr. Ivan Deconto  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela saúde e por permitir a realização de mais um grande sonho e a conclusão de mais etapa de minha vida.

À minha mãe Niva, meu pai Ari e meu irmão Valmir por todo amor incondicional, pelo carinho, apoio e compreensão. Por respeitarem minhas escolhas, por acreditarem nos meus sonhos e por entenderem que muitas vezes a distância é necessária, mas que mesmo assim o amor prevalece. Vocês são tudo para mim, tenho muito orgulho de vocês!

À minha madrinha Cema e meu padrinho Albino, o qual mesmo ausente (*in memoriam*) jamais será esquecido. Vocês me ensinaram a amar e respeitar os animais desde criança, despertando em mim o sonho de ser Médica Veterinária.

Aos meus tios Kako e Diva, vocês são minha inspiração, exemplo de vida, de perseverança, força e fé. Sinto muito orgulho de vocês! Obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo apoio, pelo incentivo para sempre seguir em frente e por todo amor, carinho e atenção. Vocês são minha segunda família, como pais para mim, amo muito vocês.

Ao professor Dr. Marcelo Beltrão Molento, meu orientador. Agradeço, por ter aberto as portas para a realização de mais uma etapa da minha vida. Por todas as oportunidades oferecidas, por ter me aceitado como sua orientada de mestrado. Por seus ensinamentos, orientações, pela amizade e pela confiança. Por todos os exemplos de profissionalismo, dedicação e por sempre ter acreditado na minha capacidade. Pela oportunidade de continuar sob sua orientação na produção futura de meu doutorado. Muito obrigada!!

A todos os amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Obrigada pela amizade, companheirismo, pelos conhecimentos compartilhados e pelos bons momentos que passamos juntos.

Fernanda, Fernando, Lew, Úrsula, Angela, Jesséa e Jean, obrigada também por todo auxílio recebido, pelos conselhos, pelo carinho e por estarem ao meu lado sempre que precisei!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR e aos professores da pós-graduação, meu muito obrigado.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, Dorly, Luís e Benedito e da Pós-Graduação, Maria José Botelho Maeda pela dedicação, atenção e bom atendimento prestados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Dr. Clóvis de Paula Santos e a toda equipe do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro. Agradeço pelo apoio, pelas orientações e pela parceria no desenvolvimento do projeto.

Ao Haras São José da Serra, ao Joaquim Dias Antunes e a todos o seus colaboradores. Agradeço pela disponibilidade do local e dos animais e também pelo auxílio na realização do primeiro experimento.

Ao Regimento de Polícia Montada do Estado do Paraná pela disponibilidade do local e dos animais para realização do segundo experimento, por toda colaboração e também pela confiança recebida.

Ao Laboratório de Estatística Aplicada da UFPR, ao professor Dr. Paulo Ricardo Bittencour, professor Dr. Bruno Grimaldo Martinho e seus colaboradores. Agradeço por todo auxílio na análise estatística dos resultados.

Ao Instituto Tecnológico SIMEPAR pelo auxílio no fornecimento das variáveis meteorológicas correspondentes ao período experimental.

Aos funcionários do setor de manutenção da UFPR pelo auxílio na preparação da área usada para o estudo na pastagem.

Aos amigos Úrsula, Angela, Carol e Róger, vocês foram fundamentais, obrigada por todo auxílio e dedicação na execução do projeto.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização de mais um dos meus grandes sonhos.

Muito obrigada!

*“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”*

Theodore Roosevelt

*"Olhe no fundo dos olhos de um animal e, por um momento, troque de lugar com ele. A vida dele se tornará tão preciosa quanto a sua e você se tornará tão vulnerável quanto ele. Agora sorria, se você acredita que todos os animais merecem nosso respeito e nossa proteção, pois em determinado ponto eles são nós e nós somos eles."*

Phillip Ochoa

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – MÉDIA (+ ERRO PADRÃO) DA CONTAGEM DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DE EQUINOS APÓS INGESTÃO DE DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *DUDDINGTONIA FLAGRANS*.....47
- FIGURA 2 - MÉDIA (+ ERRO PADRÃO) DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans*.....49
- FIGURA 3 - EXEMPLO DE UMA DAS ÁREAS DE 1 m<sup>2</sup> USADA PARA DEPOSIÇÃO DAS FEZES DE EQUINOS NA PASTAGEM APÓS TRATAMENTO COM DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans*.....67
- FIGURA 4 - MÉDIA (+/- DESVIO PADRÃO) DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* DURANTE 21 DIAS.....69
- FIGURA 5 - MÉDIA DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES POR kg DE MATÉRIA SECA RECUPERADAS DA PASTAGEM APÓS DEPOSIÇÃO ARTIFICIAL DE FEZES DE EQUINOS TRATADOS COM DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans*.....72
- FIGURA 6 - MÉDIA DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES POR kg DE MATÉRIA SECA RECUPERADAS DE BOLOS FECALIS (artificialmente depositos na pastagem) DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS *Duddingtonia flagrans*.....73
- FIGURA 7 - MÉDIAS MENSIS DE TEMPERATURA (°C) MÁXIMA, MÉDIA E MÍNIMA; PRECIPITAÇÃO (mm) E UMIDADE RELATIVA DO AR CORRESPONDENTE AO PERÍODO DE FEVEREIRO – ABRIL DE 2013 PARA CURITIBA, PR, BRASIL.....75

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - COMPARAÇÃO DAS DIFERENÇAS MÍNIMAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMENTOS DENTRO DOS DIAS 8; 9; 10.....48
- TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS DIFERENÇAS MÍNIMAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMENTOS DENTRO DOS DIAS 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10.....50
- TABELA 3 - MÉDIA DO PERCENTUAL (%) DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* DURANTE 5 DIAS.....51
- TABELA 4 - MÉDIA DO PERCENTUAL (%) DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* durante 21 dias.....70

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

L1 – larvas de primeiro estágio

L2 – larvas de segundo estágio

L3 – larvas de terceiro estágio /larvas infectantes

OPG - contagem de ovos por grama de fezes

PSI - Puro Sangue Inglês

T1 – Tratamento 1

T2 – Tratamento 2

T3 – Tratamento 3

C – Grupo controle

PV - peso vivo animal

% - por cento

g – gramas

°C – graus Celsius

UR – Umidade relativa do ar

DMS - diferença mínima significativa

Kg – Quilograma

< - maior

> - menor

P – probabilidade

h - horas

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

G3 – grupo 3

DO – dia zero

D15 – dia 15

D30 – dia trinta

cm - centímetros

m - metros

MS – matéria seca

mm - milímetros

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 HIPÓTESE.....	11
1.2 OBJETIVOS GERAIS.....	11
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>2. USO DO FUNGO <i>Duddingtonia flagrans</i> NO CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS</b> .....	13
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
2.2 NEMATÓIDES GATRINTESTINAIS.....	16
2.3 PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS.....	17
2.4 CICLO BIOLÓGICO E EPIDEMIOLOGIA.....	18
2.5 CONTROLE.....	20
2.6 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA.....	21
2.7 MEDIDAS ALTERNATIVAS DE CONTROLE PARASITÁRIO.....	23
2.8 CONTROLE BIOLÓGICO DE PARASITAS.....	23
2.8.1 Fungos Nematófagos.....	24
2.8.2 <i>Duddingtonia flagrans</i> .....	27
2.10 CONCLUSÃO.....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32
<b>3. AÇÃO DO FUNGO <i>Duddingtonia flagrans</i> NA REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS: MODELO <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i></b> .....	41
3.1 INTRODUÇÃO.....	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.2.1 Isolado Fúngico.....	44
3.2.2 Experimento <i>in vivo</i> .....	45
3.2.3 Análises Laboratoriais.....	46
3.2.4 Análise Estatística.....	46
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.4 CONCLUSÃO.....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	56

<b>4. <i>Duddingtonia flagrans</i> NO CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS: AVALIAÇÃO A LONGO PRAZO E <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>59</b>
4.1 INTROUÇÃO.....	61
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.2.1 Isolado Fúngico.....	63
4.2.2 Experimento <i>in vivo</i> .....	64
4.2.3 Análises Laboratoriais.....	65
4.2.4 Avaliação da atividade de <i>Duddingtonia flagrans</i> no meio-ambiente....	65
4.2.5 Variáveis Climáticas.....	67
4.2.6 Análise Estatística.....	68
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.4 CONCLUSÃO.....	77
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>82</b>
<b>VITA.....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>86</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias ocupam lugar de destaque dentre os fatores que interferem no desenvolvimento pleno da produção animal. Principalmente as causadas por endoparasitas, as quais apresentam elevada prevalência e ampla distribuição geográfica (BARRET, FARLAM e PROUDMAN, 2004). Para cavalos, os sistemas de criação adotados, na maioria das vezes favorecem uma elevada incidência dessas parasitoses já nas primeiras semanas de vida (MOLENTO, 2005). Ocasionalmente imensos prejuízos econômicos e produtivos, como retardo no desenvolvimento, no crescimento e até morte dos animais. Além de promoverem elevados gastos com tratamento e controle (ARAÚJO *et al.*, 2006).

As consequências dessas parasitoses estão relacionadas, principalmente, ao número e espécies de formas infectantes a que o animal é exposto, assim como a quantidade de parasitas que se estabelecem em seu trato gastrointestinal. Entretanto, o grau de infecção adquirido pelos animais é dependente de uma série de fatores que muitas vezes se inter-relacionam, como por exemplo, infecções prévias, condição fisiológica dos animais, comportamento de pastejo e efeitos diretos e indiretos de condições climáticas que podem influenciar na taxa de contaminação da pastagem (WALLER e CHANDRAWATHANI, 2005).

O controle dessas parasitoses é fundamental, resultando em um melhor desempenho dos animais. A estratégia de controle utilizada na maioria dos criatórios baseia-se exclusivamente no uso de compostos antiparasitários químicos, por sua praticidade, eficiência, ótima relação custo-benefício e

facilidade de aquisição. Porém, estes produtos muitas vezes são utilizados erroneamente, de forma preventiva ou supressiva, de maneira indiscriminada e sem a associação de estratégias de controle adequadas, ocasionando a seleção de populações parasitárias resistentes (MOLENTO, 2005) à maior parte das classes de medicamentos disponíveis para seu combate, nas mais variadas regiões do mundo. Os fatores apresentados tornam difícil o controle parasitário, gerando um grande entrave econômico à produção animal. Dessa forma, a resistência parasitária tem se tornado cada vez mais importante no decorrer dos anos, principalmente em relação ao controle parasitário em equinos (KAPLAN, 2004).

Com o intuito de desenvolver outros métodos para minimizar o uso de anti-helmínticos nas estratégias de controle dos nematóides gastrintestinais, especialmente em sistemas de produção em pastoreio contínuo, o controle biológico parece ser uma realidade. Podendo oferecer uma alternativa eficiente e segura na redução da população de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais nas pastagens (LARSEN, 1999; MOTA *et al.*, 2003).

Apesar dos inúmeros agentes com potencial no controle biológico de helmintos, os fungos nematófagos têm demonstrado os maiores avanços nas pesquisas do assunto (ARAÚJO *et al.*, 2004). Diversas espécies possuem potencial para uso nesta modalidade, dentre as quais se destaca *Duddingtonia flagrans*, demonstrando os maiores avanços nas pesquisas sobre o assunto.

*D. flagrans* produz grande quantidade de clamidósporos (ANEXO 2), estruturas reprodutivas que capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrintestinal de ovinos, bovinos, suínos e equinos (LARSEN, 1999). Se ingeridos serão eliminados juntamente com as fezes e quando no ambiente,

ocorrerá o desenvolvimento do fungo e a destruição de formas larvares dos parasitas, quebrando assim o ciclo biológico dos agentes (FAEDO *et al.*, 1998; FERNÁNDEZ *et al.*, 1997).

## **1.1 HIPÓTESE**

O fungo *Duddingtonia flagrans* promove no ambiente, redução do número de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de equinos, após passar pelo trato gastrintestinal desses animais.

## **1.2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o uso de *Duddingtonia flagrans* como método de controle biológico de nematóides gastrintestinais de equinos.

## **1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar a viabilidade do fungo após passagem pelo trato gastrintestinal de equinos;
- Aperfeiçoar metodologias, propondo dosagens e intervalos ideais entre tratamentos;
- Avaliar o percentual de redução larval em coprocultura;
- Avaliar a ação do fungo no meio-ambiente, frente à larvas infectantes presentes em amostras de fezes e na pastagem;

- Associar a ação do fungo no ambiente com as condições climáticas da região.

## 2. USO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* NO CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS

### Resumo

A obtenção de êxito nos sistemas de produção animal depende de uma série de fatores, como manejo nutricional, reprodutivo e sanitário adequados, dentre outros. Em relação ao manejo sanitário, em cavalos, o controle das endoparasitoses é um tema gera que muita preocupação, pois estes animais são hospedeiros de uma variedade de parasitas, os quais podem causar grandes perdas produtivas e econômicas, muitas vezes ocasionando até a morte dos animais. A estratégia de controle utilizada na maioria dos criatórios baseia-se exclusivamente no uso de compostos antiparasitários químicos, na maioria das vezes usados erroneamente, de forma intensiva e sem a associação de estratégias de controle adequadas, acelerando a seleção de populações parasitárias resistentes. Mundialmente, em relação ao controle parasitário em equinos, a situação atual é de resistência dos parasitos à maior parte das classes de medicamentos disponíveis para seu combate. Este fato vem atraindo a atenção de muitos pesquisadores, os quais têm desenvolvido estudos buscando métodos alternativos de controle parasitário a fim de contornar o processo de resistência. O controle biológico realizado com o fungo *Duddingtonia flagrans* já demonstrou excelentes resultados nesta modalidade. Os resultados já observados indicam que o fungo possui capacidade de resistir à passagem pelo trato gastrointestinal de equinos. Quando eliminado juntamente com as fezes e sob condições ambientais favoráveis o fungo coloniza o bolo fecal e exerce atividade predatória sobre estágios larvares imaturos de nematóides parasitas. Seu uso poderá promover a redução do número de larvas infectantes presentes na pastagem e conseqüentemente a taxa de reinfecção dos animais. Além disso, pode ser associado a um programa integrado de controle parasitário, reduzindo à dependência aos anti-helmínticos e a seleção para nematódeos resistentes.

Palavras Chave: Controle biológico, compostos antiparasitários, Strongylida, larvas infectantes.

## 2. USE OF THE FUNGUS *Duddingtonia flagrans* ON THE CONTROL OF GASTROINTESTINAL NEMATODES OF EQUINES

### Abstract

Achieving success in the animal production depends on a number of factors, such as nutritional, reproductive and sanitary appropriated management, among others. In relation to the sanitary management, in horses, the control of endoparasites is a topic that generates much concern, because these animals are hosts of a large variety of parasites, which can cause many productive and economic losses and even the death of the animals. The control strategy used in the most of times is based exclusively on the use of chemical compounds, oftentimes used erroneously, intensively and without combination of appropriated control strategies, accelerating the selection of resistant parasites. Worldwide, in relation to the parasite control in horses, the current situation is the resistance of parasites to the most classes of drugs available to combat it. This fact has attracted the attention of many researchers, who have developed studies looking for alternative methods of parasite control in order to overcome the resistance process. Biological control performed with the fungus *Duddingtonia flagrans* has shown excellent results in this modality. The results already observed indicate that the fungus is capable of resisting the passage through the gastrointestinal tract of horses. When eliminated with the feces and under favorable environmental conditions the fungus colonizes the dung and exerts predation on immature larval stages of parasitic nematodes. Their use can promote the reduction of the number of infective larvae on the pasture and consequently the rate of infection of the animals. Moreover, it can be inserted in an integrated program of parasite control, reducing the dependence to the anthelmintic compounds and the selection of resistant nematodes.

Key-words: Biological control, antiparasitic compounds, Strongylida, infective larvae.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio de equídeos no Brasil gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, movimenta mais de R\$ 7,5 bilhões anuais na economia, e possui uma tropa de aproximadamente 5,6 milhões de cabeças. Somente em 2011 foi arrecadada uma quantia de aproximadamente R\$ 400 milhões em leilões de cavalos contra R\$ 22,5 mil em 1995 (LIMA, OLIVEIRA e MENDES, 2012). Dados que indicam que a atividade está em ampla expansão produtiva.

A obtenção de êxito na produção animal depende de uma série de fatores, como manejo nutricional, reprodutivo e sanitário adequados, dentre outros. Em relação ao manejo sanitário, em cavalos, o controle das endoparasitoses é um tema gera que muita preocupação à produtores e técnicos da área. Considerando que esses animais são hospedeiros de uma ampla variedade de parasitas gastrintestinais, dentre os quais helmintos destacam-se como os mais importantes e prevalentes (ASSIS e ARAÚJO, 2003). Os sinais clínicos ocasionados podem ser graves, variando desde um pequeno desconforto abdominal até episódios fulminantes de cólica e morte dos animais (MOLENTO, 2005) além dos prejuízos econômicos e produtivos.

O controle dessas parasitoses é fundamental, pois resulta em um melhor desempenho dos animais. A estratégia utilizada na maioria dos criatórios baseia-se exclusivamente no uso de compostos antiparasitários químicos, de forma intensiva e sem a associação de estratégias de controle adequadas, promovendo a seleção de populações parasitárias resistentes (MOLENTO, 2005). Atualmente, se observa resistência dos parasitos à maior parte das

classes de medicamentos disponíveis para seu combate, nas mais variadas regiões do mundo, principalmente em relação ao controle parasitário em equinos (KAPLAN, 2004; CANEVER *et al.*, 2013). Nesse sentido, sugere-se o uso do fungo *Duddingtonia flagrans* como alternativa para reduzir o número de larvas infectantes na pastagem e conseqüentemente a taxa de infecção dos animais.

## 2.2 NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS

A fauna parasitária de equinos é vasta, compreende várias famílias e/ou gêneros distintos, dentre os quais, os nematóides strongilídeos destacam-se como os mais importantes e prevalentes. O grupo pertence à classe Nematoda, ordem Strongylida, superfamília Strongyloidea, família Strongylidae, dividida em subfamílias Strongylinae e Cyathostominae, designados de grandes e pequenos estrôngilos, respectivamente (URQUHARTH *et al.*, 2007).

Grandes estrôngilos englobam os gêneros *Strongylus* e *Triodontophorus*, os quais parasitam o intestino grosso de equinos e asininos. As espécies do gênero *Strongylus*, *S. vulgaris*, *S. equinus* e *S. edentatus* apresentam como característica processos migratórios complexos no organismo dos hospedeiros. Ao contrário, os membros do gênero *Triodontophorus* são grandes estrôngilos não migratórios (TAYLOR, COOP e WALL, 2007).

