

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Ação de extratos fúngicos sobre ovos e larvas de tricostrongíldeos parasitos
de ovinos**

Cristiane Telles Baptista

Pelotas, 2017

Cristiane Telles Baptista

.

**Ação de extratos fúngicos sobre ovos e larvas de tricostrongilídeos parasitos
de ovinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Parasitologia).

Orientador: Prof^a Dr^a Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B222a Baptista, Cristiane Telles

Ação de extratos fúngicos sobre ovos e larvas de tricostrongilídeos parasitos de ovinos / Cristiane Telles Baptista ; Daniela Isabel Brayer Pereira, orientadora. — Pelotas, 2017.

96 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Controle biológico. 2. Fungos nematófagos. 3. Tricostrongilídeos. 4. *Purpureocillium lilacinum*. 5. *Trichoderma virens*. I. Pereira, Daniela Isabel Brayer, orient. II. Título.

CDD : 636.30896

Cristiane Telles Baptista

Ação de extratos fúngicos sobre ovos e larvas de tricostrongílídeos parasitos de
ovinos

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/02/2017

Banca examinadora:

Profª Drª Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientadora)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas.
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Drª Anelise de Oliveira da Silva Fonseca
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Fernando de Souza Maia Filho
Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

À Deus pela minha vida e por guiar meus passos nessa longa caminhada.

À minha mãe Rosa e minha irmã Michele, pela educação, pelo incentivo, amizade, companheirismo, paciência, dedicação, carinho, credibilidade e por confiar em mim, sem vocês eu não teria chegado tão longe.

Ao meu esposo Cleber, por todo apoio, dedicação, carinho, paciência, por aguentar todas minhas crises e estresse durante essa caminhada e sempre acreditar no meu potencial.

À minha família em geral, pela amizade, carinho, paciência, incentivo e apoio incondicional.

À minha Orientadora Daniela Isabel Brayer Pereira, pela sua orientação, total apoio, tempo dedicado, ensinamentos, opiniões e críticas, atenção, confiança, paciência, profissionalismo e total colaboração para a realização deste trabalho.

Ao nosso grupo de pesquisa que me proporcionou todo o apoio na realização deste trabalho, além das amizades construídas ao longo de nosso convívio e por me ensinar o valor do trabalho em equipe.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade em realizar minha segunda graduação e também a pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo e recursos financeiros disponibilizados que tornaram este projeto possível.

Resumo

BAPTISTA, Cristiane Telles. **Ação de extratos fúngicos sobre ovos e larvas de tricostrongilídeos parasitos de ovinos**, 2017, 92f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

As parasitoses gastrointestinais são fatores limitantes da ovinocultura. Embora o emprego de anti-helmínticos seja o método mais eficaz de controle das helmintoses, desvantagens como resistência parasitária, presença de resíduos químicos na carne e leite e ecotoxicidade, estimulam pesquisas que buscam medidas alternativas de controle. Neste contexto, o emprego de fungos nematófagos como agentes de biocontrole constitui-se numa ferramenta viável, promissora e ecologicamente de baixo impacto amigável. O presente estudo objetivou avaliar *in vitro* a ação de extratos fúngicos de *Duddingtonia flagrans* CG258, *Purpureocillium lilacinum* CG193 e *Trichoderma virens* MICLAB 008 sobre ovos e larvas L3 de tricostrongilídeos que parasitam ovinos. Extrato filtrado (EF) e extrato macerado bruto (MB) dos fungos foram preparados a partir de culturas fúngicas em meio mínimo líquido. Ovos e larvas L3 de tricostrongilídeos foram obtidos de fezes de ovinos naturalmente infectados. Para o ensaio experimental que avaliou a ação ovicida dos fungos, alíquotas de 500 µL dos extratos EF e MB de *T. virens* e *P. lilacinum* foram vertidas em placas de cultivo de tecidos. A esse volume foi acrescido 500 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 100 ovos de tricostrongilídeos. A mesma metodologia foi empregada para o ensaio que avaliou a ação dos extratos EF e MB de *D. flagrans* e *T. virens* sobre as larvas L3. Os controles consistiram de 500 µL de meio mínimo adicionado de 500 µL de suspensão contendo 100 ovos ou larvas L3. Cada tratamento consistiu de cinco repetições. As placas foram incubadas a 25°C, durante 24 e 48 horas. A leitura considerou o número total de larvas L1 (ovos eclodidos) e teste de inviabilidade larval (larvas L3 imóveis) presentes nos grupos tratados e controles. Observou-se que o efeito dos extratos EF e MB de *P. lilacinum* e *T. virens* na eclodibilidade dos ovos diferiu do grupo controle em ambos os períodos avaliados ($p < 0.05$). No geral, a ação dos extratos fúngicos em 24 e 48 horas não diferiu entre si. Em *T. virens*, o MB foi superior ao EF ($P < 0.05$); porém, em *P. lilacinum* observou-se que a ação do MB em ambos os períodos avaliados não diferiu do EF, quando analisado em 24 horas. Adicionalmente, o percentual de redução de eclodibilidade do MB de ambos os isolados fúngicos foi superior ao EF, evidenciando-se maiores percentuais de redução de eclosão dos ovos em 24 horas de exposição aos extratos fúngicos. Quando analisado o efeito dos extratos fúngicos de *D. flagrans* e *T. virens* sobre as larvas L3 de tricostrongilídeos observou-se que, com exceção do EF de *D. flagrans* avaliado em 24 horas, os demais extratos fúngicos diferiram ($P < 0.05$) do grupo controle. Em *D. flagrans* o extrato macerado foi superior ($P < 0.05$) ao extrato filtrado em sua capacidade de causar a imobilização das larvas L3. Já em *T. virens* observou-se que a ação dos extratos MB diferiu entre si, sendo o efeito do MB avaliado em 48 horas superior ($P < 0.05$). Os resultados

obtidos permitem concluir que o extrato macerado bruto e o extrato filtrado de *D. flagrans*, *P. lilacinum* e *T. virens* avaliados neste estudo reduzem a eclodibilidade dos ovos, bem como interferem com a motilidade das larvas de tricostrongílídeos. Portanto, são potenciais candidatos como agentes de biocontrole de nematoides de ovinos.

Palavras chaves: controle biológico, fungos nematófagos, tricostrongílídeos, *Duddingtonia flagrans*, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma virens*.

Abstract

BAPTISTA, Cristiane Telles. **Fungal extract action on trichostrongylidae eggs and larvae parasitizing sheep**, 2017, 92f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Gastrointestinal parasites are sheep breeding limiting factors. Although the use of anthelmintics is the most effective method of helminth control, disadvantages such as parasitic resistance, presence of chemical residues in meat and milk and ecotoxicity have stimulated research seeking alternative control procedures. In this context, the use of nematophagous fungi as biocontrol agents is an interesting, viable, promising and ecologically friendly tool. The present study aimed to evaluate the *in vitro* action of *Duddingtonia flagrans*, *Purpureocillium lilacinum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on trichostrongylidae eggs and larvae L3 parasitizing sheep. Filtered extract (FE) and crude macerated extract (CME) of the fungi were prepared from fungal cultures in liquid minimal medium. Trichostrongylidae eggs and larvae L3 were obtained from feces of naturally infected sheep. For the experimental essay to evaluate fungal ovicidal action, FE and CME 500 μ L aliquots of *T. virens* and *P. lilacinum* extracts were poured into tissue culture plates. 500 μ L of a suspension containing approximately 100 trichostrongylidae eggs was added to this volume. The same methodology was used for the essay evaluating the FE and CME action of *D. flagrans* and *T. virens* extracts on the larvae L3. The controls consisted of 500 μ L minimal medium added with 500 μ L suspension containing 100 eggs or larvae L3. Each treatment consisted of five replicates. Plates were incubated at 25 °C for 24 and 48 hours. Reading took into account the total number of larvae L1 (hatched eggs) and larval viability test (larvae L3 motionless) present in the treated and control groups. It could be observed that the FE and CME effect of *P. lilacinum* and *T. virens* extracts on egg hatchability differed from that in the control group in both evaluated periods ($P < 0.05$). On the whole, fungal extract action at 24 and 48 hours did not show any differences. For *T. virens*, CME was superior to FE ($P < 0.05$); However, for *P. lilacinum*, CME action in both periods evaluated did not differ from FE action at 24 hours. In addition, CME hatch reduction percentage for both fungal isolates was higher as compared to that of FE, evidencing higher percentages of egg hatch reduction to the fungal extract at 24 hours. When the effect of *D. flagrans* and *T. virens* fungal extracts on trichostrongylidae larvae was analyzed, it was observed that, except for *D. flagrans* fungal extract evaluated at 24 hours, the other fungal extracts differed ($P < 0.05$) from the control group. For *D. flagrans*, the macerated extract was superior ($P < 0.05$) to the filtered extract as to its ability to cause larvae L3 immobilization, while for *T. virens*, it was observed that CME action differed between the evaluated periods, its effect being higher when evaluated at 48 hours ($P < 0.05$). The results obtained allow concluding that the *D. flagrans*, *P. lilacinum* and *T. virens* crude macerated and filtered extracts evaluated in this study reduce egg hatchability,

as well as interfere with trichostrongylidae larvae motility. Therefore, they are potential sheep nematode biocontrol agent candidates

Keywords: biological control, nematophagous fungi, trichostrongylidae, *Duddingtonia flagrans*, *Purpureocillium lilacinum*, *Trichoderma virens*

Lista de Figuras

Figura 1- Ciclo biológico de helmintos da família Trichostrongylidae. Fonte: MORAES, 2002.....	24
Figura 2- Microcultivo do fungo <i>Trichoderma virens</i> , indicando suas estruturas em aumento de 100x.....	34
Figura 3-Figura 3 - Microcultivo do fungo <i>Purpureocillium lilacinum</i> , indicando suas estruturas, aumento de 100x.....	37
Figura 4 – Morfologia do fungo <i>Duddingtonia flagrans</i> , indicando clamidósporos, aumento de 100x. Fonte - http://www.granjagayosocastro.es/	39

Lista de Tabelas

Manuscrito 1

Tabela 1 - Média de contagem de larvas e percentual de redução de eclosão de ovos de tricostrongilídeos em 24 e 48 horas, submetidos ao tratamento com diferentes extratos fúngicos de *Purpureocillium lilacinum* e *Trichoderma virens*.47

Manuscrito 2

Tabela 1 - Média de contagem de larvas inviáveis de tricostrongilídeos em 24 e 48 horas submetidos ao tratamento com diferentes extratos fúngicos de *Trichoderma virens* e *Duddingtonia flagrans*.64