Pequenos estrôngilos correspondem a 51 espécies, distribuídas em 13 gêneros: *Cyathostomum*, *Coronocylus*, *Cylicodontophorus*, *Cylicocyclos*, *Cylicostephanus*, *Skrjabinodentus*, *Tridentoinfundibulum*, *Petrovinema*, *Poteriostomum*, *Parapoteriostomum*, *Hsiungia*, *Cylindropharynx* e *Caballonema*

(LICHTENFELS *et al.*, 1998). Possuem distribuição mundial e afetam animais de todas as idades (CORNING, 2009).

### **2.3 PATOGENIA E SÍNAIS CLÍNICOS**

As infecções por grandes estrôngilos podem estar associadas a várias alterações clínicas, principalmente devido aos processos migratórios que as fases larvares desenvolvem nos hospedeiros (REICHMANN *et al.*, 2001). Dentre o grupo, *S. vulgaris* é considerado a espécie mais patogênica, principalmente na sua forma imatura, em decorrência das lesões que causa durante o processo de migração pelo sistema arterial mesentérico, podendo ser responsável por quadros de cólica intestinal severo (DUNCAN e PIRIE, 1973; OGBOURNE e DUNCAN, 1985). A migração de fases pré-adultas de *S. edentatus* está associada a alterações macroscópicas no fígado e presença de nódulos em tecidos subperitoneais. Podendo ocorrer diarreia, febre, edema, anorexia, depressão e perda de peso. As larvas migratórias de *S. equinus* apresentam comportamento invasivo, mas sua patogenia ainda não é totalmente conhecida. Podem ocasionar os mesmos sinais clínicos descritos para *S. edentatus* (TAYLOR, COOP e WALL, 2007).

A patogenia da infecção por parasitas adultos associa-se à danos causados à mucosa do intestino grosso, pois os adultos não desenvolvem atividade migratória. Os danos são promovidos pelos hábitos alimentares dos parasitas e também pela emergência de adultos jovens no intestino, provocando lesões à mucosa e vasos sanguíneos com subsequente perda de sangue, líquidos teciduais e nutrientes. Esses fatores são os principais

responsáveis pela debilitação e anemia associadas às helmintoses intestinais em cavalos (TAYLOR, COOP e WALL, 2007).

Nas infecções por pequenos estrôngilos, casos de emergência simultânea de grande número de fases larvares (L4) da mucosa e submucosa intestinal pode ocasionar a síndrome de migração larval, também conhecida como “ciatostomíase larval”. Ocorrendo enteropatia inflamatória significativa no ceco e cólon, resultando em enterite catarral e hemorrágica, diarreia, cólica, perda de peso, podendo muitas vezes levar o animal ao óbito (COBB e BOECKH, 2009).

Enquanto grande número de parasitas adultos podem causar sinais como letargia, perda de peso, atraso no desenvolvimento debilidade e diarreia (CORNING, 2009), potros e animais jovens costumam apresentar maiores índices de sinais clínicos. Em infecções leves, os animais podem não apresentar sinais clínicos característicos, convivendo com uma baixa carga parasitária. Colite granulomatosa também tem sido descrita associado a larvas de pequenos estrôngilos (LOVE, MURPHY e MELLOR, 1999).

## **2.4 CICLO BIOLÓGICO E EPIDEMIOLOGIA**

As espécies da família Strongylidae apresentam ciclo de vida direto, sem hospedeiro intermediário, com uma fase exógena, com estádios larvares de vida livre no ambiente, em que as condições ambientais para o desenvolvimento e sobrevivência das formas larvares livres são idênticas para as duas subfamílias (REINEMEYER, 2009).

Os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro e se desenvolvem no ambiente, passando por dois estágios larvais intermediários (L1 e L2) até atingir a fase infectante, ou L3. Na fase endógena, ocorrem os estágios L4 e L5 antes da maturação para adulto, esta envolve algumas migrações no interior do hospedeiro, conforme a subfamília envolvida (MADEIRA DE CARVALHO, 2001).

O número de ovos e larvas viáveis no meio-ambiente é condicionado por diversos fatores, sendo a temperatura ambiental e a umidade relativa do ar os mais importantes. Além da concentração de oxigênio, luz solar, tipo de cobertura vegetal, predadores, organismos coprófagos e todos os fatores bióticos e abióticos que possam estar presentes nas fezes dos equídeos (MADEIRA DE CARVALHO, 2003).

No Brasil, as pastagens apresentam durante todas as estações do ano, condições favoráveis a sobrevivência de larvas de nematóides gastrintestinais. O bolo fecal, quando presente no pasto exerce a função de reservatório, protegendo as larvas infectantes da dissecação, fazendo com que algumas perdurem por vários meses, ou até mais de um ano, mesmo na ausência de animais. Quando em condições ambientais favoráveis, as larvas abandonam as massas fecais migrando horizontal e verticalmente para a fração da vegetação que será ingerida por seu hospedeiro definitivo, dando assim continuidade ao seu ciclo evolutivo (KUZMINA *et al.*, 2006).

## 2.5 CONTROLE

A forma de controle adotado na maioria dos haras baseia-se exclusivamente em compostos antiparasitários, principalmente por sua praticidade e eficiência, ótima relação custo-benefício e pela facilidade de aquisição (MOLENTO, 2005). Dentre os produtos disponíveis, existem três grupos químicos distintos que são os mais utilizados: os benzimidazóis, as pirimidinas, e as lactonas macrocíclicas. Sabe-se também que a alternância entre esses grupos químicos é frequente, ocorrendo muitas vezes ao ano (TRAVERSA, 2008).

Os antiparasitários podem ser usados de forma supressiva, curativa ou estratégica. O tratamento supressivo é administrado em intervalos curtos, o estratégico está associado com a época do ano e com o aumento do número de parasitas no animal, ou seja, com a epidemiologia dos parasitas. No tratamento curativo o tratamento é aplicado quando o animal apresenta alta contagem de ovos nas fezes ou sinais clínicos (SANGSTER *et al.*, 2002).

De acordo com Kaplan (2002), grande parte dos criadores de cavalos possui elevada preocupação em relação ao impacto das parasitoses na sanidade dos animais. Esta concepção geralmente resulta na busca por um controle “total” das parasitoses. Para tal objetivo costuma ser adotado o uso de tratamentos supressivos, com frequência suficiente para manter a carga parasitária e a contagem de ovos por grama de fezes (OPG) próxima de zero.

Entretanto, deve-se ter em mente que a utilização indevida desses produtos promoverá resultados abaixo das expectativas, aumento dos custos de produção (CEZAR, CATTO e BIANCHIN; 2008), acelerará o processo de

seleção de parasitas resistentes (PRICHARD, 1994) e conseqüentemente diminuirá a vida útil dos antiparasitários.

## **2.6 RESISTÊNCIA PARASITÁRIA**

Resistência parasitária define-se como sendo um processo no qual alguns parasitos de uma população adquirem capacidade de sobreviver à tratamentos que são geralmente eficazes contra as mesmas espécies e estágios de infecção, ou seja, alguns indivíduos de uma população parasitária possuem genes que codificam para a resistência contra determinada droga (PRICHARD *et al.*, 1980). Portanto, a resistência é herdada e o seu desenvolvimento primeiro exige que os genes de resistência estejam presentes, e que a expressão destes genes aumente na população por seleção genética (HODGKINSON *et al.*, 2008).

A taxa de desenvolvimento de resistência é determinada pela pressão de seleção e na medida em que os organismos sobreviventes ao tratamento passem seus genes para a próxima geração. Com a continuação da seleção e reprodução dos parasitas resistentes, a frequência de genes de resistência na população aumenta até o ponto em que o tratamento falhará (SANGSTER, 1999). A adoção de práticas de tratamentos supressivos e, principalmente o uso inadequado das drogas antiparasitárias conduzem e/ou aceleram a seleção de parasitas resistentes à maioria das drogas utilizadas para o controle desses agentes (KAPLAN, 2002; MOLENTO, 2005).

Para parasitas de equinos, os primeiros relatos de resistência anti-helmíntica foram na década de 60, para a droga fenotiazina (GIBSON, 1960;

DRUDGE e ELAM, 1961). Alguns anos depois, a resistência ao tiabendazol também foi relatada (DRUDGE e LYONS, 1965). Em 1996, Chapman *et al.* relataram pela primeira vez resistência parasitária frente ao benzimidazol, a piperazina e ao pamoato de pirantel. Já em 1999, Young *et al.* observaram resistência ao fenbendazole (32%) e redução da eficácia do pirantel (93%).

A partir do início da década de 80, foi reconhecido que *S. vulgaris* e as demais espécies da subfamília Strongylinae tiveram a prevalência reduzida. Enquanto os ciatostomíneos, frequentemente passaram a representar praticamente 100% de prevalência em animais mantidos em pastejo (HERD, MILLER e GABEL, 1981). Atualmente, no controle das endoparasitoses de equinos o maior obstáculo encontra-se nos pequenos estrôngilos (Cyathostominae), os quais se apresentam resistentes à maioria das classes de anti-helmínticos disponíveis, nas mais diversas regiões do mundo (TRAVERSA *et al.*, 2009).

Segundo Kaplan (2004), a resistência desses parasitas aos benzimidazóis encontra-se amplamente generalizada, com prevalência de até 100% em alguns países. No início dos anos 90 foi relatado na Europa, alta prevalência de ciatostomíneos resistentes aos compostos do grupo das tetrahidropirimidinas (IHLER, 1994). Na América do Norte, Matthews (2008) observou eficácia de ivermectina e moxidectina. Enquanto casos de redução da eficácia da ivermectina foram constatados no Reino Unido (CAMPBELL, CRINGOLI e COLES, 2007), na Alemanha (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA *et al.*, 2007) nos Estados Unidos (LYONS, 2008). No Brasil já foi relatada resistência de ciatostomíneos à ivermectina e moxidectina (MOLENTO *et al.*, 2008).

## **2.7 MEDIDAS ALTERNATIVAS DE CONTROLE PARASITÁRIO**

Para o controle das doenças parasitárias, considerando-se a situação atual de resistência dos parasitas deve-se mudar a concepção de “cura total”. Segundo Molento (2009), o controle deve ter como base estratégias de gestão, buscando reduzir o uso de anti-helmínticos, a seleção de parasitas resistentes e também a liberação de produtos químicos no ambiente. Concomitantemente, deve-se garantir a exposição dos animais a certos níveis dos agentes causadores de doenças (antígenos), permitindo dessa forma o desenvolvimento da imunidade adquirida.

Além disso, recomenda-se a integração de outras formas de controle, buscando reduzir o número de larvas infectantes nas pastagens, promovendo assim a redução da reinfecção dos animais e conseqüentemente o uso de anti-helmínticos (ARAÚJO *et al.*, 2004; BRAGA *et al.*, 2009). Nesse sentido, o controle biológico realizado com fungos nematófagos destaca-se como uma alternativa promissora. Podendo promover sinergismo com o controle parasitário convencional e/ou reduzir à dependência aos anti-helmínticos (BRAGA *et al.*, 2010).

## **2.8 CONTROLE BIOLÓGICO DE PARASITAS**

Segundo Gronvold *et al.* (1996), nos sistemas biológicos, os microorganismos presentes na natureza atuam naturalmente como antagonistas regulatórios, buscando o equilíbrio e a redução da presença de agentes causadores de perdas em uma população. Nesse caso, o termo

controle biológico origina-se da utilização de antagonistas disponíveis no meio-ambiente a fim de reduzir a quantidade de determinado agente, como as larvas infectantes dos parasitos gastrintestinais, por exemplo.

Para o emprego comercial de uma formulação para uso no controle biológico de parasitas fatores adicionais também devem ser considerados, tais como: Capacidade de produção do antagonista em escala industrial, custos relacionados à produção, competitividade com drogas tradicionais, já estabelecidas no mercado, e tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais. As formulações também devem oferecer segurança para os produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente e finalmente, apresentarem eficácia no controle dos organismos alvo (MOTA *et al.*, 2003).

#### 2.8.1 Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos estão presentes na natureza como antagonistas naturais de nematóides de vida livre, conhecidos como destruidores de nematóides (BARRON, 1977). Foram primeiramente descritos há mais de um século e catalogados em mais de 150 espécies, as quais se encontram divididas em três grupos principais: oportunistas, endoparasitos e predadores (BARRON, 1977; GRONVOLD *et al.*, 1993).

Os fungos oportunistas são parasitas de ovos, seu mecanismo de ação inicia-se pela colonização da superfície dos ovos e posterior penetração das hifas por poros presentes na membrana dos mesmos. O processo de penetração ocorre por um conjunto de ações mecânicas e enzimáticas (LYSEK

e STERBA, 1991). A ação enzimática ocasiona aumento da permeabilidade da membrana dos ovos, facilita a passagem de toxinas e promove desequilíbrio osmótico, prejudicando diretamente o desenvolvimento dos estágios pré-parasitários provenientes dos ovos (STIRLING e OESTE, 1991). Ocorre também a colonização do conteúdo interno dos ovos ou mesmo as larvas em desenvolvimento (MOTA *et al.*, 2003).

Os fungos endoparasitos atuam em estágios larvares e também em nematóides adultos. O processo de infecção inicia-se pela ingestão de esporos capazes de se desenvolver e colonizar o conteúdo interno dos nematoides, podendo promover a morte dos mesmos (BARRON, 1977). Os predadores pertencem a um grupo heterogêneo de microfungos, caracterizado por sua habilidade em capturar e destruir nematóides, assim como competir pelas fontes de nutrientes ou suplementos necessários para o desenvolvimento fúngico no meio-ambiente (WALLER e FAEDO, 1996).

Os fungos predadores caracterizam-se pela produção de um sistema de hifas em forma de uma rede tridimensional adesiva, semelhante à armadilhas, onde capturam formas larvares de nematóides parasitas, em fase exógena de desenvolvimento, ou nematóides de vida livre. O estímulo para ativar essas armadilhas acontece quando larvas de nematóides, ou mesmo outros microorganismos se movimentam, pelo contato com suas excretas, compostos biológicos ou até mesmo por condições adversas, tais como: escassez de nutrientes e de água (BALAN e GERBER, 1972; BIRD e HERD, 1994). O aparecimento das estruturas predadoras pode acontecer dentro de 24 horas após a interação fungo - nematóide (PRAMER, 1964). No caso de larvas

infectantes dos nematóides parasitos, a cutícula externa não confere proteção à ação predatória dos fungos (WHARTON e MURRAY, 1990).

Segundo Dias *et al.* (2007), os fungos classificados como predadores destacam-se dentre as alternativas mais promissoras para o controle biológico das doenças parasitárias dos animais domésticos. Dentre outros fatores, estão naturalmente em abundância no solo e podem utilizar vários substratos orgânicos e micro habitats que promovem oportunidades para a interação com nematóides (GRONVOLD *et al.*, 1996). São cosmopolitas, e além do solo, também são encontrados em pastagens e qualquer tipo de detritos orgânicos em decomposição. Locais estes, propícios também ao desenvolvimento de estágios imaturos de nematóides parasitas (FAEDO *et al.*, 1998).

De acordo com Mota *et al.* (2003), esses agentes não apresentam efeito sobre as fases parasitárias dos nematóides, mas concentram suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros finais. Desta forma, para animais criados em sistemas extensivos, o uso do fungo pode propiciar a redução de larvas infectantes presentes na pastagem e conseqüentemente a taxa de reinfecção dos animais.

Um requisito essencial para que um isolado seja possivelmente explorado no controle biológico de parasitas, é que ele possua a habilidade de suportar a passagem pelo trato gastrintestinal dos animais após administração oral. Ou seja, deve suportar condições de estresse e, uma vez presente nas fezes ser capaz de germinar, colonizar o bolo fecal e capturar os estágios larvares recém-eclodidos dos ovos, antes que migrem para a pastagem (BRAGA *et al.*, 2010). Além disso, deve possuir especificidade de ação, alta capacidade

reprodutiva e suportar as condições ambientais e climáticas da região geográfica onde o controle será realizado (BRAGA *et al.*, 2009).

### 2.8.2 *Duddingtonia flagrans*

*Duddingtonia flagrans* é um fungo predador de nematóides e destaca-se dentre os agentes mais estudados para uso no controle biológico das parasitoses dos animais domésticos, apresentando grande potencial para uso nesta modalidade (BRAGA *et al.*, 2009). Conforme mecanismo anteriormente descrito para os fungos predadores, *D. flagrans* apresenta como característica hifas que se desenvolvem em forma de redes tridimensionais adesivas, semelhantes à armadilhas.

A atividade predatória inicia-se com a interação larva/nematoide de vida livre – fungo, promovendo contato entre as armadilhas e a cutícula dos nematóides, seguido do seu aprisionamento. Após, ocorre rompimento da cutícula, entrada e crescimento das hifas no interior do corpo da larva, promovendo imobilização e digestão de seu conteúdo interno, causando sua morte (WANG *et al.*, 2006). O processo é complexo, ocorrendo por meio de uma combinação de eventos físicos e enzimáticos (DA CRUZ *et al.*, 2011). A ação enzimática é fundamental para a perfuração e degradação da cutícula (rica em quitina) de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais. As seguintes enzimas já foram isoladas de *D. flagrans*: fosfatases ácidas, proteases, fosfolipase C, lipases e pectinases (MEYER e WIEBE, 2003; MOTA *et al.*, 2003).

*D. flagrans* produz clamidósporos, estruturas reprodutivas com parede

espessa e altamente resistentes, diferenciados a partir das hifas, os quais podem dar origem a hifas, conidióforos e conídios (BARRON, 1977). Se ingeridos, os clamidósporos percorrem o trato gastrintestinal dos animais e permanecem viáveis quando nas fezes, colonizando-as logo após a sua deposição no solo (FAEDO, LARSEN e WALLER, 1997). No bolo fecal, o desenvolvimento do fungo é estimulado pelo contacto com um número crescente de larvas infectantes (PAZ-SILVA *et al.*, 2011) e também por nematóides de vida livre. Com a colonização, os clamidósporos podem atingir a pastagem, sendo frequente sua ingestão juntamente com o pasto (MOTA *et al.* 2003)

Em relação a possíveis efeitos adversos da administração de *D. flagrans* aos animais, Madeira de Carvalho *et al.* (2003), concluíram, por meio de avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos que o fungo não causa efeitos adversos, quando administrado via oral à equinos. Além disso, poderia haver preocupação sobre outras consequências, como, por exemplo, ação sobre outros organismos que trazem benefícios para o solo e para o meio-ambiente. Porém, em estudo desenvolvido por Knox, Josh e Anderson (2002), foi comprovado que *D. flagrans* não promove impacto ambiental negativo quando usado em um sistema de produção a pasto. Os autores observaram que o número de nematóides de vida livre e de microartrópodos não foram reduzidos ( $P > 0,05$ ) pelo fungo, como também não foi verificado efeito ( $P > 0,05$ ) sobre a presença de outros fungos predadores.