Sumário

1	Introdução	14
2	Objetivos	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	Revisão da Literatura	18
3.1	Ovinocultura	18
3.2	Helmintoses gastrointestinais	19
3.3	Gênero <i>Haemonchus</i>	20
3.4	Gênero <i>Ostertagia</i>	21
3.5	Gênero <i>Trichostrongylus</i>	22
3.6	Gênero <i>Cooperia</i>	23
3.7	Gênero <i>Nematodirus</i>	23
3.8	Ciclo biológico	24
3.8.1	Fase de vida livre	24
3.8.2	Fase parasitária.....	25
3.9	Controle químico	26
3.10	Controle Biológico	29
3.10.1	Fungos nematófagos.....	30
3.10.2	<i>Trichoderma virens</i>	33
3.10.3	<i>Purpureocillium lilacinum</i> (<i>Paecilomyces lilacinus</i>).....	36
3.10.4	<i>Duddingtonia flagrans</i>	38
4	Manuscritos	41
4.1	Manuscrito 1	41
4.1.1	Introdução	44
4.1.2	Material e Métodos	45
4.1.3	Resultados	47
4.1.4	Discussão	48
4.1.5	Conclusão	51
	Referências	52
4.2	Manuscrito 2.....	58

4.2.1	Introdução	61
4.2.2.	Material e Métodos	62
4.2.3	Resultados	64
4.2.4	Discussão	65
4.2.5	Conclusão	65
5	Conclusões.....	72
	Referências	73

1 Introdução

O Brasil possui aproximadamente 17,6 milhões de ovinos, com maior concentração dos rebanhos no estado do Rio Grande do Sul (5 milhões) e região nordeste (9 milhões) representando, portanto, uma importante atividade econômica para as Regiões (IBGE, 2014). Desde a década de 90 a ovinocultura vem passando por transformações, pois o aumento do poder aquisitivo, a abertura do comércio internacional e a estabilidade monetária têm permitido um cenário favorável para o desenvolvimento da atividade (VIANA, 2008).

A ovinocultura brasileira apresenta-se em expansão, porém ainda tem muito a melhorar. O aumento do consumo de carne ovina implica em alguns desafios, uma vez que a maior demanda traz consigo a necessidade de acelerar o crescimento da ovinocultura. Intervenções que visem aumentar o consumo devem estar atentas a estratégias de *marketing* que apresentem a carne ovina como um produto seguro e de qualidade. Além disso, tornam-se necessárias ações que possibilitem as indústrias disponibilizarem uma ampla variedade de cortes, para que todas as classes sociais possam ter acesso a carne ovina, com o intuito de em longo prazo fidelizar o consumidor (VIANA, 2008).

No Brasil, a ovinocultura assim como grande parte da criação de ruminantes, é realizada em regime extensivo, predispondo os animais a sucessivas infecções por parasitos presentes nas pastagens (ANUALPEC, 2003).

As helmintoses gastrointestinais são fatores limitantes da atividade pecuária, causando muitas perdas econômicas não somente por morte de animais, mas também por queda na produção (diminuição do ganho de peso e da produção de lã e leite) (HART, 2011; TORRES-ACOSTA et al., 2012).

Estima-se que as perdas econômicas mundiais ocasionadas por parasitos gastrointestinais sejam em torno de milhões de dólares/ano (ANUALPEC, 2003). As infecções parasitárias podem afetar a ingestão alimentar, a digestibilidade e mais uma variedade de processos fisiológicos que se manifestam de várias formas. É difícil estimar estes custos, especialmente quando em infecções sub-clínicas, porém

o maior problema é estabelecer um desenho experimental seguro, mesmo que puramente teórico, que possa comprovar a participação de cada item dentro da cadeia produtiva (MOLENTO, 2004a).

Entre os parasitos gastrointestinais mais frequentes em ruminantes estão os pertencentes à família Trichostrongylidae e compreendem os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus*, *Oesophagostomum*, *Strongyloides* e *Cooperia* (RUAS; BERNE, 2007). De acordo com Amarante; Sales (2007), *Haemonchus contortus* é o principal endoparasita de ovinos. O seu hábito hematófago promove quadros graves de anemia e morte em casos de altas infecções.

O uso de fármacos anti-helmínticos consitiui-se num método eficaz de controle das helmintoses gastrointestinais. No entanto, seu uso excessivo pode trazer algumas desvantagens que incluem o desenvolvimento de nematoides resistentes (KAPLAN et al., 2004; MOLENTO et al., 2004b; SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011), presença de resíduos químicos dos fármacos na carne e leite e prejuízos ao ambiente (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011).

O sucesso de um programa de controle parasitário não depende somente de um esquema eficaz de tratamento, mas também de uma combinação de práticas de manejo que possam ser adotadas a qualquer momento e do conhecimento da epidemiologia dos parasitos. No intuito de minimizar as desvantagens do controle químico, evidencia-se um incremento de pesquisas que visam adicionar medidas alternativas de controle das parasitoses nos animais domésticos (MOTA et al., 2003).

O controle biológico, que é a utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, para diminuir, a um limiar subclínico e economicamente aceitável, a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola. Sua ação se dá por meio de organismos vivos e antagonistas naturais no ambiente. Dentre esses organismos, destacam-se os fungos nematófagos como eficientes controladores de parasitos gastrointestinais (GRONVOLD et al., 1996, ARAÚJO et al., 2004a). Esta ferramenta pode ser viável e promissora, pois ao atuar nas formas infectantes dos helmintos no ambiente, proporciona redução das infecções ocasionadas pelos parasitos gastrointestinais.

Os fungos nematófagos estão presentes no solo, mais precisamente na matéria orgânica em decomposição e sua ação é direcionada ao parasitismo dos

ovos e larvas de vida livre dos geohelmintos (BRAGA et al., 2007). Porém, o maior desafio está na procura por fungos adaptados às condições bióticas e abióticas do local onde será empregado como agente de controle, sendo esse quesito mais importante do que a facilidade de isolamento e/ou manutenção em condições de laboratório (GRAY, 1988; GROONVOLD, 1996; GORTARI et al., 2007).

Estudos prévios *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado a eficácia e a viabilidade do emprego de fungos nematófagos, assim como *Duddingtonia flagrans*, *Purpureocillium lilacinum* *Trichoderma virens* no controle de parasitos gastrointestinais de importância veterinária (ARAÚJO et al., 2004a; ARAÚJO et al., 2004b; ARAÚJO et al., 2006b; BRAGA et al., 2007; BRAGA et al., 2010; BRAGA et al., 2011a; BRAGA et al., 2011b; FERNANDEZ, 2011; SOARES et al., 2012; ASSIS et al., 2013; BRAGA et al., 2013a; BRAGA et al., 2013b; MAIA-FILHO et al., 2013; ARAÚJO et al., 2014; FERNANDES et al., 2015; HOFSTATTER et al., 2016; MAIA-FILHO et al., 2017).

Nota-se que as pesquisas com fungos nematófagos sobre helmintos de ruminantes empregam fungos predadores de larvas. Por outro lado, estudos avaliando a atividade ovicida de fungos sobre ovos desses parasitos são incipientes (VIEIRA et al., 2014). Desta forma, a realização de experimentos que visam avaliar a utilização de fungos ovicidas sobre ovos de helmintos da família Trichostrongylidae é relevante, uma vez que a redução do número de ovos no ambiente poderá minimizar a exposição dos hospedeiros suscetíveis às formas infectantes desses helmintos patógenos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a ação de extratos fúngicos de *Purpureocillium lilacinum* CG193, *Trichoderma virens* MICLAB 008 e *Duddingtonia flagrans* CG258 sobre ovos e larvas de tricostrongilídeos parasitos de ovinos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a atividade ovicida de extratos enzimáticos de isolados fúngicos de *Purpureocillium lilacinum* e *Trichoderma virens* sobre ovos de tricostrongilídeos;
- Verificar a atividade de extratos enzimáticos de isolados fúngicos de *Duddingtonia flagrans*, *Purpureocillium lilacinum* e *Trichoderma virens* sobre larvas de tricostrongilídeos.

3 Revisão da Literatura

3.1 Ovinocultura

Os ovinos e os caprinos foram os primeiros animais de produção a serem domesticados pelo homem nos desertos da Ásia Central. Sua criação possibilitava alimento, principalmente pelo consumo da carne e leite, além de proteção através do uso da lã, fibra que servia como abrigo contra as intempéries do ambiente (VIANA, 2008).

Esses animais possuíam comportamento migratório, raramente ocorrendo pastejo no mesmo local. Além disso, habitavam ambientes áridos que são desfavoráveis aos parasitos. Essas características, em conjunto, explicam porque a imunidade contra nematódeos gastrointestinais foi pouco desenvolvida com a evolução desses ruminantes. No decorrer do tempo, os sistemas intensivos de criação foram desenvolvidos e os ruminantes foram condicionados a fazer pastejo nos mesmos locais, com umidade elevada e temperatura de aproximadamente 28°C, condições adequadas ao desenvolvimento de nematódeos (SOTOMAIOR et al., 2009).

A criação intensiva de ovinos está presente em praticamente todos os continentes e a ampla difusão da espécie se deve a sua adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações. A criação ovina está destinada tanto à exploração econômica como à subsistência das famílias de zonas rurais (VIANA, 2008).

Estima-se que o rebanho mundial de ovinos seja da ordem de 1,2 bilhão de cabeças, estando os maiores rebanhos localizados na China, Austrália, Índia, Irã e Nova Zelândia, que concentram, respectivamente, 17, 06, 05, 04, e 2,5% do efetivo mundial (FAOSTAT, 2015). Segundo Nogueira (2005), o crescimento da ovinocultura no Brasil é seguido do aperfeiçoamento da genética dos rebanhos, da tecnificação e do modelo empresarial, fatores esses essenciais para o desenvolvimento da atividade. O rebanho de ovinos no Brasil compreende cerca de 17,6 milhões de cabeças. A região Nordeste concentra 57,24% dessa população e a Sul 28%, sendo

essas regiões responsáveis por mais de 85% do plantel efetivo brasileiro (EMATER, 2005, IBGE, 2012). Todavia, verifica-se maior expansão da atividade nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Norte, com taxas de crescimento de 8,6%, 6,6% e 6,2% ao ano, respectivamente (EMATER, 2005).

Contudo, um dos principais fatores limitantes nos sistemas de produção de ovinos são as parasitoses causadas por endoparasitos que acometem ovinos em qualquer idade e sexo (WAGHORN et al., 2003; SILVA et al., 2010).

3.2 Helmintoses gastrointestinais

Grande parte dos animais criados a campo apresenta uma ou mais espécies de parasitos gastrointestinais em seu organismo. Entretanto, nem sempre o parasitismo é sinônimo de doença, pois geralmente os mecanismos imunológicos são capazes de controlar a população de endoparasitos (AMARANTE, 2005).

Por outro lado, os parasitos podem vencer as barreiras imunológicas e causar as parasitoses, cujos sintomas clínicos incluem: desnutrição, avitaminoses, distúrbios gastrintestinais, estados convulsivos e prejuízo ao desenvolvimento dos animais (SOUZA, 2013). Os nematoides gastrointestinais são os parasitos mais frequentes em ruminantes especialmente em zonas temperadas e úmidas e em animais de pastejo, determinado lesões no abomaso e intestino (COSTA, 2007).

As helmintoses gastrointestinais representam um dos maiores desafios à produção de carne de ruminantes, principalmente, em países de clima tropical (MACEDO et al., 2000; VIEIRA, 2008). As infecções gastrointestinais provocam diversos efeitos fisiopatológicos nos animais, ocasionando diminuição no ganho de peso, comprometimento da condição corporal, redução da produção de leite e do desempenho reprodutivo e mortalidade, principalmente entre os animais jovens (GRAMINHA et al., 2001).

Os parasitos gastrointestinais mais frequentes na ovinocultura pertencem à família Trichostrongylidae e compreendem os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia* (RUAS; BERNE, 2007). Esses parasitos são cosmopolitas e morfologicamente descritos como filiformes, de 3 a 4 cm de comprimento, ausência de cápsula bucal ou presença reduzida e cutícula lisa ou estriada com prolongações.

Rocha et al. (2008) enfatizaram que os principais parasitos causadores das parasitoses na criação de ovinos são *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis*. Esses autores também observaram que aproximadamente 100% dos animais criados a campo apresentavam uma ou mais espécie de endoparasitas.

No Brasil, principalmente na região sul, os helmintos mais prevalentes são *H. contortus*, *Trichostrongylus axei*, *T. colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia* spp., *Nematodirus spatigher*, *Oesophagostomum venulosum* e *Trichuris ovis* (RAMOS et al., 2004). *H. contortus* apresenta rápido desenvolvimento de resistência aos anti-helmínticos (SANGSTER, 2001), explicado pelo seu alto potencial biótico (ECHEVARRIA; TRINDADE, 1989), variabilidade genética e presença de um alelo que causa diminuição da suscetibilidade a uma droga (BLACKHALL et al., 1998).

3.3 Gênero *Haemonchus*

As espécies pertencentes ao gênero *Haemonchus* são hematófagas, parasitam o abomaso e são facilmente identificadas durante necropsia devido ao seu tamanho. As fêmeas adultas são maiores que os machos apresentando de 18 a 30 mm enquanto que os machos medem de 10 a 20 mm. Em condições ideais a capacidade de oviposição diária de uma fêmea varia entre cinco a dez mil ovos (UENO; GONÇALVES, 1998). Os ovos dos parasitos pertencentes a este gênero são ovais com polos assimétricos, embrionados com 16 a 32 células e medem 70 a 85 µm por 41 a 48 µm. As L3 são consideradas larvas médias, com cerca de 650 a 825 µm de comprimento, a bainha da cauda é média e termina de forma aguda (SANCHO, 2009).

De acordo com Moraes (2002), *H. contortus* é o principal endoparasita de ovinos e o de maior importância econômica, principalmente em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, especialmente em condições quentes e úmidas. No Brasil, é o principal nematoide parasita de ovinos (AMARANTE et al., 2004), sendo encontrado em 75% a 100% dos exames de fezes (MORTENSEN et al., 2003). A maior ocorrência deste parasito se evidencia nos meses de verão e outono, em regiões com estações definidas, pois as larvas possuem ótimo desenvolvimento em temperatura e umidade altas.

Para Waller; Chandrawathani (2005) a haemoncose é a parasitose com maior patogenicidade para pequenos ruminantes e possivelmente a única em ovinos que pode ser diagnosticada pela sintomatologia clínica, sem necessidade de se recorrer à utilização de exames parasitológicos. Estudos elaborados por Leal (2012) demonstraram que mais de 80% da carga parasitária dos ovinos era devida a esse parasito. Esse helminto apresenta alto grau de virulência, pois o hábito hematófago ocasiona anemia hemorrágica aguda (URQUHART et al., 1998). Possui uma lanceta bucal, que é responsável não só em sugar o sangue, mas também em secretar uma substância anticoagulante capaz de impedir a formação da rede de fibrina no local onde se alimenta. Cada parasito pode remover em torno de 0,05 mL de sangue ao dia por ingestão, além do extravasamento de sangue pelas lesões da região do abomaso do hospedeiro. Em casos hiperagudos de parasitismo pode ocorrer morte súbita por gastrite hemorrágica (TAYLOR et al., 2007).

Os animais mais jovens são mais suscetíveis, embora em adultos em situações de estresse, ou com déficit nutricional também podem sofrer anemias fatais (BOWMAN et al., 2003).

O principal sinal clínico para o diagnóstico da haemoncose é a palidez das mucosas, coloração escura das fezes, além de alterações do velo e perda de lã (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003). A diarreia não é frequente em infecções ocasionadas por *Haemonchus* spp..

3.4 Gênero *Ostertagia*

As espécies deste gênero localizam-se no abomaso e são algumas das principais causadoras de gastroenterite parasitária em ruminantes (SANCHO, 2009). Os machos adultos apresentam comprimento entre sete e oito mm nos e as fêmeas entre nove a 12 mm (UENO; GONÇALVES, 1998).

De acordo com Sancho (2009), os ovos de *Ostertagia* spp. são ovóides a elipsóides, não são muito largos e possuem mórula com muitos blastômeros de pequena dimensão. As larvas L3 são consideradas grandes com aproximadamente 797 a 959 µm de comprimento, a bainha da cauda é curta e cônica, possuem 16 células intestinais e a sua extremidade anterior é quadrada. Estudos elucidaram que a cabeça desses parasitos apresentam estruturas semelhantes a ombros, característica importante para sua identificação (VAN WYK et al. 2004).

O ciclo evolutivo desse parasito é direto. Em condições favoráveis, completa seu ciclo em aproximadamente três semanas. Contudo, em determinadas ocasiões muitas L3 ingeridas entram em hipobiose na fase inicial de transformação para L4 e podem permanecer nessa fase por períodos de até seis meses (URQUHART et al., 1998; KNOX, 2000).

Esses helmintos se caracterizam pela penetração e desenvolvimento das suas larvas em glândulas gástricas do hospedeiro, causando lesões no epitélio gástrico e nas células parietais, secretoras de ácido clorídrico, principalmente no momento da emergência das larvas L4. Com isso, ocorre um aumento do pH do abomaso dificultando a digestão proteica, além de predispor a mucosa gástrica às infecções bacterianas secundárias, ocasionando uma reação inflamatória local e prejudicando a permeabilidade do epitélio abomasal (BOWMAN et al., 2003). Esse fato induz a perda de proteínas plasmáticas para a luz intestinal, levando o hospedeiro a apresentar inapetência, diarreia e perda de peso (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003).

3.5 Gênero *Trichostrongylus*

Os parasitos desse gênero encontram-se no intestino delgado do hospedeiro, podendo ocorrer algumas espécies alojadas no abomaso. As fêmeas adultas medem de cinco a sete mm, já os machos adultos de quatro a cinco mm. Seus ovos possuem forma oval, com os polos rapidamente desiguais, são segmentados e apresentam parede fina, com comprimento de 79 a 118 µm por 31 a 56 µm de largura. As larvas L3 são consideradas pequenas, possuindo de 619 a 796 µm de comprimento, com cauda apresentando bainha pequena terminada de forma aguda (UENO; GONÇALVES, 1998).

Apresentam ciclo de vida direto, com o desembainhamento das L3 ocorrendo no abomaso. O tempo do desenvolvimento do ovo até L3, em condições ótimas, compreende de sete a 15 dias. As L3 são extremamente resistentes e sobrevivem ao inverno nas pastagens em número suficiente para causar infecções na primavera (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003).

3.6 Gênero *Cooperia*

Segundo Bowman et al. (2003), os parasitos que pertencem a este gênero se localizam, geralmente, no intestino delgado de ovinos, podendo ser encontrado também no abomaso. São filiformes e pequenos, as fêmeas adultas possuem de 15 a 20 mm e os machos adultos de 10 a 15 mm de comprimento. Geralmente são os parasitos com menor incidência em ovinos, contudo são encontrados em muitas regiões do mundo (UENO; GONÇALVES, 1998; BOWMAN et al., 2003).

Os ovos destes parasitos apresentam paredes paralelas, polos iguais e são arredondados. De acordo com a literatura, as larvas L3 são consideradas grandes com 700 a 977 μm de comprimento (UENO; GONÇALVES, 1998; VAN WYK et al., 2004).

Os parasitos pertencentes a este gênero são considerados moderadamente patogênicos, isso lhes confere um papel secundário na patogenia das gastroenterites parasitárias. Ocasionalmente, normalmente, perda de apetite e consequentemente queda no desempenho produtivo dos animais (URQUHART et al., 1998).

3.7 Gênero *Nematodirus*

As fêmeas adultas deste parasito apresentam comprimento de 15 a 20 mm e os machos adultos de 10 a 15 mm. São considerados exceção entre os Trichostrongylidae, pois possuem ovos maiores que os outros gêneros, com comprimento de 150 a 230 μm e de 67 a 110 μm de largura. Possuem forma elíptica, parede muito resistente conferindo uma viabilidade por longos períodos no ambiente (UENO; GONÇALVES, 1998).

As larvas L3 deste gênero são grandes (933 a 1160 μm de comprimento), possuem a bainha da cauda longa, com intestino apresentando oito células triangulares (SANCHO, 2009).

O ciclo de vida desses parasitos é direto, com exceção na fase exógena, na qual em vez da larva L1 abandonar o ovo, ela continua seu desenvolvimento L2 e L3 no interior do mesmo, eclodindo na forma de L3 e migrando para as pastagens. O desenvolvimento das larvas L1 até L3 é muito lento, podendo demorar até dois meses em regiões de clima temperado (URQUHART et al., 1998).

Segundo Sargison (2008), os ovinos que se encontram gravemente parasitados por estes helmintos, apresentam diarreia aquosa, seguida de desidratação, depressão, dor abdominal, perda de apetite, perda de peso e diminuição no crescimento de lã.