Desde o início da década de 90 até os dias atuais são crescentes os estudos desenvolvidos com uso de *D. flagrans* no controle das endoparasitoses dos animais domésticos. Nas mais variadas regiões do mundo pesquisadores

já relataram eficácia de *D. flagrans* no controle de estágios imaturos de parasitos de bovinos (LARSEN *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2013), caprinos e ovinos (LARSEN *et al.*, 1998; WAGHORN *et al.*, 2003; OJEDA-ROBERTOS *et al.*, 2008) e também de equinos (BIRD e HERD, 1994; LARSEN *et al.*, 1996; MADEIRA DE CARVALHO *et al.*, 2007; ARAUJO *et al.*, 2010; PAZ-SILVA *et al.*, 2011; TAVELA *et al.*, 2013).

A atividade predatória de *D. flagrans* sobre nematóides de equinos já foi muito estudada *in vitro*, demonstrando altos índices de eficácia na redução do número de larvas infectantes de estrogilídeos (BIRD e HERD, 1994; FERNÁNDEZ *et al.*, 1997; FERNÁNDEZ *et al.*, 1999; SANTOS, PADILHA e RODRIGUES, 2001). Com relação a atividade do fungo em condições ambientais, estudos de Larsen *et al.* (1996) e Braga *et al.* (2009) observaram eficácia na redução de larvas infectantes na pastagem, o que se refletiu na diminuição do número de parasitos presentes no trato gastrintestinal dos animais que foram mantidos nos piquetes de experimentação. Outra característica de *D. flagrans* é sua capacidade de ser produzido em larga escala, devido a sua alta habilidade reprodutiva e resistência à longos períodos de armazenamento, suportando as mais variadas condições ambientais (GRONVOLD *et al.*, 1996).

Pesquisas em epidemiologia, biologia e modo de ação de fungos nematófagos demonstram a viabilidade do emprego desses agentes no controle biológico de helmintos gastrintestinais. Entretanto, deve-se considerar a importância de avaliar os isolados com características predatórias promissoras em condições climáticas variadas (MOTA *et al.*, 2003). *D. flagrans*, se desenvolve melhor entre 20 e 25°C e um índice pluviométrico entre 15 e 60

mm por semana (GRONVOLD *et al.*,1996). Entretanto, essas condições podem variar conforme o isolado.

Segundo Madeira de Carvalho *et al.* (2007), um fator imposto á utilização de *D.flagrans* no controle biológico de parasitas é a necessidade de sua presença nas fezes dos hospedeiros para que ocorra redução das formas larvares no bolo fecal e conseqüentemente na pastagem. Nesse sentido, quando um animal ingere clamidósporos ocorre a emissão dos mesmos juntamente com o conteúdo fecal. As fezes frescas de bovinos e equinos, em condições climáticas ideais, são rapidamente colonizadas pelo fungo. Sendo também frequente a sua ingestão durante o pastoreio, com subseqüente excreção nas fezes (LARSEN, 2000).

## **2.10 CONCLUSÃO**

Diante do impacto negativo que as endoparasitoses podem causar na equinocultura e levando-se em consideração a situação atual de processo de resistência parasitária, principalmente associado aos ciatostomíneos recomenda-se que o controle parasitário seja orientado por profissionais qualificados.

Os médicos veterinários devem orientar criadores e funcionários sobre o uso adequado dos antiparasitários, doses e intervalos entre tratamentos, buscando reduzir o uso e assim prolongar a vida útil desses produtos. Deve-se mudar a concepção “de cura total”, com uso de tratamentos supressivos, buscando eliminar ao máximo os parasitas. A recomendação deve estar associada à tratamentos estratégicos, baseados na epidemiologia dos

parasitas.

Pesquisas com controle biológico realizado com o fungo nematófago *D. flagrans* têm demonstrado excelentes resultados no controle de nematóides gastrintestinais de equinos. O emprego de *D. flagrans* como estratégia de controle parasitário poderá reduzir a dependência aos anti-helmínticos e a seleção para nematódeos resistentes. Além disso, diminuirá a contaminação da pastagem e conseqüentemente poderá diminuir a ingestão de larvas infectantes, reduzindo o parasitismo animal.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, J.V. *et al.* Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, v.34, p. 457-463, 2004.

ARAÚJO, J.V. *et al.* Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n.2, p. 76-79, 2006.

ASSIS, R.C.L.; ARAÚJO, J.V. Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrintestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p. 109–113, 2003.

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

BARRET, E.J.; FARLAM, J.; PROUDMAN, C.J. Field trial of the efficacy of a combination of ivermectin and praziquantel in horses infected with roundworms and tapeworms. **Veterinary Record**, n. 184, p.323-325, 2004.

BARRON G.L. The Nematode-destroying Fungi. In: **Topics in Mycobiology**. Guelph, Canada. Ed. Canadian Biological Publications Ltda. 140 p, 1977.

BIRD J; HERD R.P. Nematophagous fungi for the control of equine cyathostomes. **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**, v. 16, n. 5, p.658-665, 1994.

BRAGA, F.R. *et al.* Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 335-40, 2009.

BRAGA, F.R. *et al.* Predatory activity of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on horse cyathostomin infective larvae. **Tropical animal health and production**, v. 42, n. 6, p.1161-1165, 2010.

CAMPBELL, C.; CRINGOLI, G.; COLES, G.C. Ivermectin resistance in cyathostomins in UK horses. In: **Proceedings of the 21st International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP)**, 19-23 August 2007, Ghent, Belgium. p. 19-23. 2007.

CANEVER, R.J. *et al.* Lack of *Cyathostomin* sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.194, n.1, p. 35–39, 2013.

CEZAR, A.S.; CATTO, J.B.; BIANCHIN, I. Controle alternativo de nematódeos gastrintestinais dos ruminantes: atualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p. 2083-2091, 2008.

CHAPMAN, M.R. *et al.* Identification and characterization of a pirantel pamoate resistant cyathostome population. **Veterinary Parasitology**, v. 66, p. 205-212, 1996.

COBB, R.; BOECKH, A. Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. **Parasites & Vectors**, v. 2, Suppl. 2, 2009.

CORNING, S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. **Parasites & Vectors**, v. 2, Suppl. 2, 2009.

DA CRUZ, D.G. *et al.* Kinetics of capture and infection of infective larvae of trichostrongylides and free-living nematodes *Panagrellus* sp. by *Duddingtonia flagrans*. **Parasitology Research**, v.109, n. 4, p. 1085-1091, 2011.

DIAS, A.S. *et al.* Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n. 9, 1245-1252, 2007.

DRUDGE, J.H.; ELAM, G. Preliminary observations on the resistance of horse strongyles to phenothiazine. **Journal of Parasitology**, v. 47, p. 38–39, 1961.

DRUDGE, J.H.; LYONS, E.T. Control of internal parasites of the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.148, n. 4, p. 378-383, 1966.

DUNCAN, J.L.; PIRIE, H.M. Strongyle infection in horse: life cycle, pathogenesis, epidemiology and immunity. **Helminths diseases of cattle, sheep and horses in Europe**, v.115, n. 26, 1973.

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**, v. 72, n. 2, p.149-155, 1997.

FAEDO, M. *et al.* The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Pasture plot study with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, v.76, n.1, p.129-135, 1998.

FERNÁNDEZ, A.S. *et al.* Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.73, n.3, p. 257-266, 1997.

FERNÁNDEZ A.S. *et al.* A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. **Equine Veterinary Journal**, v.31, p. 488–491, 1999.

GIBSON, T.E. Some experiences with small daily doses of phenothiazine as a means of control of strongylid worms in the horse. **Veterinary Record**, v.72, n. 3, p. 37–41, 1960.

GRONVOLD, J. *et al.* Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**, v. 48, n.1, p. 311-325, 1993.

GRONVOLD, J. *et al.* Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v.70, p. 291–297, 1996.

HERD, R.P; MILLER, T.B; GABEL, A.A field evaluation of pro-benzimidazole, benzimidazole and non-benzimidazole anthelmintics in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.179, n. 7, p. 686–691, 1981.

HODGKINSON J.E. *et al.* The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p.149-1160, 2008.

IHLER, C.F. A field survey on anthelmintic resistance in equine small strongyles in Norway. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 36, n. 1, p.135-143, 1994.

KAPLAN, R.M. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. **Veterinary Research**, v. 33, p. 491–507, 2002.

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

KAPLAN, R.M. *et al.* Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.225, n. 6, p. 903-910, 2004.

KNOX, M.R.; JOSH, P. F; ANDERSON, L. J. Deployment of *Duddingtonia flagrans* in an improved pasture system: dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. **Biological Control**, v. 24, n. 2, p.176-182, 2002.

KUZMINA, T.A.; KUZMIN Y. I.; KHARCHENKO, V. A. Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine, **Veterinary Parasitology**, v. 141, n. 3-4, p. 264-272, 2006.

LARSEN, M. *et al.* Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, v.60, n.3, p. 321-330, 1995.

LARSEN, M. *et al.* The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology**, v.113, p.1-6, 1996.

LARSEN, M. *et al.* The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Studies with *Duddingtonia flagrans*. **Veterinary Parasitology**, p.76, n.1, p.121-128, 1998.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n.1, p. 139-146, 1999.

LARSEN, M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v.120, n. 7, p.121-131, 2000.

LICHTENFELS, J.R. *et al.* An annotated checklist by genus and species, of 93 species level names for 51 recognized species of small strongyles (Nematoda: Strongyloidea: Cyathostominae) of horses, asses and zebras of the world. **Veterinary Parasitology**, v.79, p. 65–79, 1998.

LIMA, R.A.S.; OLIVEIRA, R.A.; MENDES, C.Q. Perfil e tendências da equideocultura brasileira. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2012, Brasília. **Anais...Brasília**, 2012. CD-ROM.

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

LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. **Veterinary Parasitology**, v.31, n. 85, p.113–122, 1999.

LYONS, E.T. *et al.* Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. **Parasitology Research**, v.103, n.1, p. 209-215, 2008.

MADEIRA DE CARVALHO, L. M. **Epidemiologia e controlo da estrogilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal.** Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2001.

MADEIRA DE CARVALHO, L. M. Estrogilidoses dos equídeos – aspectos da sua epidemiologia, terapêutica e controlo. **Revista semestral da Associação dos Estudantes da Faculdade de Medicina Veterinária (AEFMV)**, n. 58, p. 6-15, 2003.

MADEIRA DE CARVALHO, L. M. *et al.* Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrogilidose equina no Ribatejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.233-247, 2007.

MATTHEWS, J.B. An update on cyathostomins: Anthelmintic resistance and worm control. **Equine Veterinary Education**, v.20, n.10, p. 552-560, 2008.

MEYER, W.J.; WIEBE, M.G. Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. **Biotechnology letters**, v.25, n.10, p.791-795, 2003.

MOLENTO, M.B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1469-1477, 2005.

MOLENTO, M.B. *et al.* Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. **Veterinary Record**, v. 162, n. 12, p. 384-385, 2008.

MOLENTO, M.B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n.3, 229-234, 2009.

MOTA, M.A. *et al.* Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

OGBOURNE, C.P.; DUNCAN, J. L. *Strongylus vulgaris* in the horse: its biology and veterinary importance. **Commonwealth Agricultural Bureaux, on behalf of Commonwealth Institute of Parasitology**, v.2, 1985.

OJEDA-ROBERTOS, N.F. *et al.* Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p. 329-335, 2008.

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

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

PRICHARD, R. *et al.* The problem of anthelmintic resistance in nematodes. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, n. 5, p. 239-250, 1980.

PRICHARD, R. Anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v.54, n.1, p. 259-268, 1994.

REICHMANN, P. *et al.* Valores hematológicos em eqüinos naturalmente infectados por estrongilídeos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n.2, p. 179-181, 2001.

REINEMEYER, C.R. Controlling strongyle parasites of horses: a mandate for change. **Proceedings of the 55th annual convention the American Association of Equine Practitioners** - Las Vegas, USA, p. 353-360, 2009.

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

SANGSTER, N. *et al.* Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. **International Journal for Parasitology**, v.32, p. 637-653, 2002.

SANTOS, C.P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M.L.A. Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages

of cyathostominae under different constant temperatures. **Ciência Rural**, v.31, n. 5, p. 839-842, 2001.

SILVA, M.E. *et al.* Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, ahead of print Epud, Mar 26, 2013.

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

TAVELA, A.E.O. *et al.* Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. **Research Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 568-72, 2013.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2007.

TRAVERSA, D. The Little-known Scenario of Anthelmintic Resistance in Equine Cyathostomes in Italy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1149, n. 1, p.167-169, 2008.

TRAVERSA, D. *et al.* Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. **Parasit Vectors**, v. 2, Suppl. 2, 2009.

URQUHARTH, G.M. *et al.* **Parasitologia Veterinária**.; 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. *et al.* Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. **Veterinary Parasitology**, v.144, n.1, p. 74-80, 2007.

WAGHORN, T. S. *et al.* Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastro-intestinal nematodes in laboratory

faecal cultures from sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.118, n. 3, p. 227-234, 2003.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8, p. 915-925, 1996.

WALLER, P.J.; CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus*: parasite problem from Tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. **Tropical Biomedicine**, v. 22, n. 2, p.131-137, 2005.

WANG, R.B. *et al.* Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. **Letters in applied Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 589-594, 2006.

WHARTON, D.A.; MURRAY, D.S. Carbohydrate/lectin interactions between the nematophagous fungus, *Arthrobotrys oligospora*, and the infective juveniles of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). **Parasitology**, v.101, n.1, p.101-106, 1990.

YOUNG, K.E. *et al.* Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. **Veterinary Parasitology**, v.85, p. 205–214, 1999.

### 3. AÇÃO DO FUNGO *Duddingtonia flagrans* NA REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS: MODELO *IN VITRO* E *IN VIVO*

#### Resumo

O parasitismo gastrointestinal em equídeos pode afetar todas as categorias, causando grandes prejuízos econômicos, perdas produtivas e até morte dos animais. O controle destes parasitas é tradicionalmente realizado através do uso de anti-helmínticos químicos. Entretanto, atualmente observa-se resistência destes agentes à maior parte das classes de medicamentos disponíveis para seu combate. Dessa forma, necessita-se de medidas alternativas ou suplementares de controle parasitário. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do fungo *Duddingtonia flagrans* frente à larvas infectantes de nematóides de equinos. O delineamento foi inteiramente casualizado, composto por três grupos tratados (T1, T2 e T3) e um grupo controle (C), com cinco animais cada. Os tratamentos consistiram em clamidósporos de *D. flagrans* em três titulações: (T1)  $2,5 \times 10^5$ ; (T2)  $5 \times 10^5$  e (T3)  $1 \times 10^6$   $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo animal (PV). O experimento foi subdividido em cinco dias de tratamento e cinco dias pós-tratamento, totalizando 10 dias. Amostras fecais foram coletadas diariamente e analisadas por meio de contagem de OPG e coprocultura. A análise estatística foi realizada por meio do software livre R. Na contagem de OPG, os grupos foram diferentes ( $P < 0,05$ ) somente nos dias 8, 9 e 10 da avaliação. Na contagem de larvas infectantes, os grupos apresentaram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) nos dias 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10. Foi observada correlação significativa entre contagem de OPG ( $p = 0,001$ ) e contagem de L3 ( $p = 0,004$ ) somente nos grupos Controle e T1. Os grupos T2 e T3 apresentaram percentuais de redução larval de até 99,05% e 99,69%, respectivamente. Conclui-se que na dosagem de  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  clamidósporos  $\text{Kg}^{-1}$ , *D. flagrans* pode ser inserido na alimentação de equinos, proporcionando redução significativa no número de larvas infectantes de nematóides gastrointestinais. O uso do fungo pode servir como método auxiliar no controle de nematóides de cavalos.

Palavras Chave: Controle biológico, fungos nematófagos, clamidósporos, armadilhas.

### 3. ACTION OF THE FUNGUS *Duddingtonia flagrans* IN REDUCING OF INFECTIVE LARVAE OF GASTROINTESTINAL NEMATODES OF HORSES: *IN VITRO* AND *IN VIVO* MODEL

#### Abstract

The gastrointestinal parasitism in horses can affect all categories, causing great economic and production losses and even death of animals. The control of these parasites is traditionally performed with the use of chemical anthelmintics. However, currently there is resistance of these agents to most classes of drugs available. Thus, there is a need to develop new alternative or additional measures of parasite control. The aim of this study was to evaluate the effect of *Duddingtonia flagrans* against infective larvae of nematodes of horses. The study design was completely randomized, with three treated groups (T1, T2 and T3) and a control group (C), with five animals tests in each. The treatments consisted of chlamyospores of *D. flagrans* in three doses: (T1)  $2,5 \times 10^5$ ; (T2)  $5 \times 10^5$  (T3)  $1 \times 10^6$   $\text{kg}^{-1}$  of animal body weight. The experiment was divided into five days of treatment and five days post-treatment, totaling 10 days. Fecal samples were collected daily and analyzed using the faecal egg count (EPG) and coproculture. Statistical analysis was performed using the software free R. The groups were statistically different for EPG counts only on days 8, 9 and 10 ( $P < 0.05$ ) of the assessment. The groups showed significant differences ( $P < 0.05$ ) for larval count on days 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 and 10. Significant correlation was observed between EPG ( $p = 0.001$ ) and L3 ( $p = 0.004$ ) only for the Control and T1 groups. Groups T2 and T3 showed a reduction of larvae of 99.05% and 99.69%, respectively. At the dosage of  $5 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  chlamyospores  $\text{kg}^{-1}$ , *D. flagrans* may be inserted in the feed of horses providing significant reduction in the number of infective larvae of gastrointestinal nematodes. It can also serve as an alternative method in the control of nematodes of horses.

Key Words: Biological control, nematophagous fungi, chlamyospores, traps.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os sistemas de criação de equídeos favorecem uma elevada incidência de parasitoses gastrintestinais, já nas primeiras semanas de vida. Podendo causar desde um pequeno desconforto abdominal até episódios fulminantes de cólica e morte (MOLENTO, 2005). Ocasionalmente ainda elevadas perdas econômicas, considerando-se também a redução no ganho de peso e na produtividade, aumento na susceptibilidade a doenças e custos com tratamentos.

O controle destas parasitoses é fundamental, sendo tradicionalmente realizado por meio do uso de anti-helmínticos químicos. Porém, atualmente se observa resistência dos parasitos à maior parte desses medicamentos, nas mais variadas regiões do mundo. A resistência parasitária tem se tornado cada vez mais importante no decorrer dos anos, principalmente em relação ao controle parasitário em equinos (CANEVER *et al.*, 2013).