3.8 Ciclo biológico

Segundo Lapage (1976) os parasitos que pertencem à família Trichostrongylidae apresentam ciclo biológico direto, com uma fase de desenvolvimento no ambiente (fase de vida livre) e outra dentro do hospedeiro (fase parasitária), como demonstrado na figura 1:

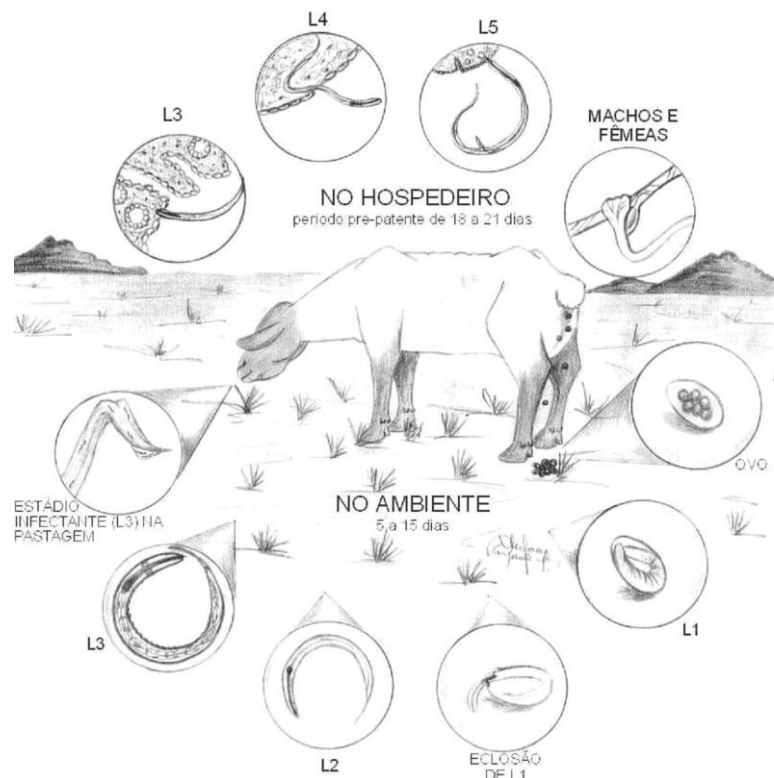


Figura 1- Ciclo biológico de helmintos da família Trichostrongylidae.
Fonte: MORAES, 2002.

3.8.1 Fase de vida livre

Segundo Sotomaior et al. (2009) os parasitos desta família eliminam seus ovos juntamente com o bolo fecal do hospedeiro. Em condições ótimas de temperatura, umidade e oxigênio, em aproximadamente 24 horas, a larva se forma

no interior do ovo. Ocorre a eclosão da larva de primeiro estágio ou L1 que necessita se alimentar de micro-organismos. De acordo com as condições do meio, a L1 realiza duas mudas – trocas de cutícula – para L2 e posteriormente L3. Essa evolução pode variar entre cinco e 10 dias. A L3 não se alimenta, é mais resistente às mudanças do meio e possui maior mobilidade, se dirigindo para fora das fezes. Através desse movimento a larva consegue se localizar nas porções mais sombreadas da pastagem e nas gotículas de orvalho.

A fase infectante aos animais é a larva L3, pois somente ela tem a capacidade de se desenvolver e evoluir dentro do animal após ser ingerida. O processo de evolução do ovo até a L3 pode variar de cinco a sete dias em condições adequadas, já em condições inapropriadas pode prolongar-se por até 30 dias (URQUHART et al., 1998; BOWMAN et al., 2003).

As condições ideais para desenvolvimento das larvas incluem temperatura de 18 a 30°C e umidade superior a 70%. Dados apontam que aproximadamente 40% das larvas L3 podem permanecer viáveis por até 150 dias em ambientes com umidade superior a 85%. No entanto, quando a umidade é inferior a 35%, 60% das larvas morrem em aproximadamente 30 dias (AMARANTE; BARBOSA, 1995; URQUHART et al., 1998). O sombreamento nas pastagens também contribui para o desenvolvimento das larvas, uma vez que impede a ação dos raios ultravioletas e preserva o microambiente com maior umidade. Por essa razão, as partes das pastagens que estão mais próximas do solo apresentam melhores condições para abrigar maior quantidade de larvas infectantes (SOTOMAIOR et al., 2009). Cerca de 95% dos parasitos em um ambiente estão nas pastagens (ovos e larvas) e somente uma pequena porcentagem se encontra parasitando o interior dos animais. Por isso a importância de se entender o ciclo biológico dos parasitos para implementar medidas de controle mais eficazes (URQUHART et al., 1998).

3.8.2 Fase parasitária

De acordo com Urquhart et al. (1998), essa fase se inicia quando o animal ingere a forma infectante (larva L3) juntamente com as pastagens. Após ser ingerida a larva L3 vai para o abomaso ou intestino, dependendo do parasito, penetra na parede para se alimentar. A partir desse momento, o animal já pode apresentar sintomas da parasitose. Logo após sofre nova muda (larva L4) voltando à luz do

órgão, onde evolui para parasitos adultos, se reproduz e inicia a postura de ovos. O período que compreende desde a ingestão da larva até o início da eliminação de ovos nas fezes é de aproximadamente 18 a 21 dias (SOTOMAIOR et al., 2009).

3.9 Controle químico

A redução do número de larvas infectantes é um dos principais alvos do controle das parasitoses (PADILHA; MENDOZA-de-GIVES, 1996). Atualmente, diferentes métodos que visam o controle da população de larvas encontradas no ambiente têm sido estudados, incluindo métodos químicos, imunológicos, de manejo e biológicos. Destes, o mais difundido é o controle químico através do emprego de anti-helmínticos (JACKSON, 2004).

O método convencional de controlar nematoides parasitos de pequenos ruminantes é a utilização de anti-helmínticos sintéticos que agem sobre as formas parasitárias no hospedeiro (WALLER, 2005). Tradicionalmente, o controle dos parasitos gastrintestinais de ruminantes tem se baseado unicamente na utilização de drogas antiparasitárias de amplo espectro (CHARLES; FURLONG, 1996), visando a redução da contaminação das pastagens (BRUNDSON, 1980).

As classes de anti-helmínticos mais utilizados para o tratamento de nematoides são: levamisole e seus análogos (morantel e pirantel), lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) e benzimidazoles (tiabendazole) (PRICHARD, 1990).

Os levamisoles agem como agonistas colinérgicos na membrana das células da musculatura dos nematoides (MOLENTO et al., 2004), produzindo paralisia espástica do parasito (PRICHARD, 1980), causando uma contração muscular estável, o que facilita a sua eliminação (KÖHLER, 2001).

De acordo com Arena et al. (1991) as lactonas macrocíclicas são produzidas pela fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermitilis* e são responsáveis por causar uma hiperpolarização da musculatura dos parasitos nematoides, abrindo irreversivelmente os canais de cloro.

Os benzimidazoles se ligam irreversivelmente à tubulina dos parasitos nematoides (LUBEGA et al., 1991), uma proteína de peso molecular de 25.000 daltons, impedindo sua polimerização em microtúbulos (LACEY; GILL, 1994, MARTIN, 1997). Os microtúbulos são organelas citoplasmáticas que formam o citoesqueleto da célula, movimentam partículas celulares e formam o fuso mitótico

durante a divisão celular (MARTIN, 1997). Apresenta como a formação do fuso mitótico, motilidade e secreção celular, absorção de nutrientes e transporte celular (JASMER et al., 2000). Devido à grande importância dos microtúbulos em alguns dos processos celulares, esta destruição induzida pelo anti-helmíntico induz a morte do organismo (KÖHLER, 2001), pois ocorre uma interrupção do equilíbrio tubulina/microtúbulo acarretando uma cascata de alterações bioquímicas e fisiológicas que podem ser diretas ou indiretas resultando na perda da homeostasia celular (LACEY, 1988).

Secundariamente, os benzimidazoles inibem a enzima fumarato redutase no transporte de glicose, alterando os mecanismos energéticos do parasito (LANUSSE, 1996). O emprego destes fármacos reduz as perdas econômicas, apesar da maioria das medidas de manejo em uso ser feita de forma empírica, com excessos ou subdosagens, administrações em épocas inadequadas e independentes dos aspectos epidemiológicos da doença (CHARLES; FURLONG, 1996; WALLER et al., 1996).

O controle químico de nematoides gastrointestinais possui boa eficácia, eliminando rapidamente muitos dos gêneros e espécies de helmintos parasitos de animais. Entretanto, seu uso exclusivo e excessivo, propiciou o surgimento de nematoides resistentes a esses fármacos (KAPLAN et al., 2004; MOLENTO et al., 2004; SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011). A resistência anti-helmíntica foi registrada pela primeira vez em 1964, nos Estados Unidos por Drudge et al. (1964). No Brasil, o primeiro relato aconteceu no Rio Grande do Sul (DOS SANTOS; GONÇALVES, 1967). Nos últimos anos, a resistência frente aos diferentes princípios ativos utilizados tem ocorrido com maior incidência e velocidade (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012).

Vários fatores podem ser atribuídos ao problema da resistência parasitária. Molento et al. (2004) salientam como principais: tratamentos supressivos, tratamento de todos os animais do rebanho, uso contínuo da mesma base química do composto por longos períodos (mais de um ano), utilização de compostos de longa persistência, aquisição de animais contaminados com parasitos resistentes, doses administradas superiores às recomendadas pelo fabricante, descaso à categoria em que se encontra o animal e estratégias errôneas de manejo. Sendo assim, os tratamentos são concretizados sem base técnica, e como consequência, são seletos os nematoides resistentes às drogas disponíveis no mercado (SILVA, 2007).

Segundo Molento (2009) a resistência parasitária é o fenômeno que impede um fármaco de manter a mesma eficácia sobre os parasitos, se utilizada nas mesmas condições e após um determinado período de tempo. Sob o aspecto farmacológico, esse fenômeno é caracterizado por uma redução no potencial da droga que, normalmente é efetiva contra uma população de parasitos (SANGSTER, 1996). Dessa forma, os parasitos adquirem a capacidade de sobreviver aos tratamentos nas doses terapêuticas recomendadas (TAYLOR; HUNT, 1989). O diagnóstico é definido como “positivo para resistência” quando determinada droga que apresentava redução da carga parasitária (OPG) acima de 99% obtém redução inferior a 80% para dado organismo (MOLENTO, 2009).

A hipótese mais aceita que justifica o desenvolvimento da resistência aos antiparasitários afirma que durante o tratamento com determinado fármaco, ocorre uma seleção de alelos de um ou mais genes (PRICHARD, 1990; BLACKHALL et al., 1998), ocasionando a redução considerável da eficácia desse fármaco e favorecendo a permanência de organismos resistentes e a eliminação de indivíduos suscetíveis (MOLENTO, 2005).

Diante do que foi explanado, a preservação da refugia ambiente deve ser o alvo de todo controle parasitário. Segundo Costa et al. (2011) refugia é um termo utilizado para definir toda a população parasitária que não foi exposta ao processo de seleção pelos fármacos, permanecendo com sua característica primária de suscetibilidade e contribui para a diluição dos genes da resistência anti-helmíntica. Quanto maior for o tamanho da população em refugia, menor será a pressão de seleção e, por conseguinte, o desenvolvimento da resistência será retardado. Portanto, o tamanho da população em refugia pode ter um papel fundamental na manutenção da eficácia dos fármacos, adiando o processo de seleção (MOLENTO, 2005).

Adicionalmente ao problema da resistência parasitária, a presença de resíduos químicos dos fármacos anti-helmínticos nos produtos de origem animal, bem como os riscos de contaminação ambiental que ocasionam efeitos tóxicos a organismos não alvos no meio ambiente (STRONG et al., 1996; SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011) são aspectos relevantes a ser considerados no emprego do controle químico.

Segundo a FAO/WHO (1989), os benzimidazoles possuem efeito tóxico e estudos apontam sobre seus efeitos carcinogênicos, genotóxicos e teratogênicos (LANUSSE et al., 2009).

As avermectinas também imprimem seu impacto em produtos de origem animal. O leite tem máxima importância do que a carne, visto que as avermectinas são lipofílicas e a gordura presente no leite facilita a ligação com o fármaco (FLAJS et al., 2005). A moxidectina é considerada mais lipofílica que a ivermectina, o que permite sua maior tenacidade nos tecidos adiposos (IMPERIALE et al., 2004). No meio ambiente, o principal impacto das avermectinas é a excreção pelas fezes dos animais, o que pode afetar a população de espécies do grupo dos invertebrados, uma vez que as fezes dos animais são degradadas por uma variedade de invertebrados especializados incluindo insetos, outros artrópodes e oligoquetos (EDWARDS et al., 2001).

Diante dos problemas que o tratamento exclusivo com fármacos apresenta, são necessárias estratégias para minimizar a disseminação da resistência e contaminação ambiental. Uma estratégia que tem se mostrado viável e crescente nesse ramo de pesquisa é o emprego de tratamentos alternativos que possam agir de forma sinérgica com os fármacos antiparasitários (CABARET, 2008; KENYON et al., 2009). Nesse sentido, algumas opções estão sendo avaliadas e inseridas no manejo tais como: desenvolvimento de vacinas (KNOX; SMITH, 2001), seleção genética de hospedeiros (GASBARRE; MILLER, 1999), técnicas de tratamento seletivo como Famacha (MOLENTO, 2004), plantas detentoras de taninos (ATHANASIADOU et al., 2001), rotação de pastagens (LARSSON et al., 2007) e utilização de controladores biológicos (ARAÚJO et al., 2006b).

3.10 Controle Biológico

De acordo com Groonvold et al. (1996), o controle biológico é definido como um método ecológico que visa diminuir a população parasitária ou conservá-la em níveis abaixo de um limiar subclínico e economicamente aceitável, evitando assim efeitos severos na população hospedeira.

Esse tipo de controle não atua em estágios que se encontrem dentro de seus hospedeiros, mas sim, concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre, diminuindo a fonte de infecção

para os hospedeiros finais, além de causarem menos efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos (MOTA et al., 2003). Visam completar os métodos tradicionais empregados, assumindo que toda e qualquer população é regulada por antagonistas de forma espontânea na natureza e na carência desses, uma população poderia aumentar indiscriminadamente (ARAÚJO et al., 2014).

De acordo com a literatura há inúmeros antagonistas naturais dos helmintos no meio ambiente, entre eles protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos. Dentre esses organismos destacam-se os fungos nematófagos, os quais vêm demonstrando bons resultados como agentes de biocontrole, podendo ser encontrados nos mais distintos ambientes (KERRY, 2000; RIBEIRO, 2003).

O controle biológico utilizando fungos promove a diminuição de larvas infectantes nas pastagens. Com isso, medidas que têm como objetivo minimizar a contaminação nesses ambientes contribui significativamente para o controle da parasitose (CASTRO et al., 2002).

Os fungos nematófagos estão sendo largamente estudados como agentes de controle biológico de parasitos de importância em medicina veterinária. Os resultados das pesquisas são promissores e evidenciam a redução de espécies patógenas de helmintos, tanto em experimentos *in vitro* como *in vivo* (MENDOZA-DE-GIVES et al., 1992; ARAÚJO et al., 1998; FAEDO et al., 2000; ASSIS; ARAÚJO, 2003; FONTENOT et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004 c; ARAÚJO et al., 2004 d; GRAMINHA et al., 2005; MAIA-FILHO et al., 2013; HOFSTATTER et al., 2016; MAIA-FILHO et al., 2017).

3.10.1 Fungos nematófagos

A primeira descrição de um fungo predador de nematoide foi registrada em 1888 por Zopf (GRAY, 1988). No entanto, Jansson e Poinar (1986) reportaram o achado de um artefato de âmbar, com milhões de anos, o qual continha um fungo predador pertencente ao gênero *Oligaphelenchoides atrebora*. Pesquisas avaliando o efeito dos fungos nematófagos na saúde animal começaram no século XX, na França, demonstrando a ação de fungos predadores sobre larvas infectantes de *Strongyloides papillosus* e *Bunostomum phlebotomum* em condições de laboratório e a campo (DESCAZEUX 1939, DESCAZEUX; CAPELLE 1939, ROUBAUD; DESCAZEUX, 1941 citado por MOTA et al., 2003).

Os fungos nematófagos representam uma ampla variedade de micro-organismos que estabelecem relações predadoras com os nematoides (MANKAU, 1980). Tais fungos utilizados no controle biológico eram classificados como fungos imperfeitos (reprodução assexuada), divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomicetales e família Moliniaceae. Contudo, ao se observar a reprodução sexuada (perfeita) em algumas espécies, foi necessária uma reclassificação para o filo Ascomycota (GRIFFIN, 1994; MOTA et al., 2003).

Os fungos nematófagos são cosmopolitas, presentes em diferentes habitats, principalmente em ambientes ricos em matéria orgânica (FERNANDES, 2011). Podem ser isolados do solo, fezes frescas retiradas da ampola retal do animal (MANUELLI et al., 1999) e do bolo fecal em decomposição no ambiente (MAHONEY; STRONGMAN, 1994; SAUMELL; PADILHA, 2000).

Segundo Barron (1977) e Mota et al. (2003) mais de 150 espécies de fungos nematófagos já foram catalogadas. Tais fungos podem ser denominados de destruidores de helmintos, porém alguns apresentam também características ovicidas podendo predação ovos de helmintos. Comportando-se como antagonistas naturais dos nematoides, são capazes de promover a captura, morte ou mesmo destruição dos parasitos, colaborando para que os desafios relacionados à resistência e ecotoxicidade sejam minimizados. No entanto, o emprego desses agentes de controle não exclui a necessidade de empregar programas integrados de controle parasitário, seleção de animais resistentes e confecção de vacinas (ARAÚJO et al., 1998).

De acordo com a estratégia e o modo de ação sobre os nematoides, os fungos são classificados em ovicidas, predadores e endoparasitas.

Os fungos ovicidas atuam emitindo hifas que se aderem aos ovos. Logo após se prenderem ao ovo, formam expansões no ponto de interação e isso ocasiona danos à casca do ovo, possivelmente por meio da ação de enzimas, o que facilita a penetração das hifas através de pequenos poros existentes na camada vitelínica. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada adjacente quitínica e lipídica (BRAGA et al., 2008). Em decorrência desse processo, a camada vitelínica divide-se, a camada quitinosa torna-se vacuolizada e a camada de lipídios torna-se dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, produzindo e liberando conídios. Estes fungos são capazes decolonizar

o conteúdo do ovo ou a larva em desenvolvimento no seu interior (MORGAN-JONES; RODRIGUEZ-KÀBANA, 1984; MOTA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004a).

A classificação da atividade ovicida é estabelecida de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1 (efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca, na qual são visualizadas as hifas aderidas à casca do ovo); efeito do tipo 2 (efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca); e efeito do tipo 3 (efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo) (LYSEK; NIGENDA, 1989; LYSEK; STERBA, 1991). Portanto, a classificação de um fungo como espécie ovicida somente ocorre se este expor durante o processo de infecção dos ovos o efeito do tipo 3 (LYSEK; CHALUPOVÁ, 1978; LYSEK et al., 1982). Entretanto, Rodríguez-Kábana et al. (1984) delinearam que numa mesma espécie fúngica poderão ocorrer variações no que se refere à habilidade predatória de ovos, e sendo assim, diferenças entre biotipos serão decisivas na determinação de sua ação. Como exemplos deste grupo, destacam-se os fungos *Trichodermavirens* (MAIA-FILHO et al., 2013), *Purpureocillium lilacinum* e *Pochonia chlamydosporia* (MANKAU, 1980; GRAMINHA et al., 2001).

Os fungos predadores produzem um amplo sistema de hifas, e ao longo delas são produzidas estruturas denominadas armadilhas que capturam os nematoides mecanicamente ou por adesão. Esses fungos produzem até seis tipos de armadilhas: hifas adesivas não diferenciadas; ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, nódulos adesivos; anéis constritores e anéis não constritores. A formação das armadilhas funciona como uma resposta dos fungos predadores à presença e migração de nematoides ou de substâncias deles derivadas (GROONVOLD et al., 1996). A captura é realizada através do desenvolvimento de um complexo sistema de hifas vegetativas e por estruturas de captura dispostas ao longo das hifas. Algumas estruturas de captura são ativadas através de estímulos externos, como quantidade e presença dos nematoides, motilidade, estresse fisiológico, produção de substâncias deles derivadas, fatores abióticos como presença de água e luminosidade (ARAÚJO et al., 2004b). Esse grupo é o mais estudado e apresenta maior potencial de comercialização, justamente por ser fácil de ser isolado e de ser mantido em laboratório (GROONVOLD et al., 1996).

A infecção de parasitos nematoides por fungos predadores engloba uma série de eventos: primeiro ocorre adesão das estruturas de infecção na superfície da larva, com posterior penetração na sua cutícula; digestão de tecidos internos e translocação dos nutrientes para partes do micélio (FIELD; WEBSTER, 1977). Como exemplos de fungos predadores, estão os pertencentes aos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (LARSEN, 2000).

De acordo com Mota et al. (2003), os fungos endoparasitas possuem a capacidade de infectar os nematoides através da liberação de seus conídios, embora não apresentem produção de micélio extenso. Uma vez ingeridos, desenvolvem hifas, as quais são responsáveis pela assimilação do conteúdo interno do helminto. A maioria dos fungos endoparasitas são parasitos obrigatórios e por essa razão apresentam uma faixa muito restrita de hospedeiros. Adicionalmente, não têm habilidade de crescimento no solo, o que limita o seu emprego para o controle ambiental de nematoides (RIBEIRO, 2003).

3.10.2 *Trichoderma virens*

As espécies do gênero *Trichoderma* correspondem à fase anamórfica do gênero *Hypocrea*, filo Ascomycota (AGRIOS, 1997). Estes fungos têm grande importância econômica para a agricultura, pois são capazes de atuar como agentes de controle de doenças em várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas à doenças (MOHAMED; HAGGAG, 2006).