Diante destes fatores, ressalta-se a necessidade de formas alternativas ou suplementares de controle parasitário, na qual se pode inserir o controle biológico de parasitas. Diversas espécies de fungos nematófagos possuem capacidade para uso nesta modalidade, dentre os quais, se destaca o *Duddingtonia flagrans* (MOTA *et al.*, 2003).

*D. flagrans* possui grande capacidade de produzir clamidósporos, estruturas reprodutivas com parede espessa e altamente resistentes, que se ingeridos, percorrem o trato gastrintestinal dos animais e permanecem viáveis quando nas fezes, colonizando-as logo após a sua deposição no solo (LARSEN *et al.*, 1995). No meio-ambiente, a colonização inicia-se com

germinação de esporos e posterior formação de hifas e micélios. As hifas desenvolvem-se em forma de redes tridimensionais adesivas, semelhantes à armadilhas, responsáveis pelo aprisionamento mecânico do nematoide, iniciando assim a atividade predatória do fungo (WAGHORN *et al.*, 2003).

Em condições ideais de temperatura e umidade, *D. flagrans* possui capacidade de reduzir o número de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais presentes no bolo fecal e conseqüentemente pode reduzir a contaminação da pastagem e indiretamente, a taxa de infecção animal (LARSEN *et al.*, 1996). Podendo tornar-se uma importante alternativa a ser empregada em formulações biológicas para o controle de infecções parasitárias em equinos e outros animais.

Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar a ação de *D. flagrans* frente à larvas infectantes de nematóides de equinos após passagem pelo trato gastrintestinal.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Isolado fúngico**

Foi utilizado *D. flagrans*, isolado CG 768, processado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos de Goytacazes, RJ. O isolado foi cultivado utilizando milho triturado como meio para crescimento, a uma temperatura entre 23 e 27°C na ausência de luz por 21 dias. Posteriormente, o material foi secado em estufa a 25°C. Após secagem retirou-se amostras de 10 gramas e foi

adicionado 100 mL de água destilada. O material foi homogeneizado, filtrado e em seguida realizou-se uma contagem de clamidósporos utilizando câmara de Neubauer, em triplicata. Foi determinado o número de clamidósporos por mL e posteriormente associou-se o volume e o peso utilizados para obtenção do número de clamidósporos por grama de milho triturado.

### 3.2.2 Experimento *in vivo*

O experimento *in vivo* foi realizado no Haras São José da Serra, localizado no município de São José dos Pinhais, PR. O estudo ocorreu no período correspondente à primavera do ano de 2012. Foram utilizados 20 cavalos adultos, da raça Puro Sangue Inglês (PSI). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por três grupos tratados (T1, T2 e T3) e um grupo controle (C), com cinco animais cada. Os tratamentos consistiram em clamidósporos de *D. flagrans* em três titulações: (T1)  $2,5 \times 10^5$ ; (T2)  $5 \times 10^5$  e (T3)  $1 \times 10^6$  kg<sup>-1</sup> de peso vivo animal. Os grupos tratados receberam o fungo juntamente com 500g de aveia em grãos e o grupo controle recebeu somente a aveia. Os tratamentos foram administrados em cochos individuais, entre sete e oito horas da manhã. A pesquisa transcorreu em um período de 10 dias, subdivididos em cinco dias de tratamento (período de administração do fungo) e cinco dias pós-tratamento. Durante todo o período experimental, amostras fecais de todos os animais, foram coletadas via retal, no mesmo horário estabelecido para administração dos tratamentos.

### 3.2.3 Análises laboratoriais

A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada conforme o método de Gordon e Whitlock (1939) modificado na concentração de 4 g de fezes para 26 ml de solução saturada. As amostras foram analisadas individualmente em duplicata, com cálculo para média de cada repetição. Em seguida, foi determinada a média para cada grupo, por dia avaliado. A coprocultura foi realizada conforme Roberts e O'Sullivan (1950), individualmente, por dia avaliado. O material foi acondicionado em estufa BOD (28°C e 60% URA) por 10 dias. As larvas infectantes (L3) recuperadas de cada amostra foram quantificadas em triplicata sendo calculada a média para cada repetição e posteriormente a média para cada grupo, por dia avaliado. Calculou-se o percentual de redução larval dos tratamentos para cada dia de avaliação, conforme Mendoza-de- Guives *et al.* (1999):

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{Média de L3 do grupo controle} - \text{Média de L3 do grupo tratado}}{\text{Média de larvas do grupo controle}} \times 100$$

### 3.2.4 Análise estatística

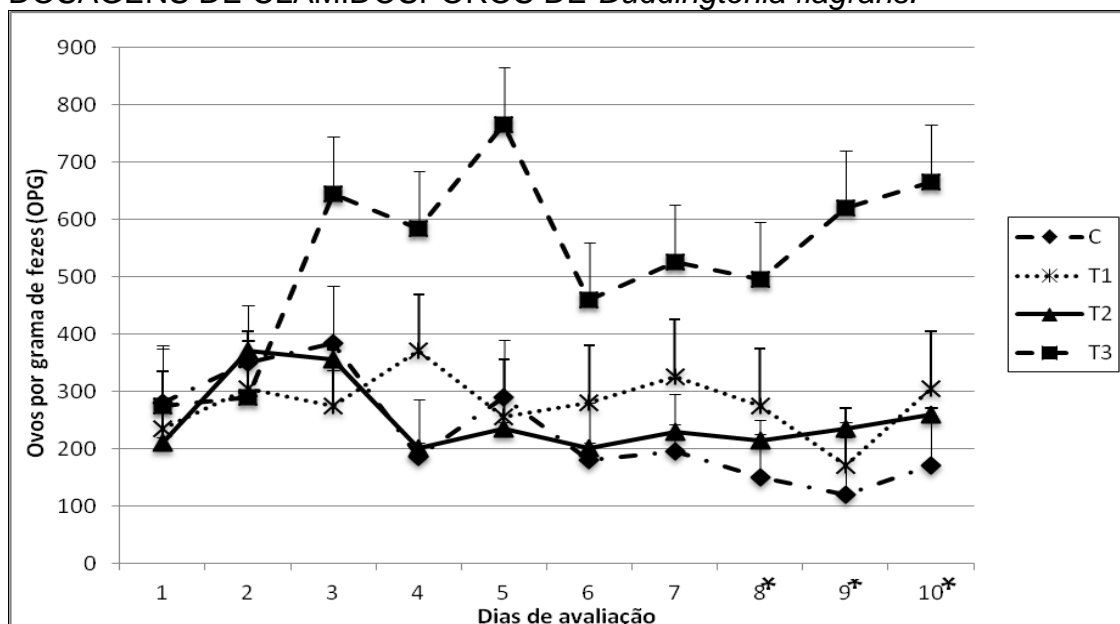
Os dados de contagem de OPG e L3 foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors. Como a normalidade não foi comprovada foi aplicado teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação dos quatro grupos (C, T1, T2, T3) em cada um dos 10 dias. O teste de Friedman foi utilizado para avaliar diferenças entre os 10 dias de avaliação e o teste DMS (diferença mínima significativa) para a identificação de diferenças significativas.

A correlação entre a contagem de OPG e L3 foi verificada pelo teste de Spearman. Todas as análises utilizaram o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à variável OPG, os valores dos grupos foram estatisticamente diferentes somente nos dias 8, 9 e 10 ( $P < 0,05$ ) (Figura 1). O T3 apresentou diferenças significativas em todas as comparações analisadas nestes dias (Tabela 1), o que pode ser justificado pelo aumento dos valores de OPG deste grupo. Quando se avaliou as diferenças entre os 10 dias, todos os grupos mostraram-se semelhantes ( $P > 0,05$ ).

FIGURA 1: MÉDIA (+ ERRO PADRÃO) DA CONTAGEM DE OVOS POR GRAMA DE FEZES (OPG) DE EQUINOS APÓS INGESTÃO DE DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans*.



C: Controle, T1:  $25 \times 10^4$ ; T2:  $5 \times 10^5$  e T3:  $1 \times 10^6$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo. Asterisco (\*): Indica dias com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis.

Fonte: O autor (2012).

TABELA 1: COMPARAÇÃO DAS DIFERENÇAS MÍNIMAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMENTOS DENTRO DOS DIAS 8; 9; 10.

Grupos	T1	T2	T3
C	0,1	0,234	0,0006*
T1		0,770	0,0160*
T2			0,0080*
C	0,2	0,021	0,00008*
T1		0,212	0,0010*
T2			0,0160*
C	0,0	0,179	0,0004*
T1		0,428	0,0470*
T2			0,0090*

C: Grupo Controle, T1-  $25 \times 10^4$ , T2:  $5 \times 10^5$  e T3:  $1 \times 10^6$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo. Asterisco (\*): Indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre dois tratamentos pelo teste DMS (diferença mínima significativa).

FONTE: O autor (2012).

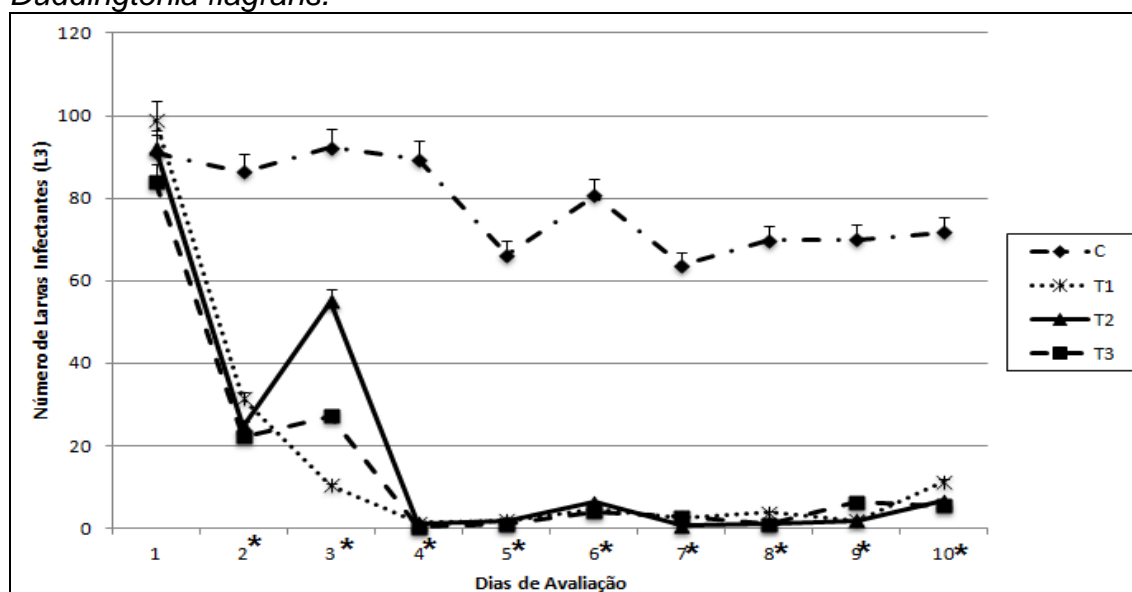
Segundo Waghorn *et al.* (2003), *D. flagrans* é um fungo predador de nematóides e somente exerce ação nos estágios larvais de vida livre dos parasitas. Concordando com estes autores, os resultados observados neste estudo demonstraram que *D. flagrans* não exerceu atividade direta sobre a OPG.

Em estudo transcorrido durante seis meses, Larsen *et al.* (1996) avaliaram o uso de *D. flagrans* no controle de endoparasitas de cavalo e observaram efeito ( $P < 0,05$ ) de redução na contagem de OPG nos últimos cinco meses do estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por Braga *et al.* (2009), os quais utilizaram micélios de *D. flagrans* na dosagem de 1g/10 Kg de peso vivo, administrado via oral, semanalmente, durante seis meses. No entanto, o efeito ( $P < 0,05$ ) foi observado após dois meses de avaliação. Tabela *et al.* (2011) observaram 87,5% de redução no OPG após um mês de avaliação, utilizando mesma dosagem e formulação, com o fungo *Monacrosporium thaumasium*. A redução nos valores de OPG pode ser

atribuída à ação indireta do fungo, o qual atua na redução do número de larvas infectantes presentes na pastagem, redução da ingestão de larvas pelos animais e conseqüentemente redução da carga parasitária animal e da eliminação de ovos nas fezes.

Na contagem de larvas infectantes, os grupos apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) nos dias 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10 (Figura 2). O T3 demonstrou-se superior aos demais, revelando maior número de comparações significativas ( $P < 0,05$ ) entre tratamentos (Tabela 2) ao longo do período avaliado. No dia 10, os grupos T2 e T3 apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) mostrando-se superiores ao T1. Quando se avaliou diferenças entre os dias, o grupo Controle foi semelhante ao longo dos 10 dias ( $P > 0,05$ ), porém, T1; T2 e T3 apresentaram diferenças ( $P < 0,05$ ) dentro o período avaliado.

FIGURA 2: MÉDIA (+ ERRO PADRÃO) DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans*.



C: Grupo controle; T1:  $25 \times 10^4$ ; T2:  $5 \times 10^5$ ; T3:  $1 \times 10^6$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo. Asterisco (\*): Indica dias com diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre os grupos pelo teste Kruskal-Wallis.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 2: COMPARAÇÃO DAS DIFERENÇAS MÍNIMAS SIGNIFICATIVAS ENTRE TRATAMENTOS DENTRO DOS DIAS 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10.

Dias	Grupos	T1	T2	T3
<b>2</b>	C	0,0030*	0,0015*	0,0012*
	T1	-	0,7400	0,6500
	T2	-	-	0,9100
<b>3</b>	C	0,001*	0,1	0,0001*
	T1	-	0,0001*	0,1
	T2	-	-	0,0001*
<b>4</b>	C	0,0017*	0,0025*	0,00004*
	T1	-	0,8600	0,0820
	T2	-	-	0,0590
<b>5</b>	C	0,0019*	0,0076*	0,0003*
	T1	-	0,5200	0,4200
	T2	-	-	0,1600
<b>6</b>	C	0,0040*	-	0,0110*
	T1	-	0,1600	0,6200
	T2	-	-	0,3500
<b>7</b>	C	0,0002*	0,000008*	0,0040*
	T1	-	0,0860	0,1820
	T2	-	-	0,0050*
<b>8</b>	C	0,0060*	-	0,0003*
	T1	-	0,2100	0,1900
	T2	-	-	0,9300
<b>9</b>	C	0,0010*	0,0010*	0,0290*
	T1	-	1,0000	0,1350
	T2	-	-	0,1350
<b>10</b>	C	-	0,022*	0,032*

Asterisco (\*): Indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre dois tratamentos pelo teste DMS (diferença mínima significativa). C: Grupo Controle, T1:  $25 \times 10^4$ , T2:  $5 \times 10^5$  e T3:  $1 \times 10^6$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo.

FONTE: O autor (2012).

Os valores de percentual de redução larval estão demonstrados na Tabela 3. O T1 apresentou percentual de redução larval em coprocultura variando entre 64,95 a 98,43%. Entretanto, o teste de Spearman demonstrou correlação positiva entre a contagem de OPG ( $p=0,001$ ) e contagem de L3 ( $p=0,004$ ) nos tratamentos Controle e T1. Neste caso, o percentual de redução larval observado no T1 estaria associado ao OPG e não pode ser condicionado

à ação do fungo. Para o respectivo isolado, esta dosagem pode ter sido limitante para alcançar redução larval estatisticamente significativa.

TABELA 3. MÉDIA DO PERCENTUAL (%) DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* DURANTE 5 DIAS.

Trat.	Período de tratamento					Período pós-tratamento				
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10
T1	0	64,95*	88,61*	98,43*	97,17*	94,20*	95,92*	94,56*	97,42*	84,20
T2	0	72,52*	40,27*	98,65*	97,38*	98,65	99,05*	98,38	97,24*	90,70*
T3	0	75,27*	70,59*	99,69*	98,49*	94,95*	95,60*	98,66*	91,04*	92,37*

G: Grupo; D: Dia; C: Grupo Controle, T1:  $25 \times 10^4$ , T2:  $5 \times 10^5$  e T3:  $1 \times 10^6$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo.

Asterisco (\*): Indica diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre dois tratamentos pelo teste DMS (diferença mínima significativa).

FONTE: O autor (2012).

O T2 e T3 apresentaram percentual de redução larval entre 40,27 e 99,05%; 70,59 e 99,69% (Tabela 3), respectivamente. Nestes grupos não foi constatada correlação entre as variáveis OPG e L3 ( $P > 0,05$ ). Ou seja, a redução na contagem de L3 não foi acompanhada pelo OPG. Pode-se concluir que a elevada redução do número de larvas infectantes ocorreu devido à atividade predatória do *D. flagrans*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Fernandez *et al.* (1999), porém utilizando concentração de clamidósporos 10 vezes superior a maior dosagem utilizada neste estudo, observando 98,4% de redução larval na coprocultura. Como parte do mesmo estudo, os pesquisadores avaliaram a ação na redução de larvas infectantes na pastagem, constatando eficácia entre 85,8% e 99,4%. Em estudo transcrito durante seis meses, Braga *et al.* (2009), obtiveram melhores resultados no quinto mês de avaliação, com 68,5%

de redução larval em coprocultura, enquanto na pastagem a redução máxima ao longo do período foi de 82,5%.

Esses dados confirmam que a atividade predatória de *D. flagrans* é variável, podendo ser influenciada por inúmeros fatores. Mota *et al.* (2003), ressaltam que as condições climáticas podem afetar diretamente o desenvolvimento e atividade de um fungo. Os autores recomendam que isolados fúngicos com características predatórias promissoras sejam avaliados em condições climáticas variadas. Além disso, variáveis ambientais e/ou do microambiente fecal também estão associados ao potencial nematófago de um fungo. Paz-silva *et al.* (2011) avaliaram a relação de *D. flagrans* com a carga endoparasitária em equinos, utilizando quatro concentrações de clamidósporos (0.1, 0.2, 0.4 e  $0.8 \times 10^6/100\text{g}$  de fezes) aplicadas em solução diretamente sobre as fezes de animais, na pastagem. Foi constatado que o fungo adaptou-se a quantidade de parasitas presentes nas fezes. Conforme Mota *et al.* (2003) no bolo fecal o desenvolvimento do fungo é estimulado pelo contato com um número crescente de larvas infectantes e também por nematóides de vida livre. Dessa forma, os resultados oriundos de percentual de redução larval em coprocultura não podem ser extrapolados para o percentual de redução larval na pastagem.

Fontenot *et al.* (2003), afirmaram que a capacidade dos fungos predadores em combater os nematóides pode ser avaliada pela recuperação das L3 nos cultivos fecais e o percentual de redução indica a eficácia do fungo em controlar as larvas presentes no material fecal. Ressalta-se que estudos laboratoriais são importantes para encontrar os fungos com maior potencial para biocontrole. Entretanto, são limitados, pois superestimam a capacidade

predatória dos fungos em ambiente restrito, no qual não são reproduzidas as reais interferências do clima, do solo e da pastagem e as larvas não conseguem escapar da ação do fungo (CAMPOS *et al.*, 2009).

O conhecimento do tempo de eliminação após ingestão de um fungo determinará a implantação de intervalos entre dosagens. Considerando a importância deste fator alguns pesquisadores buscaram avaliar a eliminação de clamidósporos de *D. flagrans* em diferentes espécies. Em ovinos, Ojeda-Robertos *et al.* (2008) observaram a presença dos esporos nas fezes entre 24 e 144 h após administração da última dosagem. Em bovinos, Silva *et al.* (2013), avaliaram a atividade *D. flagrans* 12; 15; 18; 21; 24; 48 e 72 h após seu consumo, observando maior atividade predatória (98,3%) 72 h após a ingestão do fungo. Em equinos, Larsen *et al.* (1995), observaram eliminação de clamidósporos até 80 h após sua ingestão. Resultados semelhantes foram constatados por Araujo *et al.* (2010), os quais avaliaram a eficácia de *D. flagrans* 12; 24; 48 e 72 h pós-tratamento. Obtendo, nesta última avaliação, o maior percentual de eficácia.

Resultados superiores foram observados neste estudo, no qual o percentual de redução larval (Tabela 3) dos grupos tratados permaneceu em nível constante até o dia nove, ou seja, 96 h após a ingestão do fungo. Somente após 120 h, que compreende a última administração dos tratamentos, observou-se redução dos valores. Nesta avaliação o T2 e T3 foram significantes ( $P < 0,05$ ) quando comparados ao grupo C (Tabela 2). Menor decréscimo no percentual de redução larval foi observado no T3, composto pela maior concentração fúngica, o qual apresentou valores entre 70,59 e 99,69% no decorrer dos 10 dias de observação. A atividade predatória

demonstrou-se dose-dependente, estando o maior tempo de ação e menor número de L3 associados ao tratamento composto pela maior dosagem de clamidósporos, correspondente ao T3.

A estipulação de intervalos entre tratamentos é um fator de extrema importância para promover a aplicação de *D. flagrans* rotineiramente como método de controle biológico. Este estudo demonstrou que com intervalos de até 96h pós-tratamento o fungo ainda promoveu redução contínua do número de L3 em coprocultura. Indicando que não há necessidade de administração diária aos animais. Além disso, considerando-se cavalos mantidos em sistemas extensivos, o tratamento ainda pode ser reforçado pela frequente ingestão de clamidósporos juntamente com o pasto (LARSEN, 2000).

Isso se justifica pelo fato de que após a eliminação, fezes de animais tratados (contendo clamidósporos) são rapidamente colonizadas pelo fungo, quando em condições ambientais favoráveis. Ocorrendo também dispersão de esporos para áreas de pastagem adjacente (LARSEN, 2000). Podendo assim promover a ingestão do fungo inclusive por outros animais que estejam alocados na mesma pastagem. Seu uso a médio e/ou longo prazo pode ser inserido como uma medida extremamente positiva para reduzir a contaminação da pastagem por L3 e conseqüentemente a taxa de infecção dos animais. Podendo atuar como método auxiliar de controle parasitário, reduzindo o uso de compostos anti-helmínticos, a dependência a esses produtos e a pressão de seleção para a resistência parasitária.

### 3.4. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que com administrações diárias, o fungo passou a reduzir continuamente o número de L3 após o 3º dia de uso nas três dosagens avaliadas.

Nas condições deste estudo, as dosagens de  $5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  clamidósporos  $\text{Kg}^{-1}$  de *D. flagrans* podem ser inseridas na alimentação de equinos com intervalos de até 120 h, proporcionando redução significativa no número de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais.

## REFERÊNCIAS

ARAUJO, J.M. *et al.* *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. **Parasitology Research**, v. 107, n.1, p. 103-108, 2010.

BRAGA, F.R. *et al.* Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: *Cyathostominae*) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.163, n.4, p. 335-340, 2009.

CAMPOS, A.K. *et al.* Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. **Parasitology Research**, n.105, p. 913–919, 2009.

CANEVER, R.J. *et al.* Lack of *Cyathostomin* sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.194, n.1, p. 35–39, 2013.

FERNÁNDEZ, A.S. *et al.* A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* as biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. **Equine Veterinary Journal**, n.31, p. 488–491, 1999.

FONTENOT, M.E. *et al.* Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.3, p. 203-213, 2003.

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

LARSEN, M. *et al.* Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. **Veterinary Parasitology**, v.60, p. 315-320, 1995.

LARSEN, M. *et al.* The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology**, v.113, p.1-6, 1996.

LARSEN M. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v.120: S121-S131, 2000.

MENDOZA-DE-GUIVES, P. *et al.* Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v.119, p. 95–104, 1999.

MOLENTO, M.B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1469-1477, 2005.

MOTA, M.A. *et al.* Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

OJEDA-ROBERTOS, N. F. *et al.* Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p. 329-335, 2008.

PAZ-SILVA, A. *et al.* Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamyospores. **Veterinary Parasitology**, n.179, p. 277–282, 2011.

ROBERTS, F.H.S; O’SULLIVAN, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Agricultural Research**, v.1, p. 99, 1950.

SILVA, M.E. *et al.* Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, ahead of print Epud, Mar 26, 2013.

TAVELA, A.O. *et al.* Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in

tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.175, v.1-2, p. 92-96, 2011.

WAGHORN, T.S. *et al.* Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastro-intestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.4, p. 227-234, 2003.

#### 4. *Duddingtonia flagrans* NO CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS: AVALIAÇÃO A LONGO PRAZO E *IN VITRO*

##### Resumo

O controle das parasitoses gastrintestinais em equinos é imprescindível. Entretanto atualmente se observa resistência destes parasitas à maior parte dos medicamentos disponíveis para seu combate. Dessa forma, necessita-se de medidas alternativas ou suplementares de controle parasitário, na qual se pode inserir o controle biológico. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do fungo *Duddingtonia flagrans* frente à larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de equinos em cultura fecal e no meio ambiente, após passagem pelo trato gastrintestinal dos animais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por três grupos tratados (G1, G2 e G3) e um grupo controle (C), com oito animais testes cada. Os tratamentos consistiram em clamidósporos de *D. flagrans* em três titulações: (G1)  $1,5 \times 10^5$ ; (G2)  $3 \times 10^5$  e (G3)  $6 \times 10^5$   $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo animal (PV). A pesquisa *in vivo* transcorreu em um período de 30 dias, com administração de tratamentos e coleta de fezes a cada 3 dias. Dia 0 – dia 21, correspondeu ao período de administração dos tratamentos e dia 24 – dia 30 à coleta de fezes para avaliações pós-tratamento. Foi realizada contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e cultura fecal, individualmente, por avaliação. Para a etapa desenvolvida no meio-ambiente, foram delimitadas 36 áreas de  $1 \text{ m}^2$  cada, número equivalente para a distribuição de repetições em triplicata para cada grupo, com amostras de fezes coletadas de todos os animais nas seguintes fases do experimento *in vivo*: Dia 0(D0), dia 15 (D15) e dia 30 (D30). As fezes foram depositadas na pastagem e após 14 e 21 de cada etapa de deposição foi avaliado o número de larvas infectantes presentes nos bolos fecais e na pastagem. Para a variável OPG, todos os grupos demonstraram resultados semelhantes ( $P > 0,05$ ). Com intervalos de 72 horas entre tratamentos, *D. flagrans* reduziu significativamente o número de L3 obtidas de cultura fecal. Nas dosagens de  $3 \times 10^5$  (G2) e  $6 \times 10^5$  (G3) clamidósporos  $\text{Kg}^{-1}$  o fungo promoveu redução significativa na contagem de larvas infectantes obtidas de coprocultura, diferindo ( $P > 0,05$ ) do grupo C. A temperatura média registrada durante o período experimental foi desfavorável ao desenvolvimento e à atividade predatória do fungo, prejudicando a avaliação de sua atividade predatória no meio-ambiente. Recomenda-se que novos estudos sejam planejados e desenvolvidos baseando-se nas características climáticas de cada região e do período em que a pesquisa será desenvolvida.

Palavras-chave: Parasita, fungo, pastagem, larvas infectantes, coprocultura.

#### **4. *Duddingtonia flagrans* IN THE CONTROL OF GASTROINTESTINAL NEMATODE IN HORSES: LONG-TERM EVALUATION AND *IN VITRO***

##### **Abstract**

The control of gastrointestinal parasites in horses is essential, however currently is observed that these parasites are resistant to the most drugs available to combat it. The aim of this study was to evaluate the activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against infective larvae of gastrointestinal nematodes of horses in fecal culture and on environment, after passage through the gastrointestinal tract of the animals. The experimental design was completely randomized, with three treated groups (G1, G2 and G3) and a control group (C), with eight animals tests each. The treatments consisted of chlamydospores of *D. flagrans* in three titrations: (G1)  $1.5 \times 10^5$ ; (G2)  $3 \times 10^5$  and (G3)  $6 \times 10^5 \text{ kg}^{-1}$  of live weight (LW). The research in vivo was carried out during 30 days, with administration of treatments and collect of feces every 3 days. Day 0 - Day 21, corresponded to the period of administration of treatments and Day 24 – Day 30 to the period of analysis after treatment. Was performed counting of Eggs per gram of feces (EPG) and fecal culture, individually, to each evaluation. To the stage developed in the environment, 36 areas of  $1 \text{ m}^2$  each were delimited on the pasture, equivalent to the distribution of repetitions in triplicate for each group of stool samples collected from all animals in the stages: Day 0 (DO), day 15 (D15) and day 30 (D30). Feces were deposited on the pasture and after 14 and 21 days of each deposition step was evaluated the number of infective larvae present in the dungs and on the pasture. For the variable EPG all groups showed similar results ( $P > 0.05$ ). With intervals of 72 hours between treatments, *D. flagrans* reduced the number of L3 obtained of fecal culture. At dosages of  $3 \times 10^5$  (G2) and  $6 \times 10^5$  (G3) chlamydospores per  $\text{kg}^{-1}$  the fungus caused a significant reduction in the count of infective larvae recovered from stool cultures, differing ( $P < 0.05$ ) of the group C. The average temperature during the experimental period was unfavorable to the development and predatory activity of the fungus, impairing the evaluation of their predatory activity about environment conditions. It is recommended that further studies be designed and developed based on climate characteristics of each region and of the period in which the research will be developed.

Key-words: Endoparasites, fungus, pasture, infective larvae, fecal culture.

## 4.1 Introdução

Os equinos são hospedeiros de uma grande variedade de endoparasitas, dentre os quais os helmintos destacam-se como os mais importantes e prevalentes (LYONS *et al.*, 1999). No geral, podem ocasionar inúmeros prejuízos econômicos e produtivos, com consequências diretas no desempenho e na produtividade dos animais. Dentre algumas consequências diretas, destacam-se: retardo no desenvolvimento, anemia, perda de peso, distúrbios intestinais e até morte dos animais (QUINELATO *et al.*, 2008). Segundo Molento (2005), em cavalos, as parasitoses intestinais podem promover desde um pequeno desconforto abdominal até episódios fulminantes de cólica e morte.

O controle desses agentes torna-se imprescindível para que se possa promover o manejo sanitário de um sistema produtivo. Para esta finalidade, antiparasitários comerciais são tradicionalmente usados como a única ferramenta, principalmente por sua praticidade, facilidade de aquisição e por sua ótima relação custo-benefício (MOLENTO, 2005). Porém, na maioria das vezes o uso desses produtos ocorre de maneira indiscriminada e sem a associação de estratégias de controle adequadas, fato responsável por acelerar o desenvolvimento de resistência destes parasitos aos medicamentos disponíveis para seu controle (MATTHEWS *et al.*, 2004). Atualmente, observa-se resistência destes agentes à maior parte das classes de antiparasitários disponíveis, principalmente em relação ao controle parasitário em equinos (KAPLAN *et al.*, 2004) no qual muitas vezes a resistência ocorre frente a todas as classes anti-helmínticas.

Diante destes fatores, ressalta-se a necessidade de formas alternativas ou suplementares de controle parasitário, na qual se pode inserir o controle biológico de parasitas. Este se refere à diminuição da população parasitária pela utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente cujas ações se concentram sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, não atuando, até onde se sabe, sobre estágios internos de parasitos (MOTA *et al.* 2003).

Apesar dos inúmeros agentes com potencial no controle biológico de helmintos, os fungos nematófagos têm demonstrado os maiores avanços nas pesquisas do assunto (ARAUJO *et al.*, 2004), tanto *in vitro* como em condições naturais (LARSEN *et al.*, 1992, 1995; PAZ-SILVA *et al.*, 2011; SAGÜÉS *et al.*, 2011). Nesta modalidade, *D.flagrans* destaca-se como uma das espécies mais estudadas, apresentando muitas vantagens. Possuindo capacidade de produzir grande quantidade de clamidósporos, estruturas reprodutivas com parede espessa e altamente resistente, que se ingeridos, percorrem o trato gastrointestinal dos animais e permanecem viáveis quando nas fezes, colonizando-as logo após a sua deposição no solo (LARSEN *et al.*, 1999). No bolo fecal, o desenvolvimento do fungo é estimulado pelo contacto com um número crescente de larvas infectantes e também por nematóides de vida livre. Com a colonização, os clamidósporos podem atingir a pastagem, sendo frequente sua ingestão juntamente com o pasto (MOTA *et al.*, 2003).

A ação de fungos nematófagos esta concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate das larvas de vida livre dos parasitos (ARAUJO *et al.*, 1998; CASTRO *et al.*, 2003). Dessa forma, *D.flagrans* poderá ser aplicado como forma de reduzir a presença de larvas infectantes nas pastagens e

conseqüentemente a reinfestação dos animais, assim como promover a profilaxia das endoparasitoses (MOTA *et al.*, 2003). Além disso, destaca-se como uma alternativa auxiliar a ser incluída em programas de manejo sanitário integrado para controle de doenças parasitárias em equinos, buscando reduzir a dependência aos anti-helmínticos e conseqüentemente a seleção para parasitas resistentes.

Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade de *D. flagrans* frente à larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de equinos em cultura fecal e no meio ambiente, após passagem pelo trato gastrintestinal dos animais.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Isolado fúngico**

Foi utilizado *D. flagrans*, isolado CG 768, processado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, Campos de Goytacazes, RJ. O fungo foi cultivado utilizando milho triturado como meio para crescimento, a uma temperatura entre 23 e 27°C, na ausência de luz por 21 dias. Posteriormente, o material foi secado em estufa a 25°C. Após secagem retirou-se amostras de 10 gramas adicionou-se 100 mL de água destilada. O material foi homogeneizado, filtrado e em seguida realizou-se contagem de clamidósporos utilizando câmara de Neubauer, em triplicata. Foi determinado o número de clamidósporos por mL e posteriormente associou-se o volume e o peso utilizados para obtenção do número de clamidósporos por grama de milho triturado.

#### 4.2.2. Experimento *in vivo*

O estudo *in vivo* foi desenvolvido no Regimento de Polícia Montada “Coronel Dulcídio” do Estado do Paraná, localizado em Curitiba, PR, de fevereiro a março de 2013, totalizando 30 dias. Foram utilizados 32 cavalos adultos, machos e fêmeas, mantidos em baias individuais durante todo o período experimental. A Seleção dos animais, assim como a formação dos grupos baseou-se na contagem de OPG.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por três grupos tratados (G1, G2 e G3) e um grupo controle (C), com oito animais testes cada. Os tratamentos consistiram em clamidósporos de *D. flagrans* em três titulações: (G1)  $1,5 \times 10^5$ ; (G2)  $3 \times 10^5$  e (G3)  $6 \times 10^5 \text{ kg}^{-1}$  de peso vivo animal (PV). Os grupos tratados receberam o fungo associado ao milho triturado, juntamente com 300g de aveia em grãos e o grupo controle recebeu somente a aveia. Os tratamentos foram administrados em cochos individuais, entre sete e oito horas da manhã, a cada três dias (72 horas). A pesquisa *in vivo* transcorreu em um período de 30 dias (ANEXO 1), sendo do dia zero ao dia 21, correspondente ao período de administração dos tratamentos e dia 24 ao dia 30 às avaliações pós-tratamento. Dessa forma, os tratamentos foram administrados aos animais oito vezes com intervalos de três dias e após foram realizadas três coletas de fezes para avaliações pós-tratamento. Durante todo período experimental, as amostras fecais foram coletadas no mesmo horário estabelecido para administração dos tratamentos.

#### 4.2.3 Análises laboratoriais

A contagem de ovos por grama de fezes (OPG) foi realizada conforme método de Gordon e Whitlock (1939) modificado na concentração de 26 ml de solução saturada e 4g de fezes. Todas as amostras foram analisadas individualmente e posteriormente, foi determinada a média para cada grupo, por avaliação. A coprocultura foi realizada conforme Roberts e O'Sullivan (1950), individualmente, por dia avaliado. O material foi acondicionado em estufa BOD (28°C e 60% URA) por 10 dias. As larvas infectantes recuperadas de cada amostra foram quantificadas em triplicata sendo calculada a média para cada repetição e posteriormente a média para cada grupo, por avaliação. Calculou-se o percentual de redução larval dos tratamentos para cada dia de avaliação, conforme Mendoza-de- Guives *et al.* (1999):

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{Média de L3 do grupo controle} - \text{Média de L3 do grupo tratado} \times 100}{\text{Média de L3 do grupo controle}}$$

#### 4.2.4 Avaliação da atividade de *Duddingtonia flagrans* no meio-ambiente

Esta etapa foi desenvolvida em uma área de pastagem do Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, localizada no bairro Cabral em Curitiba, PR. A área foi avaliada, mensurada e cercada. O pasto foi roçado até alcançar aproximadamente 15 cm de altura. Realizou-se lavagem de pasto (MOLENTO, 2001) prévia para avaliar a presença de larvas infectantes de parasitas gastrintestinais.

No local foram delimitados 36 áreas de 1 m<sup>2</sup> cada (ANEXO 6), para a distribuição de repetições em triplicata para cada grupo. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde os grupos foram distribuídos ao acaso dentre as áreas. Essa etapa teve duração de durante 51 dias e foi desenvolvida paralelamente ao experimento *in vivo*. Para tal, foram usadas amostras de fezes de todos os animais, coletadas nas seguintes avaliações: D0, D15 e D30.