O gênero *Trichoderma* é distribuído em todo o mundo, em diferentes tipos de solo, principalmente os que apresentam alta quantidade de matéria orgânica e em ambientes naturais (ESPOSITO; SILVA, 1998). Pode ser também encontrado na rizosfera de plantas (ESPOSITO; SILVA, 1998) e ampola retal de borregos (FREITAS, 2012). A adaptação desse gênero a diversos e diferentes substratos, bem como a sua capacidade de produzir enzimas, o torna de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; SILVA, 1998).

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma virens* são de crescimento rápido, inicialmente de coloração branca apresentando superfície lisa e translúcida, posteriormente tornando-se de aspecto cottonoso e compacto com tufos verdes. A coloração da colônia depende da quantidade de conídios e da sua pigmentação, sendo esta característica influenciada pelo pH do meio de cultivo (DOMSCH, et

al.,1980).Os conídios são unicelulares, de forma subglobosa, ovoide, elipsoide ou elíptica-cilíndrica, com textura lisa ou rugosa e coloração hialina, verde-amarelo ou verde escuro. Sua posição é no ápice das fiálides, em forma de esfera. As fiálides tem forma de cantil com o centro dilatado e ápice afilado, solitárias ou em grupos, hialinas, formando ângulo reto com os conidióforos. Os conidióforos são ramificados, solitários ou em tufo compactos, geralmente de formato cônico ou piramidal. Normalmente mostram-se eretos, formando um ângulo reto com a hifa vegetativa (DOMSCH et al., 1980) como mostra figura 2.

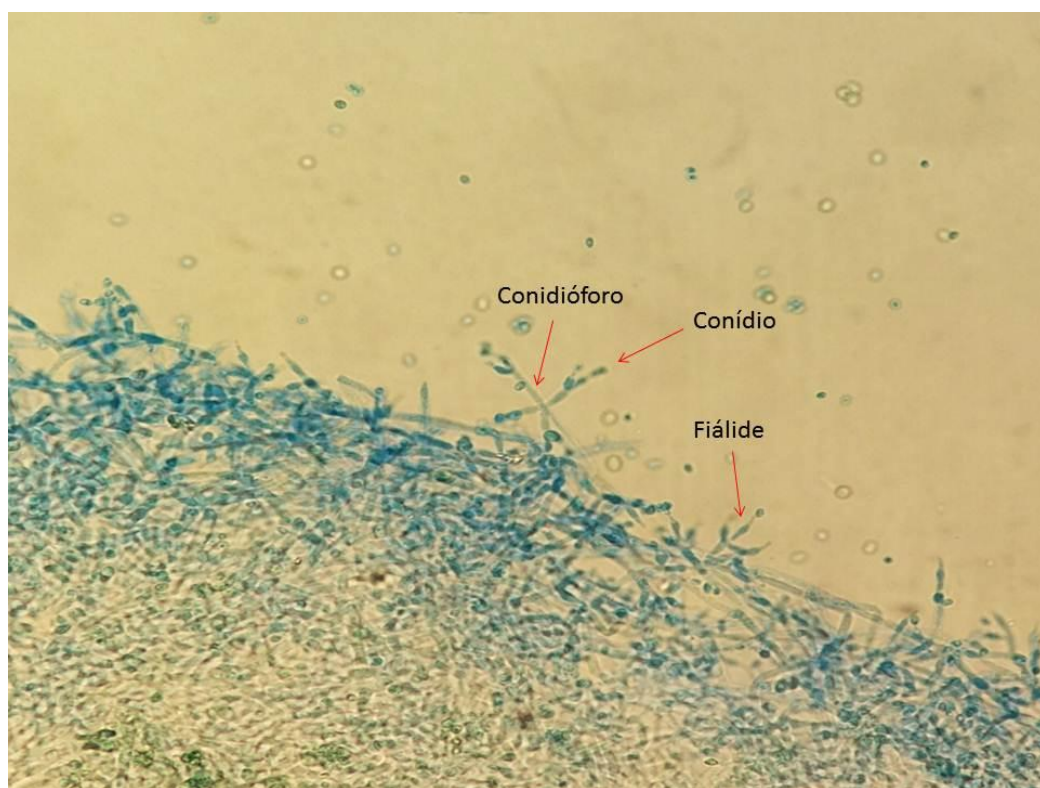


Figura 2- Microcultivo do fungo *Trichoderma virens*, indicando suas estruturas em aumento de 100x.

Trichoderma spp. produzem hidrolases, quitinases (endoquitinases, exoquitinases e β -1,4-N-acetilglucosaminidases), exoglucanases e endoglucanases do tipo β - glucanases (β -1,3 e β -1,6), proteases e celulases (β -1,4- D-glucosidases). Entretanto, a 1,3- β glucanase possui atividade enzimática importante no biocontrole de micro-organismos (DE MARCO et al., 2000). Muitas exoenzimas produzidas por esses fungos são utilizadas em escala industrial e podem atuar em processos de biodegradação de compostos clorofenólicos e na biorremediação do solo (ESPOSITO; SILVA, 1998).

T. virens, descrito previamente como *Gliocladium virens*, possui grande arsenal de mecanismos de ação e produção de compostos antimicrobianos que permitem ação contra diferentes patógenos e o controle de várias doenças de plantas (HOWELL, 2006). A contribuição de enzimas quitinolíticas para a atividade de *T. virens* é menos compreendida, todavia, estas enzimas são consideradas componentes-chave do controle biológico realizado por espécies de *Trichoderma* (ROMÃO-DUMARESQ et al., 2012).

Espécies de *Trichoderma* são usadas como agentes de controle biológico em todo o mundo. Este gênero é utilizado como bionemática no controle de parasitos e fitonematoides, predominantemente do gênero *Meloidogyne* (WINDHAM et al, 1989; EAPEN et al, 2005; SHARON et al., 2007; FERREIRA et al, 2008; SANTIN, 2008). Adicionalmente, estudos *in vitro* realizados por Ciarmela et al. (2002; 2010) e Maia Filho et al. (2013) demonstraram atividade de *Trichoderma* spp. sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*, sugerindo o seu potencial de biocontrole neste importante geohelminto. Hoffstätter et al. (2016), demonstraram a atividade ovicida de extratos brutos enzimáticos de *T. virens* e *Trichoderma harzianum* sobre ovos de *Ancylostoma* spp. e Vieira (2013) evidenciaram ação do extrato etanólico de *Trichoderma longibrachiatum* sobre ovos de *H. contortus*. Segundo El Gorban et al. (2014), os prováveis mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. no controle de nematódeos constituí-se no parasitismo direto de ovos e larvas e no incremento da sua atividade enzimática proteolítica e quitinolítica. Adicionalmente, Srivastava et al. (2014) relataram que a síntese de proteases, quitinases, glucanases, tubulinas, proteínas de adesão celular e genes de tolerância ao estresse são importantes mecanismos que estão envolvidos no controle biológico pelo gênero *Trichoderma*.

Trichoderma spp. produzem hidrolases, quitinases (endoquitinases, exoquitinases e β -1,4-N-acetilglucosaminidases), exoglucanases e endoglucanases do tipo β - glucanases (β -1,3 e β -1,6), proteases e celulasas (β -1,4- D-glucosidases). Entretanto, a 1,3- β glucanase possui atividade enzimática importante no biocontrole de micro-organismos (DE MARCO et al., 2000). Muitas exoenzimas produzidas por esses fungos são utilizadas em escala industrial e podem atuar em processos de biodegradação de compostos clorofenólicos e na biorremediação do solo (ESPOSITO; SILVA, 1998).

T. virens, descrito previamente como *Gliocladium virens*, possui grande arsenal de mecanismos de ação e produção de compostos antimicrobianos que

permitem ação contra diferentes patógenos e o controle de várias doenças de plantas (HOWELL, 2006). A contribuição de enzimas quitinolíticas para a atividade de *T. virens* é menos compreendida, todavia, estas enzimas são consideradas componentes-chave do controle biológico realizado por espécies de *Trichoderma* (ROMÃO-DUMARESQ et al., 2012).

Espécies de *Trichoderma* são usadas como agentes de controle biológico em todo o mundo. Este gênero é utilizado como bionemática no controle de parasitos e fitonematoídeos, predominantemente do gênero *Meloidogyne* (WINDHAM et al., 1989; EAPEN et al., 2005; SHARON et al., 2007; FERREIRA et al., 2008; SANTIN, 2008). Adicionalmente, estudos *in vitro* realizados por Ciarmela et al. (2002; 2010) e Maia Filho et al. (2013) demonstraram atividade de *Trichoderma* spp. sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*, sugerindo o seu potencial de biocontrole neste importante geohelminto. Hoffstätter et al. (2016), demonstraram a atividade ovicida de extratos brutos enzimáticos de *T. virens* e *Trichoderma harzianum* sobre ovos de *Ancylostoma* spp. e Vieira et al. (2013) evidenciaram ação do extrato etanólico de *Trichoderma longibrachiatum* sobre ovos de *H. contortus*. Segundo El Gorban et al. (2014), os prováveis mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. no controle de nematódeos constituí-se no parasitismo direto de ovos e larvas e no incremento da sua atividade enzimática proteolítica e quitinolítica. Adicionalmente, Srivastava et al. (2014) relataram que a síntese de proteases, quitinases, glucanases, tubulinas, proteínas de adesão celular e genes de tolerância ao estresse são importantes mecanismos que estão envolvidos no controle biológico pelo gênero *Trichoderma*.

3.10.3 *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus*)

Purpureocillium lilacinum (LUANGSA-ARD et al., 2011), previamente conhecido como *Paecilomyces lilacinus* é um fungo filamentoso, sapróbio do solo, capaz de crescer em amplas faixas de pH e utilizar diversificadas fontes de substratos (SAMSON, 1974. ANDERSON et al., 1995). É encontrado em diferentes regiões do mundo, com maior frequência em regiões de clima quente (FREITAS et al., 1999). No Brasil, existem registros de *P. lilacinum* em diferentes tipos de hospedeiros e solo, cultivados ou não, em profundidades variáveis de 0-40 cm (CARNEIRO, 1986). Frequentemente tem sido isolado a partir de diferentes hospedeiros ou de substratos provenientes de várias localidades (FARIA; TIGANO,

1996; SOSA-GOMEZ, 2002), com distribuição cosmopolita e maior frequência em solos agricultáveis (DOMSCH et al., 1980).

O gênero *Purpureocillium* pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Ophiocordycipitaceae, anamorfo de ascomiceto da ordem Eurotiales. Os conidióforos deste gênero são ramificados em grupos de bifurcações irregulares. Os conídios são separados das fiálides em forma de corrente. Os conidióforos têm cerca de 600 µm de comprimento e desenvolvem grupos de correntes laterais (DOMSCH, et al., 1980), que podem ser evidenciados na figura 3.