As amostras foram separadas por grupo e homogeneizadas, buscando-se obter 1,5Kg/grupo/repetição em cada coleta. Após pesagem e identificação as amostras foram manualmente depositadas na pastagem. Para cada fase de coleta e deposição das fezes foram realizadas duas avaliações (ANEXO 1), aos 14 (Dx+14) e aos 21(Dx+21) dias após a colocação das amostras nas áreas correspondentes. As avaliações consistiram em contagem de larvas infectantes na pastagem e nos bolos fecais correspondentes a cada grupo, por avaliação.

Amostras de pastagem foram obtidas cerca de 80% próximas (até 20 cm) e 20% distantes (20 cm – 1m) dos bolos fecais, mas posteriormente foram juntadas e homogeneizadas a fim de se obter uma única amostra de cada repetição. A contagem de larvas Kg/MS foi procedida conforme técnica de lavagem de pasto descrita por Molento (2001).

Para determinação do número de L3 nos bolos fecais procedeu-se a técnica de Baermann (CORT *et al.*, 1922). Em cada avaliação, porções dos bolos fecais foram removidas e para realização da técnica padronizou-se a utilização de 20 g de fezes de cada amostra. Uma porção de cada bolo fecal foi

separada para determinação da MS. O resultado foi determinado como o número de larvas por Kg/MS.



FIGURA 1: EXEMPLO DE UMA DAS 36 ÁREAS USADAS PARA DEPOSIÇÃO DAS FEZES DE EQUINOS NA PASTAGEM APÓS TRATAMENTO COM DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans*. Legenda: a= Bolo fecal manualmente depositado; b= Marcação limite da área; c= Identificação da repetição.

#### 4.2.5 Variáveis climáticas

Dados climáticos correspondentes ao período experimental foram solicitados ao Instituto Tecnológico SIMEPAR, localizado em Curitiba, PR. Foram considerados: temperatura ambiental máxima, média e mínima; precipitação (mm) e umidade relativa do ar. Os registros foram obtidos com periodicidade diária, relativos ao período de 01 de fevereiro a 30 de abril de 2013. Primeiramente foram analisadas as variações diárias e após calculou-se médias mensais para cada uma das variáveis.

#### 4.2.6 Análise estatística

Os resultados de contagem de OPG e L3 foram submetidos ao teste de normalidade de Lilliefors. Como a normalidade não foi comprovada, aplicou-se o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação dos quatro grupos (C, G1, G2, G3) em cada avaliação. O teste de Friedman foi utilizado para avaliar diferenças entre as avaliações.

A correlação entre a contagem de L3 por Kg/MS nos bolos fecais e na pastagem foi verificada pelo teste de Spearman. Todas as análises utilizaram o software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2013).

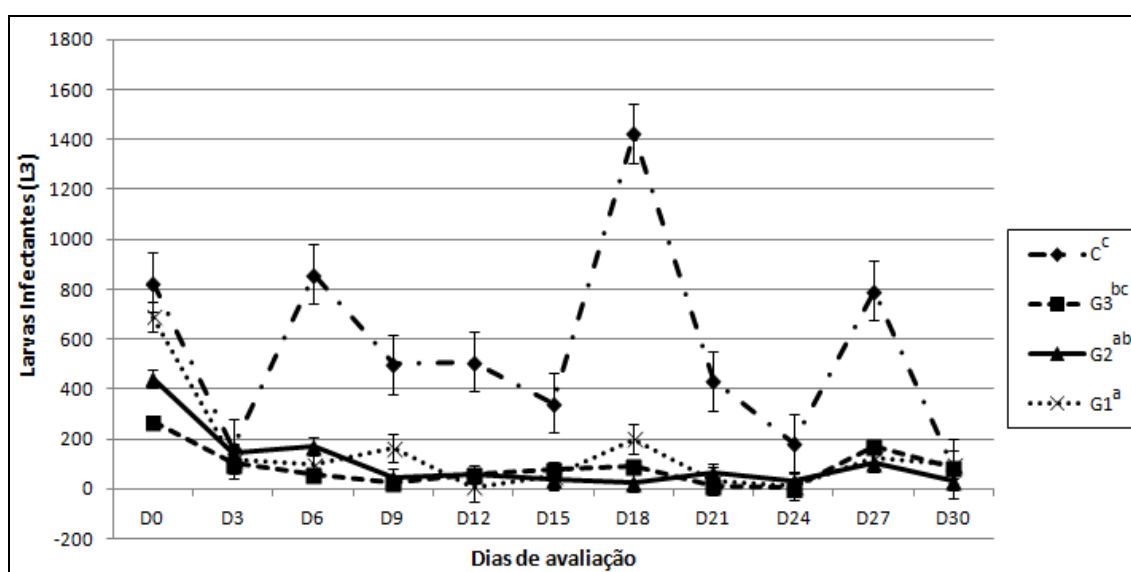
### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a variável OPG todos os grupos demonstraram resultados semelhantes ( $P > 0,05$ ) ao longo das avaliações, semelhante ao observado por Larsen *et al.* (1996) e De Almeida *et al.* (2012). O que se explica pelo fato de *D. flagrans* não apresentar atividade predatória sobre parasitos adultos, mas sim nas formas pré-parasitárias dos nematóides presentes no ambiente (MADEIRA DE CARVALHO *et al.*, 2007), podendo reduzir a presença de L3 no ambiente e conseqüentemente a taxa de reinfecção dos animais.

Alguns estudos já demonstraram efeito do uso de fungos nematófagos sob a contagem de OPG. Braga *et al.* (2009) constataram redução significativa de OPG de cavalos com administrações de *D. flagrans* a cada 15 dias, durante seis meses. O resultado foi atribuído como secundário à atividade predatória do fungo, promovido pela redução de larvas infectantes na pastagem e

consequentemente da taxa de reinfecção dos animais. Tavela *et al.* (2011) avaliaram o uso de *Monacrosporium thaumasium* em cavalos, administrados duas vezes por semana, também durante seis meses. A contagem de OPG do grupo tratado diferiu ( $P < 0,01$ ) do grupo controle durante todos os meses do estudo.

FIGURA 2: MÉDIA (+/- DESVIO PADRÃO) DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE FEZES DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* DURANTE 21 DIAS.



C: Grupo controle; G1:  $1,5 \times 10^5$ ; G2:  $3 \times 10^5$ ; G3:  $6 \times 10^5$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo. Letras minúsculas sobrescritas na legenda indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Friedman. FONTE: o autor (2013).

Na contagem de larvas infectantes (Figura 1) referentes a cada avaliação, todos os grupos mostraram-se semelhantes ( $P > 0,05$ ). Entretanto, ao considerar-se o total de avaliações o G3 foi superior ( $P < 0,05$ ) ao G1 e ao C, sem diferir ( $P > 0,05$ ) do G2. Enquanto o G1 foi semelhante ( $P > 0,05$ ) ao C e não diferiu ( $P > 0,05$ ) do G2. Indicando que com administrações repetidas a cada 72 h, apenas as dosagens de  $6 \times 10^5$  (G3) e  $3 \times 10^5$  (G2) clamidósporos por

kg<sup>-1</sup> foram efetivas, gerando redução significativa (P<0,05) de larvas infectantes.

TABELA 1: MÉDIA DO PERCENTUAL (%) DE REDUÇÃO DE LARVAS INFECTANTES OBTIDAS DE COPROCULTURA DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* DURANTE 21 DIAS.

Trat.	Administração dos tratamentos								Pós-tratamento		
	D0	D3	D6	D9	D12	D15	D18	D21	D24	D27	D30
G3*	0	37,24	93,22	95,01	88,73	77,11	93,05	97,13	98,62	78,26	0
G2*	0	12,24	80,04	91,51	89,05	89,64	98,30	84,67	83,87	86,66	62,77
G1	0	27,04	88,95	67,39	98,53	85,06	86,02	92,91	94,01	84,35	0

Trat.: Tratamento; G1: 1,5x10<sup>5</sup>, G2: 3x10<sup>5</sup> e G3: 6x10<sup>5</sup> clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por kg<sup>-1</sup> de peso vivo. Asterisco (\*) indica efeito significativo (P<0,05) pelo teste de Friedman.

FONTE: o autor (2013).

Em relação aos percentuais de redução larval (Tabela 1), o G1 apresentou valores de 27,04% até 94,01% e o G2 de 12,24% a 83,87%, ambos para D3 e D24, respectivamente. Enquanto o G3 demonstrou os melhores resultados, com redução de 37,24% a 98,62%, para D3 a D24.

Para equinos, administrado a cada 72 horas, o isolado CG 768 de *D. flagrans* na dosagem de 1,5x10<sup>5</sup> clamidósporos por kg<sup>-1</sup> (G1) mostrou-se limitante para a redução significativa de L3 em coprocultura. Enquanto na dosagem de 6x10<sup>5</sup> kg<sup>-1</sup>, correspondente à maior concentração de clamidósporos testada (G3) mostrou-se altamente eficaz. Resultados inferiores foram obtidos por (DE ALMEIDA *et al.*, 2012), os quais avaliaram *D. flagrans* na dosagem de 10<sup>6</sup> clamidósporos por Kg<sup>-1</sup>, administrado diariamente à cavalos, durante 5 meses. Somente no quinto mês do estudo foi observada redução significativa de L3 obtidas de coprocultura do grupo tratado.

Também com administrações diárias, Madeira de Carvalho *et al.* (2007) testaram *D. flagrans* na dosagem de 5x10<sup>5</sup> clamidósporos por Kg<sup>-1</sup> em equinos,

obtendo percentual de redução larval de 62-72%. Enquanto Larsen *et al.* (1995), registraram redução de L3 de ciatostomíneos de 90-99%, mas com uma dose diária superior, de  $5 \times 10^6$  –  $5 \times 10^7$  clamidósporos por  $\text{Kg}^{-1}$ . Já Fernández *et al.* (1997; 1999) observaram percentuais de redução larval em de 99,7% e 99,6%, respectivamente. Entretanto, as dosagens avaliadas por estes autores foram de  $10^6$  até  $5 \times 10^6$  clamidósporos por  $\text{Kg}^{-1}$ , com administrações diárias. Tavela *et al.* (2013) testaram duas dosagens da associação de *D. flagrans* e *M. Thaumassium*, em dose única, frente a larvas infectantes de ciatostomíneos. A atividade predatória foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os grupos tratados, mas diferiu ( $P < 0,05$ ) do grupo controle.

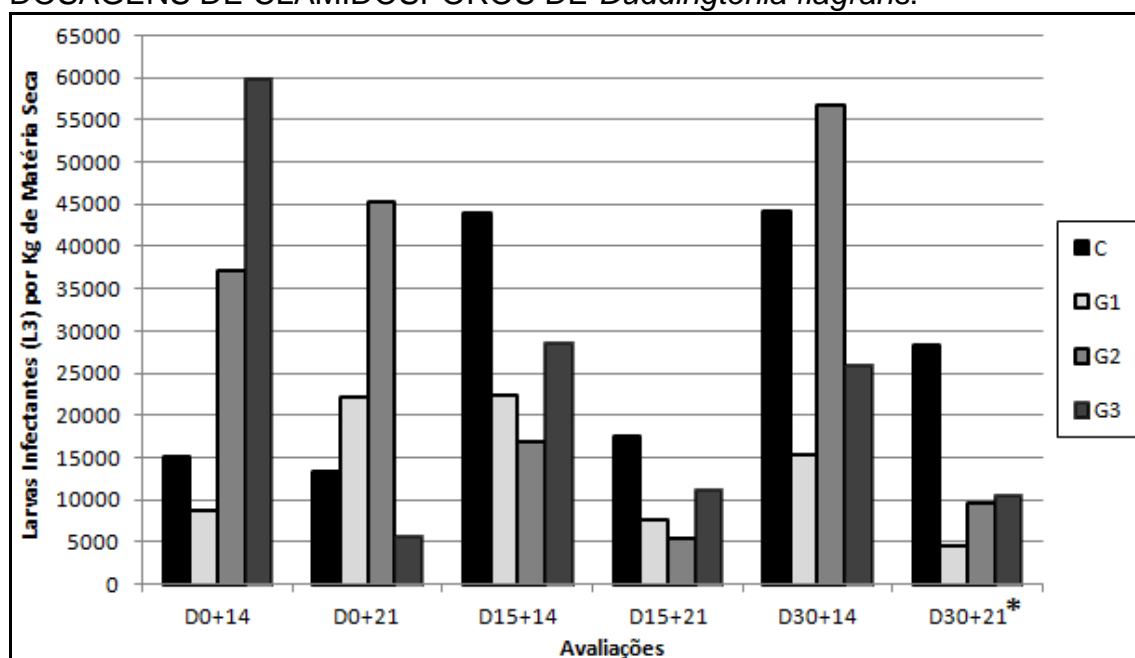
Nesse sentido, ressalta-se que o correto estabelecimento do intervalo entre tratamentos é um fator de extrema importância a ser avaliado, podendo ser determinante para a eficácia de um isolado. Para cavalos, clamidósporos de *D. flagrans* são eliminados juntamente com as fezes de 12-72 horas após a ingestão (ASSIS; ARAÚJO, 2003; ARAUJO *et al.*, 2010). Tavela *et al.* (2013) observaram que a coadministração de micélios *D. flagrans* and *M. thaumasium* peletizados em alginato de sódio obedece a esse mesmo período de eliminação. Enquanto o isolado CG 768 de *D. flagrans* demonstrou ser eliminado nas fezes até 120 h após sua ingestão, intervalo no qual ainda apresentou efeito ( $P < 0,05$ ) na redução de larvas infectantes (dados presentes no capítulo anterior desta dissertação).

Tavela *et al.* (2011), administraram *M. thaumasium* à cavalos, duas vezes por semana, durante seis meses, observando redução significativa de larvas infectantes no grupo tratado somente três meses após o início do estudo. Aplicando metodologia semelhantes, Braga *et al.* (2009), testaram *D.*

*flagrans*, também administrado duas vezes por semana à cavalos, durante seis meses. Redução significativa na contagem de L3 foi obtida somente após três meses de administração do fungo, sendo 68,5% o maior valor constatado.

Conforme Mota *et al.* (2003), algumas características são fundamentais para que um fungo seja selecionado como candidato para uso no controle biológico de parasitas. Primeiramente, deve sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal dos animais, e quando eliminado nas fezes deve ser capaz de desenvolver-se e capturar as formas imaturas de parasitas presentes no bolo fecal. Assim, além de avaliar a atividade predatória de um fungo em condições ambientais controladas, como ocorre na coprocultura, deve-se também testá-lo frente a condições ambientais naturais, como na pastagem e no bolo fecal.

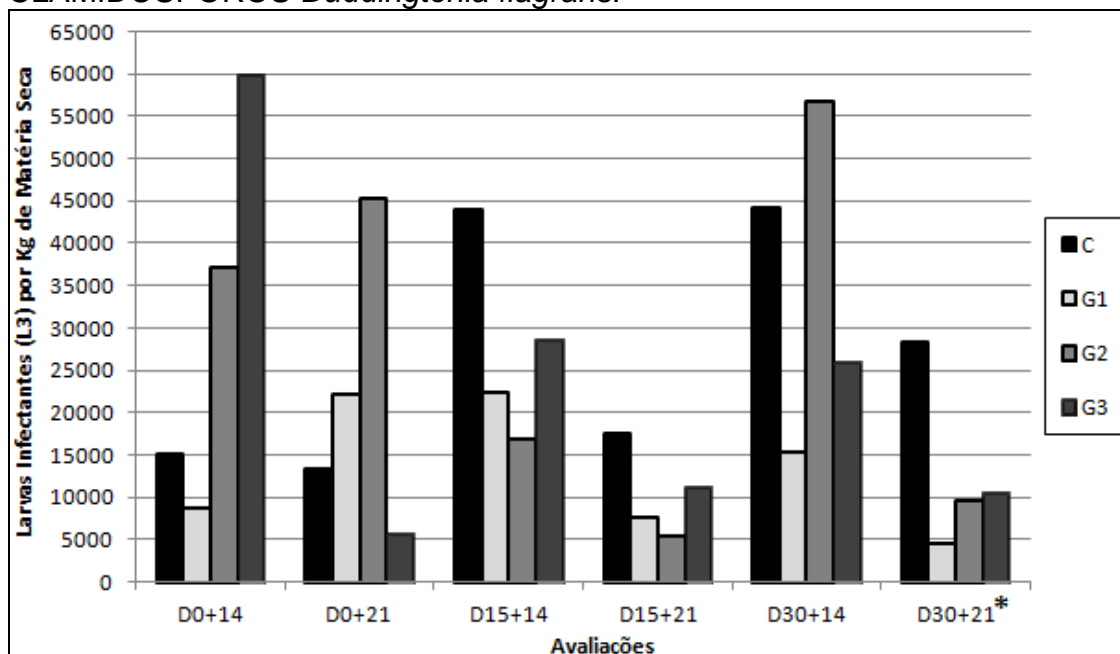
FIGURA 3: MÉDIA DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES POR kg DE MATÉRIA SECA RECUPERADAS DA PASTAGEM APÓS DEPOSIÇÃO ARTIFICIAL DE FEZES DE EQUINOS TRATADOS COM DIFERENTES DOSAGENS DE CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans*.



Trat.: Tratamento; G1:  $1,5 \times 10^5$ , G2:  $3 \times 10^5$  e G3:  $6 \times 10^5$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo. Asterisco (\*) indica avaliação com diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis.

FONTE: o autor (2013).

FIGURA 4: MÉDIA DO NÚMERO DE LARVAS INFECTANTES POR kg DE MATÉRIA SECA RECUPERADAS DE BOLOS FECAIS (artificialmente depositos na pastagem) DE EQUINOS APÓS TRATAMENTO COM CLAMIDÓSPOROS *Duddingtonia flagrans*.



Trat.: Tratamento; G1:  $1,5 \times 10^5$ , G2:  $3 \times 10^5$  e G3:  $6 \times 10^5$  clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* por  $\text{kg}^{-1}$  de peso vivo.

FONTE: o autor (2013).

Na avaliação da atividade de *D. flagrans* frente a L3 na pastagem (Figura 3) os grupos tratados demonstraram-se semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre si e também ao grupo controle, considerando 21 dias de permanência das fezes na pastagem. Enquanto ao avaliar-se cada dia de amostragem o D30+21 revelou diferença ( $P < 0,05$ ) entre os grupos C e G1, apresentando este menor número de L3. A contagem de L3 nos bolos fecais (Figura 4) de todos os grupos foi semelhante ( $P > 0,05$ ) em cada avaliação e também no decorrer de todas as mensurações realizadas. Os dados de L3 no bolo fecal e na pastagem demonstraram correlação negativa ( $P < 0,05$ ) ao longo do período experimental, indicando que o aumento do número de L3 na pastagem foi acompanhado pela diminuição dessa mesma variável nas fezes. Foi interessante observar que existe grande presença de larvas no bolo fecal mesmo após 2 a 3 semanas

após sua deposição. Isto pode implicar na contaminação constante da área de pastagem para os animais e no possível benefício do fungo uma vez que ele tenha condições de crescer e apreender as larvas – reduzindo a taxa de desafio larvar.