Figura 3-Figura 3 - Microcultivo do fungo *Purpureocillium lilacinum*, indicando suas estruturas, aumento de 100x.

O parasitismo de *P. lilacinum* é facultativo, podendo infectar nematódeos nas fases móveis, fêmeas sedentárias ou mais agressivamente os ovos (JACOBS, 2002).

O fungo quando aplicado ao solo, se estabelece, cresce e dissemina-se rapidamente e, em curto período de tempo, torna-se a espécie dominante (JATALA, 1986). Caracteriza-se por penetrar nos ovos dos nematódeos, destruindo o embrião, podendo prejudicar a capacidade reprodutiva das fêmeas que são colonizadas e

posteriormente mortas (DUNN et al., 1982). A colonização dos ovos parece ocorrer pela simples penetração da parede do ovo por uma hifa individual, auxiliada por atividades mecânicas e/ou enzimáticas (JATALA, 1986). Morgan-Jones et al. (1984), demonstraram que a casca dos ovos de *Meloidogyne arenaria* infectados pelo fungo passa por uma série de alterações ultra-estruturais. Devralan; Seenivasan (2002) registraram o efeito tóxico sobre os fitonematódeos adultos do mesmo gênero. Adicionalmente, Basualdo et al. (2000), relataram que o fungo ao interagir *in vitro* com ovos de *T. canis* altera o desenvolvimento normal do ovo.

P. lilacinum produz serina protease que possui importante papel na penetração do fungo em ovos de nematoides (BONANTS et al., 1995). Khan et al. (2004), demonstraram que a serina protease é a principal enzima envolvida no processo de infecção de várias fases de vida de *Meloidogyne hapla* e *Meloidogyne incognita*. O fungo também secreta grande variedade de metabólitos nematicidas pertencentes a diferentes grupos químicos, incluindo ácidos graxos (Li et al., 2007). O mecanismo nematicida de ácidos graxos é em grande parte desconhecido, mas realizam múltiplas atividades que podem matar nematoides (SHARMA et al., 2014). Previamente, Djian et al. (1991) descreveram a atividade biológica de ácido acético produzido por *P. lilacinus* contra nematoides formadores de galhas.

P. lilacinum vem sendo testado e utilizado com sucesso sobre alguns parasitos: *Meloidogyne javanica* (CARNEIRO; GOMES, 1993; DEVRAJAN; SEENIVRSAN, 2002), *Meloidogyne paranaenses* (CADIOLI et al., 2007), *T. canis* (ARAUJO et al., 1995; BASUALDO et al.; 2000; ARAÚJO et al., 1995; GORTARI et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; MAIA FILHO et al., 2013; MAIA FILHO et al., 2017), *Taenia saginata* (BRAGA et al., 2008a), *Moniezia* sp. (BRAGA et al., 2008b), *Dipylidium caninum* (ARAUJO et al., 2009), *Ancylostoma* spp. (HOFFSTATTER et al., 2016) e *H. contortus* (VIEIRA et al., 2014).

3.10.4 *Duddingtonia flagrans*

Duddingtonia flagrans é a espécie de fungo predador mais estudado e promissora. As pesquisas têm obtido ótimos resultados no controle de helmintos gastrintestinais de animais domésticos ao empregar este fungo como agente de biocontrole (BRAGA et al., 2013a).

O gênero *Duddingtonia* é caracterizado por produzir vários conídios na extremidade dos conidióforos. Os conídios têm formato que varia entre elíptico e ovóide, apresentando um septo mediano, de 25-50 µm de comprimento por 10-15 µm de largura, e produzem grande quantidade de clamidósporos em matéria seca (COOKE; GODFREI, 1964). Os conídios podem ser classificados em dois tipos: conídios com paredes delgadas que surgem de conidióforos eretos em número limitado ou conídios de paredes grossas mais resistentes denominados de clamidósporos (MOTA et al., 2003), como mostra a figura 4.



Figura 4 – Morfologia do fungo *Duddingtonia flagrans*, indicando clamidósporos, aumento de 100x. Fonte - <http://www.granjayosocastro.es/>

Larsen et al. (1992) afirmam que este fungo apresenta alta capacidade de produzir clamidósporos. Essas estruturas de resistência permanecem viáveis após ingestão, sendo eliminadas pelas fezes dos animais. Posteriormente colonizam as fezes após a sua deposição no solo, predando os nematódeos ali presentes por meio de suas hifas adesivas. É importante salientar que este fungo tem a propriedade de sobreviver após apassagem pelo trato gastrointestinal de ruminantes, sendo essa uma característica relevante como um agente de controle biológico (WALLER et al., 2001). Sua atividade no controle de helmintos de importância em veterinária foi relatada frente a *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. (ARAÚJO et al., 2006c), tricostrongilídeos (ARAÚJO et al., 2004b; PARAUD et al., 2005; WALLER et al., 2006; JOBIM et al., 2008; PARAUD et al., 2011; SANTURIO et al.,

2011; SAGUÉS et al., 2011; ARAUJO et al., 2014; FERNANDES et al., 2015), *H. contortus* e *Strongyloides papillosus* (ARAÚJO et al., 2006b), *Ascaris lumbricoides* (BRAGA et al., 2007), *Eurytrema coelomaticum* (BRAGA et al., 2008c), *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni* (BRAGA et al., 2008d), *Ancylostoma* spp. (MACIEL et al., 2006; CARVALHO et al., 2009; MACIEL et al., 2010; MELLO et al., 2014), Ciatostomíneos (BRAGA et al., 2009), *Strongyloides stercoralis* (BRAGA et al., 2010), *Strongyloides venezuelensis* (BRAGA et al., 2011c), *Strongyloides westeri* (ARAUJO et al., 2010), Estrongilídeos de equinos (CARVALHO et al., 2007; ALMEIDA, 2009), *Oesophagostomum* spp. (FERREIRA et al., 2011) e *Angiostrongylus vasorum* (BRAGA et al., 2013).

4 Manuscritos

4.1 Manuscrito1

Atividade ovicida de extratos fúngicos de *Trichoderma virens* e *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de tricostrongilídeos parasitos de ovinos

Cristiane Telles Baptista; Andrios da Silva Moreira; Fernando de Souza Maia Filho; Júlia de Souza Silveira Valente; Natália Pinto Berne; Caroline Quintana Braga; Isabel da Rocha Aldrighi; Luciana Pötter; Daniela Isabel Brayer Pereira

Será submetido à revista Veterinary Parasitology
Artigo formatado segundo as normas da UFPel

Resumo

O presente estudo avaliou a atividade ovicida de extratos enzimáticos de *Purpureocillium lilacinum* e *Trichoderma virens* sobre ovos de tricostrongilídeos parasitos de ovinos. Extrato filtrado (EF) e extrato macerado bruto (MB) dos fungos foram preparados a partir de culturas fúngicas em meio mínimo líquido. Ovos de tricostrongilídeos foram obtidos de fezes de ovinos naturalmente infectados. No ensaio experimental 100 ovos foram expostos, durante 24 e 48 horas/25°C, aos extratos EF e MB de *T. virens* e *P. lilacinum*. No grupo controle, os ovos foram incubados em meio mínimo. Os testes *in vitro* consistiram de cinco repetições e quatro tratamentos. A leitura considerou o número total de larvas L1 (ovos eclodidos) presentes nos grupos tratados e controle. Observou-se que o efeito de EF e MB de *P. lilacinum* e *T. virens* na eclodibilidade dos ovos diferiu do grupo controle em ambos os períodos avaliados ($P < 0.05$). No geral, a ação dos extratos fúngicos em 24 e 48 horas não diferiu entre si. Em *T. virens*, o MB foi superior ao EF ($P < 0.05$); porém, em *P. lilacinum* a ação do MB, em ambos os períodos avaliados, não diferiu do EF em 24 horas. Adicionalmente, o percentual de redução de eclodibilidade do MB de ambos os isolados fúngicos foi superior ao EF, evidenciando-se maiores percentuais de redução de eclosão em 24 horas de exposição aos extratos fúngicos. Considerando que este é o primeiro estudo a avaliar a ação de extratos fúngicos sobre ovos de tricostrongilídeos que parasitam ovinos, acredita-se no potencial de *P. lilacinum* e *T. virens* como agentes de biocontrole destes nematoides.

Palavras chave: controle biológico, fungos nematófagos, eclodibilidade, extratos enzimáticos.

Abstract

The present study aimed to evaluate the *in vitro* action of *Purpureocillium lilacinum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on trichostrongylidae eggs parasitizing sheep. Filtered extract (FE) and crude macerated extract (CME) of the fungi were prepared from fungal cultures in liquid minimal medium. Trichostrongylidae eggs were obtained from feces of naturally infected sheep. In the experimental assay 100 eggs were exposed for 24 and 48 hours / 25°C to the FE and CME of *T. virens* and *P. lilacinum*. In the control group, the eggs were incubated in minimal medium. *In vitro* tests consisted of five replicates and four treatments. The reading considered the total number of larvae L1 (hatched eggs) present in the treated and control groups. It was observed that the FE and CME effect of *P. lilacinum* and *T. virens* extracts on egg hatchability differed from that in the control group in both evaluated periods ($P < 0.05$). On the whole, fungal extract action at 24 and 48 hours did not show any differences. For *T. virens*, CME was superior to FE ($P < 0.05$); for *P. lilacinum*, CME action in both periods evaluated did not differ from FE action at 24 hours. In addition, CME hatch reduction percentage for both fungal isolates was higher as compared to that of FE, evidencing higher percentages of egg hatch reduction to the fungal extract at 24 hours. Since this is the first study to evaluate the effects of fungal extracts on trichostrongylidae eggs parasitizing sheep, we believed in the potential of *P. lilacinum* and *T. virens* as biocontrol agents these nematodes.

Key words: Biological control, nematophagous fungi, hatchability, enzymatic extracts.

4.1.1 Introdução

Nematoides gastrointestinais da família Trichostrongylidae, incluindo os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia* são os parasitos que mais frequentemente infectam os ruminantes (VIANA, 2008). Determinam sérias perdas econômicas, uma vez que causam atrasos no crescimento, diminuição na produção e morte dos hospedeiros infectados (SANTOS et al., 2015). *Haemonchus contortus* é o principal endoparasita de ovinos, seguido por *Trichostrongylus* spp. (SILVA et al., 2013).

Embora o emprego de anti-helmínticos seja o método mais eficaz de controle das helmintoses (PADILHA; MENDOZA-de-GIVES, 1996), desvantagens como nematoides resistentes, presença de resíduos químicos na carne e leite e ecotoxicidade (KAPLAN et al., 2004; MOLENTO et al., 2004; SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011), estimulam as pesquisas que buscam medidas alternativas de controle. Neste contexto, o controle biológico empregando fungos nematófagos como agentes de biocontrole constitui-se numa ferramenta interessante, viável, promissora e ecologicamente amigável (MOTA et al., 2003).