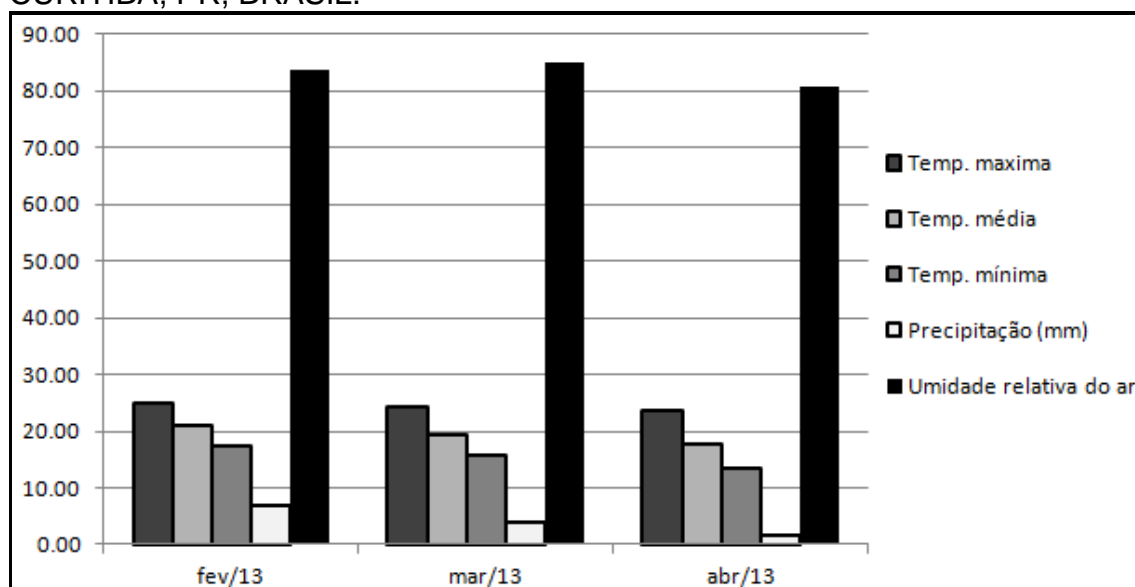
Algumas pesquisas já foram desenvolvidas buscando testar a atividade de *D.flagrans* frente a fatores ambientais e às variáveis climáticas. Para tal, fezes dos animais que receberam o fungo na dieta foram artificialmente depositados na pastagem, semelhante ao realizado no presente estudo. Em experimentos transcorridos durante cerca de quatro meses, Fernández *et al.* (1997; 1999) avaliaram a atividade de *D.flagrans* na redução de formas larvares de nematóides de equinos na pastagem, obtendo percentuais de redução larval de até 95% e 99,4%, respectivamente. Baudena *et al.*, (2000), em 12 meses de avaliações, observaram que *D. flagrans* promoveu redução significativa no número de L3 a partir do segundo mês de uso.

De Almeida *et al.* (2012) testaram o mesmo fungo, mas na redução de larvas infectantes de endoparasitas de cavalos mantidos em pastagem de campo nativo na região Sul do Brasil. A pesquisa transcorreu durante seis meses (primavera-verão), mas somente no último mês o grupo tratado apresentou redução significativa na contagem de L3. Resultados superiores foram obtidos por Madeira de Carvalho *et al.* (2007), com equinos mantidos em sistema extensivo, com percentuais de redução larval na pastagem entre 50-70% durante o período corresponde à primavera-verão em Portugal.

Na Figura 5 estão expressas as médias dos dados meteorológicos (SIMEPAR, 2014), correspondentes ao período experimental. A temperatura média foi de 20,9°C; 19,3°C e 17,7°C, para fevereiro, março e abril,

respectivamente. A precipitação média foi a variável que apresentou maior redução, em fevereiro foi de 6,7 mm, em março 4,0 mm, enquanto em abril foi de apenas 1,7 mm. A umidade relativa do ar registrada foi de 83,6%; 85,9% e 80,7% para fevereiro, março e abril, respectivamente.

FIGURA 5: MÉDIAS MENSAIS DE TEMPERATURA (°C) MÁXIMA, MÉDIA E MÍNIMA; PRECIPITAÇÃO (mm) E UMIDADE RELATIVA DO AR CORRESPONDENTE AO PERÍODO DE FEVEREIRO – ABRIL DE 2013 PARA CURITIBA, PR, BRASIL.



FONTE: Instituto Tecnológico SIMEPAR, Curitiba, PR, Brasil.

Conforme Stromberg (1997), temperatura e umidade são fatores essenciais para o desenvolvimento de larvas infectantes de endoparasitas. Alguns pesquisadores observaram que a taxa migração de larvas para a pastagem foi reduzida na presença de baixos índices de precipitação e/ou umidade relativa do ar e, como consequência não foi possível avaliar a atividade predatória de *D. flagrans* (LARSEN *et al.*, 1996; FERNÁNDEZ *et al.* 1997; BAUDENA *et al.* 2000). Enquanto Madeira de Carvalho *et al.* (2007) observaram em seu estudo que a elevação de temperatura associada com aumento da precipitação promoveu maior migração das larvas para a

pastagem, elevando o crescimento fúngico e conseqüentemente aumentando a sua atividade predatória. Segundo Mota *et al.* (2003), o desenvolvimento do fungo pode ser estimulado pelo contato com um número crescente de larvas infectantes e também por nematóides de vida livre.

Além disso, as variáveis ambientais também podem afetar diretamente o desenvolvimento do fungo. Por exemplo, para *D. flagrans*, a temperatura ideal para desenvolvimento situa-se entre 10 e 35°C, sendo observado que sob temperaturas superiores ou inferiores o fungo cresce e reproduz-se com menor viabilidade. Gronvold *et al.* (1996) determinaram que 30 °C é a temperatura ótima para cultivo desse fungo. Em estudo realizado por Santos, Padilha e Rodrigues (2001), foi observado que entre 25 e 30°C *D. flagrans* proporcionou acima de 90% de redução de larvas infectantes de ciatostomíneos. Os mesmos autores constataram que 25°C foi a temperatura que proporcionou o maior índice de desenvolvimento de ovos até larvas infectantes desses parasitas. Dessa forma, a temperatura média registrada durante o período experimental foi desfavorável ao desenvolvimento e à atividade predatória do fungo, prejudicando a avaliação de sua atividade predatória. Assim como, pressupõe-se que não favoreceu a eclosão dos ovos e o desenvolvimento das formas larvares dos endoparasitas no bolo fecal.

Sabe-se que, dentre outros fatores, que o crescimento e a atividade do fungo estão diretamente associados com as condições ambientais, o que indica que um mesmo isolado pode promover resultados discrepantes dependendo das variáveis ambientais as quais estiver exposto. Condições favoráveis podem proporcionar excelente atividade predatória, alterações destas variáveis podem reduzir ou até impedir o crescimento do fungo, afetando seu potencial

nematóforo. Mesmo assim, o controle biológico realizado com *D. flagrans* destaca-se como uma alternativa promissora e sustentável de controle parasitário. O que se justifica pelo fato de que sua aplicabilidade é pesquisada como método auxiliar no controle de parasitas, o qual promoverá a redução de L3 na pastagem e assim a taxa de infecção dos animais.

Entretanto, baseando-se nos efeitos que as variáveis ambientais podem ocasionar recomenda-se que estudos a médio e longo prazo sejam desenvolvidos em regiões geográficas e em períodos com características climáticas favoráveis ao desenvolvimento e atividade predatória do fungo. Resultados obtidos nestas condições podem destacar as pesquisas da área e acelerar o processo para inserção comercial de *D. flagrans* como método de controle biológico de parasitas dos animais domésticos.

#### **4. 4 CONCLUSÃO**

A pesquisa demonstrou que com intervalos de 72 horas entre tratamentos, *D. flagrans* reduz significativamente o número de L3 obtidas de cultura fecal. Nas dosagens de  $3 \times 10^5$  (G2) e  $6 \times 10^5$  (G3) clamidósporos  $\text{Kg}^{-1}$  o fungo promoveu redução significativa na contagem de larvas infectantes, diferindo ( $P > 0,05$ ) do grupo C.

A avaliação da atividade predatória de *D. flagrans* na pastagem e nos bolos fecais foi prejudicada pelas condições climáticas do período experimental. A temperatura média registrada foi desfavorável ao desenvolvimento e à atividade predatória do fungo.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, J.V; GOMES, A.P; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southeastern Brazil by nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n. 2, p. 117-22, 1998.
- ARAÚJO, J.V. *et al.* Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural**, v.34, p. 457-463, 2004.
- ARAÚJO, J.M. *et al.* *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 1, p. 103-8, 2010.
- ASSIS, R.C.L.; ARAÚJO, J.V. Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrintestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, p. 109–113, 2003.
- BAUDENA, M.A. *et al.* Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. **Veterinary Parasitology**, v. 89, n. 3, p. 219-30, 2000.
- BRAGA, F.R. *et al.* Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 4, p. 335-40, 2009.
- CASTRO, A.A. *et al.* Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda: Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n. 2, p. 53-57, 2003.

CORT, W.W. *et al.* Investigation on the control of hookworm disease II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. **American Journal of Epidemiology**, v.2, n. 1, p. 1-16, 1992.

DE ALMEIDA, G.L. *et al.* Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southern Region of Brazil. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 657-662, 2012.

FERNÁNDEZ, A.S. *et al.* Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.73, n.3, p. 257-266, 1997.

FERNÁNDEZ A.S. *et al.* A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. **Equine Veterinary Journal**, v.31, p. 488–491, 1999.

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

GRØNVOLD, J. *et al.* Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v.70, p. 291–297, 1996.

KAPLAN, R.M. *et al.* Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.225, n. 6, p. 903-910, 2004.

LARSEN, M. *et al.* In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. **Journal of helminthology**, v. 66, n. 2, p. 137-141, 1992.

LARSEN, M. *et al.* Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, v.60, n.3, p. 321-330, 1995.

LARSEN, M. *et al.* The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology**, v.113, p.1-6, 1996.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n.1, p. 139-146, 1999.

LYONS, E.T.; TOLLIVER, S.C.; DRUDGE, J.H. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. Little SA, Moore JN, Dipietro JA (Eds.) **Special issue: Equine Cyathostome Conference**. Proceedings of a Conference on Equine Cyathostomes held at the University of Georgia, Athens, GA. p. 97-111, 1999.

MADEIRA DE CARVALHO, L.M. *et al.* Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrogilidose equina no Ribatejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.102, p.233-247, 2007.

MATTHEWS, J.B. *et al.* Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anoplocephala perfoliata*. **Veterinary Research**, v.35, p. 371–381, 2004.

MENDOZA-DE-GUIVES, P. *et al.* Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v.119, p.95–104, 1999.

MOLENTO, M.B. Técnica de contagem de larvas no pasto como ferramenta para diagnóstico parasitológico. In: 2º Simpósio da Rede de Helminologia para América Latina e Caribe, 2001. **Anais...** Buenos Aires, Argentina, CD-ROM, 2001.

MOLENTO, M.B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1469-1477, 2005.

MOTA, M.A. *et al.* Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.

PAZ-SILVA, A. *et al.* Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. **Veterinary Parasitology**, v.179, n.1, p. 277-282, 2011.

QUINELATO, S. *et al.* The ecology cyathostomin infective larvae (Nematoda-Cyathostominae) in tropical southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.153, n.1 p.100–107, 2008.

ROBERTS, F.H.S; O'SULLIVAN, J.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Agricultural Research**, v.1, p.99, 1950.

SAGÜÉS, M.F. *et al.* Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. **Parasitology Research**, v.109, n.3, p. 707-713, 2011.

SANTOS, C.P.; PADILHA, T.; RODRIGUES, M.L.A. Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. **Ciência Rural**, v.31, n. 5, p. 839-842, 2001.

STROMBERG, B.E. Environmental factors influencing transmission. **Veterinary Parasitology**, v.72, p. 247–264, 1997.

TAVELA, A.D.O. *et al.* Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1–2, p. 92-96, 2011.

TAVELA, A.E.O. *et al.* Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. **Research Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 568-72, 2013.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle das parasitoses em equídeos costuma ser baseado unicamente no uso de compostos anti-helmínticos, sem associação de nenhuma outra estratégia de controle, salvo iniciativas recentes de realizar o controle pelo OPG individual dos animais. Na maioria das vezes, esses produtos são utilizados de forma inadequada, sem respeitar dosagens, intervalos entre tratamentos, dentre outros critérios. Promovendo a seleção de populações parasitárias resistentes aos produtos disponíveis para combater esses agentes.

A situação atual revela que a resistência parasitária tem se tornado cada vez mais importante no decorrer dos anos, principalmente em relação ao controle parasitário em equinos. Mundialmente, este fato tem chamado a atenção de criadores, médicos veterinários e de pesquisadores, ressaltando a necessidade de se mudar a concepção sobre o uso dos antiparasitários. Deve-se preconizar o uso racional desses produtos, evitando, principalmente a adoção de tratamentos supressivos. Estratégias alternativas devem ser associadas em programas integrados de controle parasitário, a fim de retardar o desenvolvimento da resistência e prolongar a vida útil dos compostos disponíveis no mercado.

Nesse sentido, pesquisas buscando métodos alternativos de controle parasitário têm demonstrado resultados promissores, principalmente às relacionados ao uso do controle biológico realizado com o fungo *D. flagrans*. Após administração via oral à cavalos, o fungo já demonstrou ser eficaz na

redução de larvas infectantes presentes na pastagem e conseqüentemente promove a redução da ingestão de L3 pelos animais.

Os resultados demonstrados nesta dissertação revelam que o isolado CG 768 de *D. flagrans* apresenta capacidade de reduzir o número de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de cavalos após passagem pelo trato gastrintestinal desses animais, quando em condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento do fungo.

No experimento onde as amostras de fezes foram cultivadas em estufa, o fungo demonstrou excelente atividade predatória, com redução constante do número de L3 obtidas na coprocultura. Entretanto, no meio ambiente, a temperatura média registrada durante o período experimental foi desfavorável ao desenvolvimento e a atividade predatória do fungo, prejudicando assim a avaliação de sua ação/eficácia.

Observou-se que a efetividade de *D. flagrans* no controle de larvas infectantes esta associada às variáveis climáticas do ambiente. Dessa forma, regiões geográficas que apresentem condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do fungo podem ser os locais ideais para a implementação deste controle biológico, permitindo seu desenvolvimento, com o objetivo de que a atividade predatória frente à L3 de nematóides seja uma alternativa viável para o controle sanitário adequado de equinos.

## VITA

Andréia Buzatti é Médica Veterinária graduada pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em 08/2010. Possui experiência nas áreas de Doenças Parasitárias dos animais domésticos, Parasitologia, Zoonoses, Saúde Pública, Patologia Clínica e Clínica de Pequenos Animais. Durante a graduação participou de projetos de pesquisa e extensão, como bolsista de iniciação científica, de extensão e também como voluntária. Realizou estágios nas áreas de patologia clínica, clínica de pequenos animais e doenças parasitárias. Publicou três artigos sobre a avaliação de extratos vegetais no controle do carrapato bovino, além de resumos em congressos. Realizou o estágio final da graduação no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Durante o segundo semestre de 2010 e o ano de 2011 foi bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial nível 3 atuando como pesquisadora associada ao Laboratório de Doenças Parasitárias da UFPR. Participou projetos de pesquisas com ênfase em métodos alternativos de controle parasitário, como fitoterapia e controle biológico.

Em 2012 ingressou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR. Desenvolveu o projeto: Avaliação do uso do fungo *Duddingtonia flagrans* no controle de estágios pré-parasitários de nematóides gastrintestinais de equinos, além de atuar como colaboradora em outros projetos de pesquisa. Em abril de 2013 foi aprovada no processo de qualificação de mestrado, no qual redigiu e apresentou o artigo referente ao capítulo 3 desta dissertação (Ação do fungo *Duddingtonia flagrans* na redução

de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de equinos: modelo *in vitro* e *in vivo*). Obteve aprovação no Processo Seletivo de Doutorado (2014) do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFSM, no Processo Seletivo de Doutorado (2014) da UFPR e no edital do Programa Ciência Sem Fronteiras 2013/2014 para Doutorado Pleno no Exterior na Universidade Complutense de Madrid/Espanha.

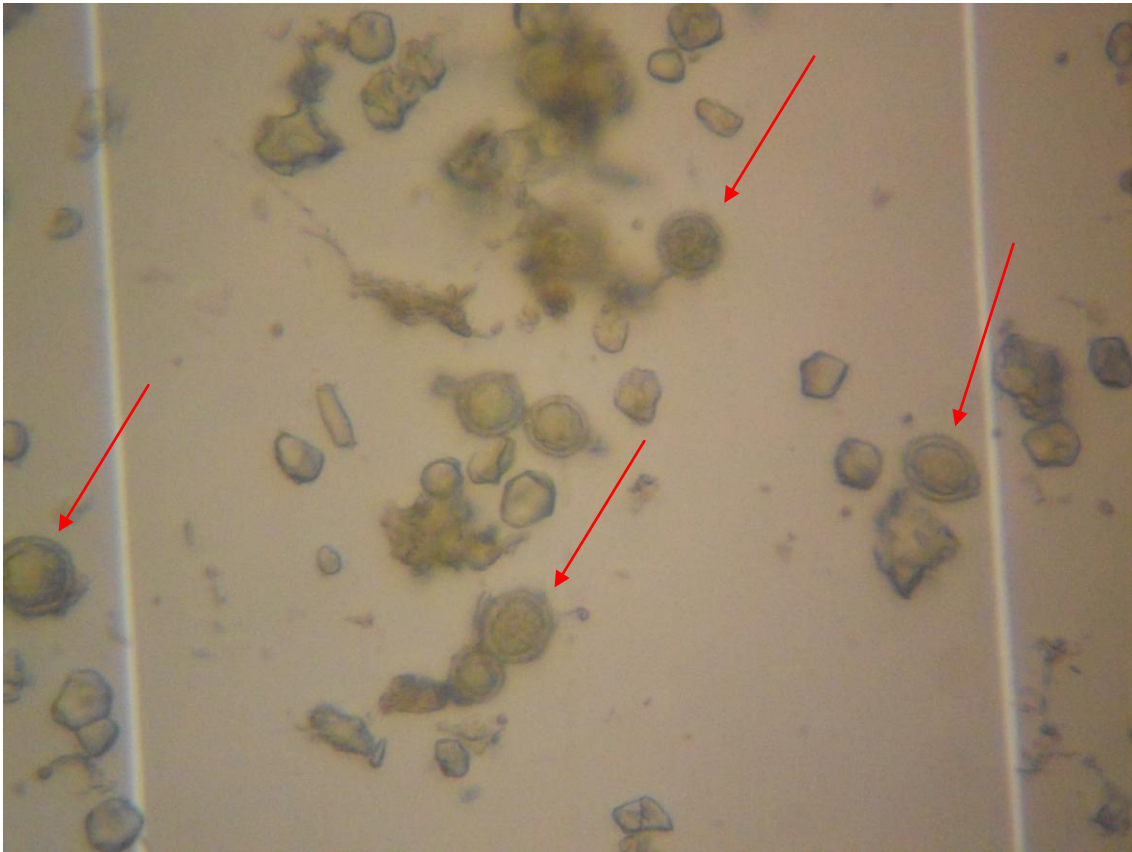
## **ANEXOS**

ANEXO 1: CRONOGRAMA DO EXPERIMENTO (20/02 – 12/04/2013)  
 REALIZADO NO REGIMENTO DE POLÍCIA MONTADA MONTADA  
 “CORONEL DULCÍDIO” DO ESTADO DO PARANÁ.

<b>20/02 – Quarta D0</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
<b>23/02 – Sábado D3 D0 (lavagem de pasto)</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
	Semeadura das fezes na pastagem (D0) – 1,5kg/grupo em triplicata
<b>26/02 – Terça D6</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
<b>01/03 – Sexta D9</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
<b>04/03 – Segunda D12</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
<b>07/03 – Quinta D15</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
	Semeadura de fezes na pastagem (D+15) -1,5kg/grupo em triplicata
<b>09/03 – Sábado + 14 D (lavagem de pasto)</b>	<b>Semeadura do dia 23/02</b> Coleta de pasto para lavagem e determinação da MS Coleta de parte de bolo fecal para Baermann
<b>10/03 - Domingo D18</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
<b>13/03 – Quarta D21 Último dia de tratamento</b>	Administração dos tratamentos, coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
<b>AVALIAÇÕES PÓS-TRATAMENTO</b>	
<b>16/03 – Sábado D24 +21 D (lavagem de pasto)</b>	Coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
	<b>Semeadura do dia 23/02 – D0</b> Coleta do pasto para lavagem e determinação da MS; Coleta de parte do bolo fecal para Baermann.
<b>19/03 – Terça D27</b>	Coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
<b>21/03 – Quarta D+14 (lavagem de pasto)</b>	<b>Semeadura do dia 07/03</b> Coleta de pasto para lavagem e determinação da MS; Coleta de parte do bolo fecal para Baermann.

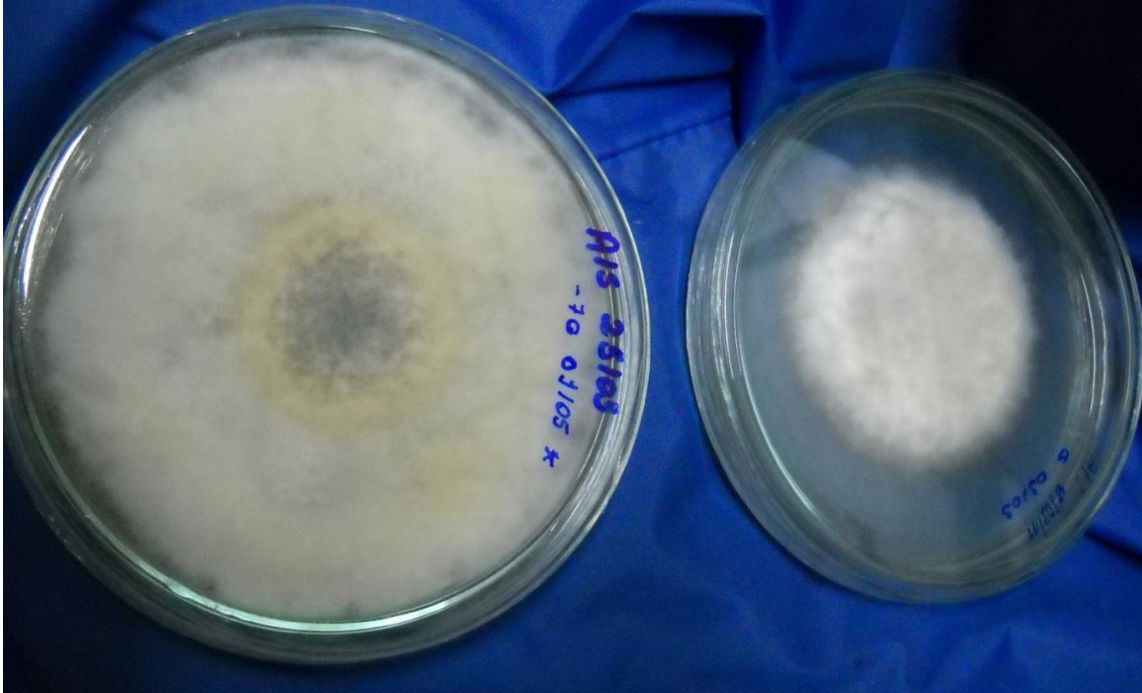
<b>22/03 – Sexta D30</b>	Coleta de fezes; Análises: OPG e coprocultura (amostras individuais).
	<b>Semeadura de fezes (D+30) - 1,5kg/grupo em triplicata</b>
<b>28/03 – Quinta D+21 (lavagem de pasto)</b>	<b>Semeadura do dia 07/03</b> Coleta de pasto para lavagem e determinação da MS; Coleta de parte do bolo fecal para Baermann.
<b>05/04 – Segunda D+14 (lavagem de pasto)</b>	<b>Semeadura do dia 22/03 (D+30)</b> Coleta de pasto para lavagem e determinação da MS; Coleta de parte do bolo fecal para Baermann.
<b>12/04 – Segunda D+21 (lavagem de pasto) Final do experimento.</b>	<b>Semeadura do dia 22/03 (D+30)</b> Coleta de pasto para lavagem e determinação da MS; Coleta de parte do bolo fecal para Baermann.

ANEXO 2: CLAMIDÓSPOROS DE *Duddingtonia flagrans* EM CÂMARA DE NEUBAUER.



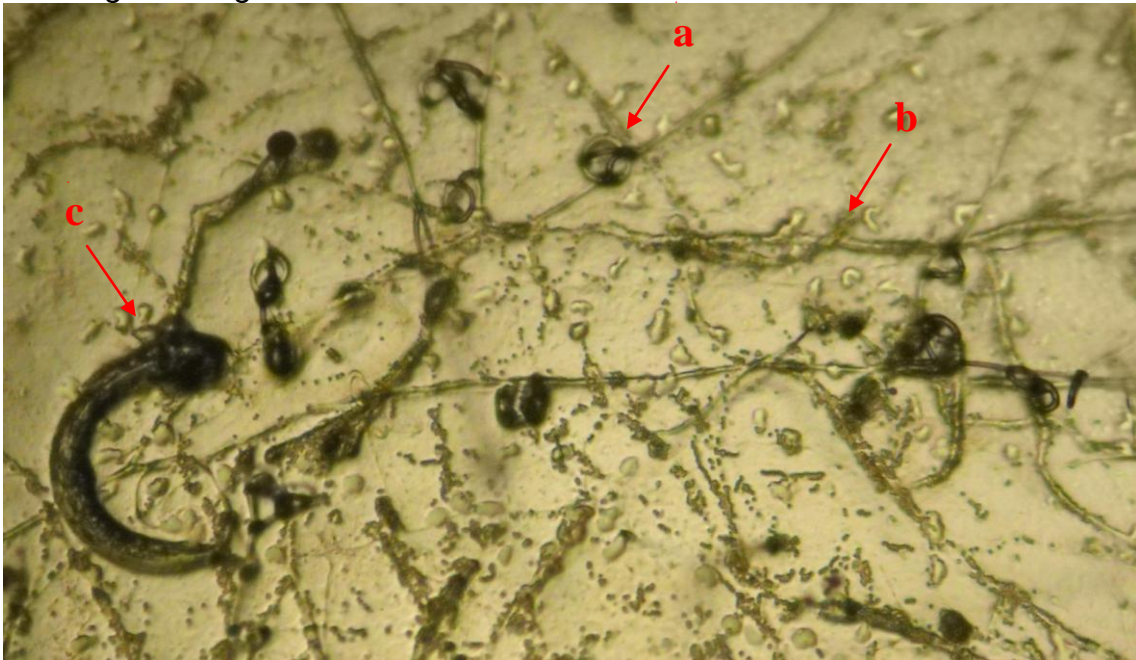
Setas indicam clamidósporos. Aumento de 400X.  
Fonte: O autor (2013).

ANEXO 3: CULTURA DE *Duddingtonia flagrans* EM ÁGAR SABOURAND.



FONTE: Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro (2012).

ANEXO 4: DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE PREDATÓRIA DE *Duddingtonia flagrans*.



Legenda: a = armadilha de *Duddingtonia flagrans*; b= hifas de *Duddingtonia flagrans*; c = estágio pré-parasitário aprisionado em armadilha. Aumento de 200X.

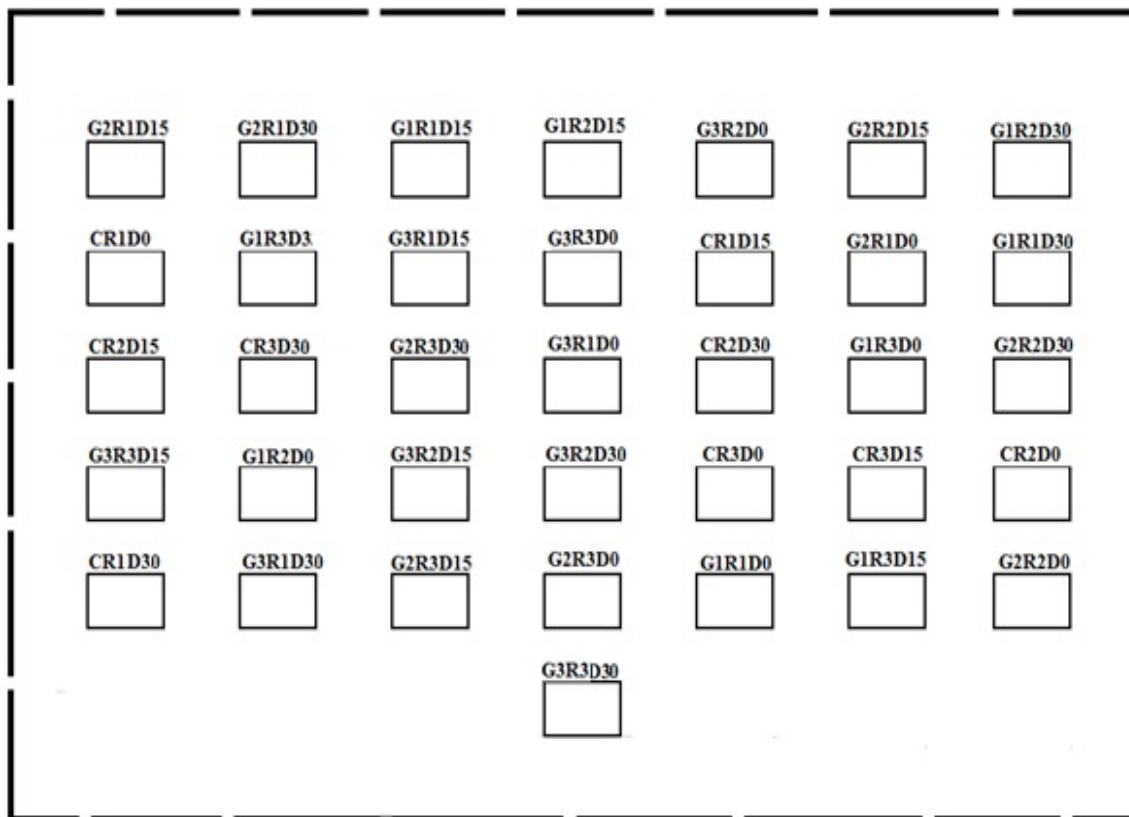
Fonte: O autor (2013).

ANEXO 5: CLAMIDÓPOROS DE *Duddingtonia flagrans* (isolado CG 768)  
ASSOCIADOS À MILHO TRITURADO.



Fonte: O autor (2013).

ANEXO 6: MAPA ESQUEMÁTICO DEMOSNTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS/REPETIÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE *Diddingtonia flagrans* NO MEIO-AMBIENTE:



Legenda: G1= grupo 1; G2= grupo 2; G3= grupo 3; C= grupo controle; R1= repetição 1; R2= repetição 2; R3= repetição 3; D0= dia 0; D15= dia 15; D30= dia 30.

Cada área corresponde a 1m<sup>2</sup>; Distância entre áreas= 1m.

Fonte: O autor (2013).

ANEXO 7- RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO DURANTE O CURSO DE MESTRADO:

1 - BUZATTI, A. ; SANTOS, C. P. ; YOSHITANI, U. Y. ; SPRENGER, L. K. ; KLOSTER, F. S. ; ANTUNES, J. D. ; MOLENTO, B.M. . Biological control using the fungi *Duddingtonia flagrans* against cyathostomins of horses. In: International Conference on Equine Infectious Diseases IX, 2012. **Journal of Equine Veterinary Science** (Print), 2012. v. 32. p. S31-S31.

2 - BUZATTI, A. ; SPRENGER, L. K. ; RITCHER, E. ; MOLENTO, M. B. . Efficacy of neem oil against engorged *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks on in vitro tests. In: 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2013, Perth. 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - **Abstracts**, 2013. p. 526-526.

3 - BUZATTI, A. ; SANTOS, C. P. ; FERNANDES, M. A. M. ; SPRENGER, L. K. ; YOSHITANI, U. Y. ; SANTOS, C. D. ; BARROS, R. W. ; MOLENTO, B.M. . Ação de *Duddingtonia flagrans* na redução de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de equinos. In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercossul, 2013, Florianópolis. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2013.

4 - FORTES, F. S. ; KLOSTER, F. S. ; BIER, D. ; BUZATTI, A. ; YOSHITANI, U. Y. ; MOLENTO, M. B. . Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. In: 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2013, Perth. 24th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - **Abstracts**, 2013. p. 422-422.

5 - FERNANDES, M. A. M.; BUZATTI, A.; SPRENGER, L. K.; MONTEIRO, A. L. G.; MOLENTO, B.M. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO FAMACHA EM CORDEIROS SUFFOLK. In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercossul, 2013, Florianópolis - SC. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2013.

6 - SPRENGER, L. K.; BUZATTI, A.; BELO, C. E. P.; FERNANDES, M. A. M.; YOSHITANI, U. Y. ; MOLENTO, B.M. . Associação entre a contaminação por geohelmintos em praças e parques públicos e fatores de risco em Curitiba, PR. In: XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia e III Encontro de Parasitologia do Mercossul, 2013, Florianópolis - SC. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2013.

7 - CANEVER, R. ; KLOSTER, F. S. ; BIER, D. ; FORTES, F. S. ; BUZATTI, A. ; SCHAFER, A. S. ; MOLENTO, B.M. . TESTE IN VITRO PARA DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA ANTIHELMÍNTICA EM *Cyathostomum* sp.. In: XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2012, São Luiz - MA. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, 2012. p. 118-118.

ANEXO 8 – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O CURSO DE MESTRADO:

1 - BUZATTI, A.; SPRENGER, L. K.; MOLENTO, M. B. Ação do óleo de nim frente à teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em testes *in vitro*. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, p. 07-12, 2013.

2 - BUZATTI, A.; FERNANDES, M. A. M.; MOLENTO, M. B. Parasitoses Gastrintestinais em Pequenos Ruminantes. **Dorper - News - A Tendência da Raça no Brasil**, p. 52 - 53, 02 nov. 2013.

3 - FORTES, F. S.; KLOSTER, F. ; SCHAFER, A. S. ; BIER, D. ; BUZATTI, A. ; YOSHITANI, U. Y. ; MOLENTO, M. B. Evaluation of resistance in a selected field strain of *Haemonchus contortus* to ivermectin and moxidectin using the Larval Migration on Agar Test. **Pesquisa Veterinária Brasileira** (Impresso), v. 33, p. 183-187, 2013.

4 - MOLENTO, M. B.; FORTES, F. S.; BUZATTI, A.; KLOSTER, F. S.; SPRENGER, L. K. ; COIMBRA, E. ; SOARES, L. D. Partial selective treatment of *Rhipicephalus microplus* and breed resistance variation in beef cows in Rio Grande do Sul, Brazil. **Veterinary Parasitology** (Print), v. 192, p. 234-239, 2012.

ANEXO 9 - PALESTRAS PROFERIDAS DURANTE O CURSO DE MESTRADO:

1 - Curso - Viva o Verão; Instituição promotora/financiadora: Universidade Federal do Paraná; Tema ministrado: **Zoonoses Parasitárias em Praias - Larva Migrans Cutânea.**

2- Curso Produção de leite em bases ecológicas; Instituição promotora/financiadora: EMATER – PR; Tema ministrado: **Manejo sanitário de base ecológica no controle de endo e ectoparasitas de bovinos de leite.**

3 – Curso Bovinocultura de Leite em Bases Agroecológicas; Instituição promotora/financiadora: EMATER/Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA) – PR; Tema ministrado: **Alternativas de Manejo no controle de Endo e Ectoparasitas de Bovinos de leite.**

4 - Congresso: 1º CONCcorte – Congresso Nacional de Cordeiros de Corte; Jaguariúna, SP. Instituição promotora/financiadora: Associação Brasileira dos Criadores DORPER/Farmpoint. Tema ministrado: **Epidemiologia e controle das parasitoses de pequenos ruminates.**

## ANEXO 10: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS:



**Universidade Federal do Paraná**  
**Setor de Ciências Agrárias**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA**

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 032/2013, referente ao projeto “Uso de fungo *Duddingtonia flagrans* como método de controle de parasitas gastrintestinais em equinos”, sob a responsabilidade de Marcelo Beltrão Molento, na forma em que foi apresentado (uso de 20 equinos), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 03 de junho de 2013.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol number 032/2013, regarding the project “Use of fungus *Duddingtonia flagrans* as a method of control gastrointestinal parasites in horses”, under Marcelo Beltrão Molento’s supervision, in the terms it was presented (use of 20 equines), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on June 03, 2013.

Curitiba, 03 de junho de 2013.

Patrick Schmidt

Presidente

Ricardo Guilherme D’Otaviano  
de Castro Vilani

Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais  
Setor de Ciências Agrárias  
Universidade Federal do Paraná.