Embora os mecanismos de patogenicidade utilizados por fungos nematófagos ainda não estejam completamente elucidados, evidências sugerem que ação mecânica, bem como enzimática esteja envolvida na penetração e digestão da cutícula dos nematoides (BONANTS et al., 1995, HUANG et al., 2004.; MORTON et al., 2004; YANG et al., 2007).

Estudos prévios utilizando o fungo *Trichoderma* spp. foram realizados por Ciarmela et al. (2002; 2010) e Maia Filho et al. (2013; 2017) sobre *Toxocara canis* e demonstraram sua eficiência no controle desse parasito. Similarmente, *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus*) evidenciou potencial efeito de biocontrole sobre parasitos de importância médica e veterinária incluindo *T. canis* (ARAUJO et al., 1995; BASUALDO et al., 2000; GORTARI et al., 2008; CARVALHO et al., 2010), *Taenia saginata* (BRAGA et al., 2008a), *Moniezia* sp. (BRAGA et al., 2008b) e *Dipylidium caninum* (ARAUJO et al., 2009).

As características do ciclo de vida dos tricostrongilídeos, que inclui a eclosão de ovos em curto período (12 a 24 horas) dificultam o mecanismo de colonização pelos fungos ovicidas. No entanto, Braga et al. (2010, 2011) e Hofstätter et al. (2016) empregando extratos enzimáticos *in vitro* de *Pochonia clamydosporea*, *P. lilacinum* e *Trichoderma virens* evidenciaram inibição da eclosão de ovos de Ciastomíneos e *Ancylostoma* spp., geohelminhos cujos ovos também eclodem em curto intervalo de tempo no ambiente. Contudo, pesquisas avaliando a atividade ovicida de fungos sobre ovos de tricostrongilídeos que parasitam ovinos são escassos.

Este estudo objetivou avaliar a atividade ovicida de extratos enzimáticos de *P. lilacinum* e *T. virens* sobre ovos de helmintos da família Trichostrongylidae que parasitam ovinos.

4.1.2 Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados dois isolados fúngicos: *Purpureocillium lilacinum* (*Paecilomyces lilacinus* CG 193) cedido pelo Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia Embrapa (CENARGEN) e *Trichoderma virens* (MICLAB 008) pertencente a micoteca do Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas. As culturas foram mantidas em tubos contendo agar batata (PDA) a 4°C, posteriormente subcultivadas em placas de Petri com PDA e incubadas a 25°C, durante 10 dias, seguindo metodologia descrita por Hofstätter et al. (2016).

A partir das culturas em meio mínimo líquido, dois diferentes extratos dos fungos foram preparados como segue: o extrato filtrado (EF) foi obtido pela passagem do caldo sobrenadante através de papel filtro Whatman nº1. Para a preparação do extrato macerado bruto (MB), previamente o micélio foi separado do meio sobrenadante e submetido a maceração em três banhos de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, o qual foi imediatamente ressuspensionado ao meio líquido sobrenadante. Os extratos foram preparados e utilizados no mesmo dia.

Aproximadamente 50 g de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de 32 ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrointestinais. As fezes foram acondicionadas em caixas isotérmicas, encaminhadas ao laboratório e imediatamente processadas através da técnica de Gordon; Whitlock (1939) para quantificação

o individual da infecção. As amostras que apresentavam em torno de 1000 ovos/grama de fezes foram submetidas a técnica de recuperação de ovos, conforme previamente descrito por Hubert; Kerboeuf (1992). Brevemente, as fezes foram diluídas e maceradas em água morna e filtradas em tamises de reticulações de 1mm, 105µm, 55 µm e 25µm. Os ovos retidos na malha de menor diâmetro foram lavados em água destilada estéril e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em solução salina hipersaturada e novamente centrifugado nas mesmas condições. Em sequência, o sobrenadante foi filtrado em tamis de 25µm e os ovos coletados por lavagem com água destilada. Dez microlitros desta solução foram analisados entre lâmina e lamínula, contados e utilizados no mesmo dia.

Uma alíquota de 500 µL de cada extrato fúngico (EF e MB) de *T. virens* e *P. lilacinum* foi vertida para placas de cultivo de tecidos. A esse volume foi acrescido 500 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 100 ovos de tricostrongilídeos. Nas placas correspondentes ao grupo controle verteu-se 500 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 100 ovos de tricostrongilídeos acrescido de 500 µL de meio mínimo. As placas foram incubadas a 25°C, durante 24 e 48 horas. Cada tratamento consistiu de cinco repetições.

Após 24 horas de incubação, a leitura foi realizada em lupa estereoscópica e considerou o número total de larvas (ovos eclodidos) de tricostrongilídeos presentes em cada placa dos grupos tratados e controle. A mesma metodologia de leitura foi realizada nas placas que foram incubadas durante 48 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. Como a variável resposta não apresentou normalidade, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando encontradas diferenças entre os tratamentos as médias foram comparadas pelo teste de Bonferroni. As análises foram efetuadas com auxílio do programa estatístico SAS (SAS, 2012) considerando uma probabilidade de 5%. Para cada experimento, também foi calculado o percentual de redução da média de larvas utilizando-se a seguinte equação, conforme citado por Braga et al. (2010, 2011):

$$\% \text{ de redução} = \frac{(\text{média de larvas do grupo controle} - \text{média de larvas do grupo tratado})}{\text{média de larvas do grupo controle}} \times 100$$

4.1.3 Resultados

Na tabela 1 estão demonstrados os resultados da interação dos extratos fúngicos EF e MB de *P. lilacinum* e *T. virens* com os ovos de tricostrongilídeos. A análise estatística evidenciou diferença ($P < 0.05$) no número de larvas entre as formulações de cada fungo e o grupo controle em ambos os períodos avaliados. Com exceção do EF de *P. lilacinum*, observou-se que a ação dos extratos fúngicos em 24 e 48 horas não diferiu entre si ($P > 0.05$). Em *T. virens*, o MB foi superior ao EF, tanto em 24 como em 48 horas de exposição dos ovos ao fungo ($P < 0.05$). Por outro lado, em *P. lilacinum* evidenciou-se que a ação do MB em ambos os períodos avaliados não diferiu do EF, quando avaliado no período de 24 horas. Todavia, tanto a atividade do MB quanto do EF mostrou-se superior ao EF em 48 horas de avaliação ($P < 0.05$). Adicionalmente, observou-se que o percentual de redução de eclodibilidade do extrato MB de ambos os isolados fúngicos foi superior ao extrato EF nos períodos avaliados, evidenciando-se maiores percentuais de redução de eclosão dos ovos em 24 horas de exposição ao extrato dos fungos (tabela 1).

Tabela 1 - Média de contagem de larvas e percentual de redução de eclosão de ovos de tricostrongilídeos em 24 e 48 horas, submetidos ao tratamento com diferentes extratos fúngicos de *Purpureocillium lilacinum* e *Trichoderma virens*.

Fungo (Extrato)	Média de larvas 24 horas	Média de larvas 48 horas	% Redução de Eclodibilidade 24 horas	% Redução de Eclodibilidade 48 horas
<i>T. virens</i> (MICLAB008)				
Macerado	1,20 ^c	5,60 ^c	98,2	92,4
Filtrado	8,70 ^b	15,45 ^b	87,5	78,8
Controle	92,75 ^a	94,30 ^a		
<i>P. lilacinum</i> (CG193)				
Macerado	6,25 ^c	9,30 ^c	91,0	87,3
Filtrado	7,45 ^c	24,50 ^b	89,3	62,1

Controle	92,75 ^a	94,30 ^a
----------	--------------------	--------------------

Médias seguidas de letras diferentes na coluna e linha diferiram estatisticamente (P<0.05)

4.1.4 Discussão

Os fungos nematófagos vêm sendo pesquisados como uma importante ferramenta de controle biológico de parasitos patógenos devido a sua capacidade de capturar e infectar nematoides (HUANG et al., 2004; KHAN et al., 2004.). Embora, os mecanismos de patogenicidade utilizados por fungos nematófagos ainda não estejam completamente elucidados, evidências revelam que enzimas hidrolíticas extracelulares estão envolvidas na penetração e digestão da cutícula dos nematoides (HUANG et al., 2004.; MORTON et al., 2004; YANG et al., 2007).

As características do ciclo de vida dos tricostrongilídeos, que incluem a eclosão de ovos em curto período (12 a 24 horas) e a presença de larvas L3 infectantes nas pastagens (PADILHA, 1996), levaram ao desenvolvimento de estudos empregando fungos nematófagos predadores de larvas (ARAÚJO et al., 2004; PARAUD et al., 2005; WALLER et al., 2006; JOBIM et al., 2008; PARAUD et al., 2011; SANTURIO et al., 2011; SAGUÉS et al., 2011). Contudo, pesquisas avaliando a atividade ovicida de fungos sobre ovos deste grupo de parasitos são escassos.

No presente estudo demonstrou-se que os extratos fúngicos MB e EF preparados a partir de culturas de *T. virens* (MICLAB008) e *P. lilacinum* (CG 193) evidenciaram significativa atividade ovicida sobre ovos de tricostrongilídeos que parasitam ovinos.

Em estudo prévio, Hofstätter et al. (2016), comprovaram a ação ovicida de diferentes preparações de extratos a partir de quatro isolados fúngicos, incluindo *T. virens* (MICLAB008) e *P. lilacinum* (CG 193) sobre ovos de *Ancylostoma* spp.. Embora esses autores tenham observado significativo efeito ovicida dos extratos avaliados, evidenciaram que os extratos MB e EF de *P. lilacinum* (CG 193) não diferiram entre si em sua ação ovicida. Nossos resultados foram similares, uma vez que não foi observada diferença significativa entre a atividade ovicida do EF, quando avaliada sua ação em 24 horas, e o MB de *P. lilacinum* sobre ovos de tricostrongilídeos. No entanto, evidenciou-se que a atividade ovicida do EF deste

fungo em 48 horas foi inferior aos demais extratos avaliados ($P < 0.05$; Tabela 1), sugerindo uma perda da atividade enzimática do extrato em função do tempo.

Adicionalmente, os resultados do presente estudo evidenciaram que a ação dos extratos MB e EF de *T. virens* diferiram entre si, bem como do grupo controle ($P < 0.05$) nos períodos avaliados. Porém, não foi observada diferença na atividade dos extratos quando comparado o período de 24 e 48 horas ($P > 0.05$; Tabela 1). Resultados similares foram relatados por Hofstätter et al. (2016) ao avaliar a ação de MB e EF de *T. virens* sobre ovos de *Ancylostoma* spp.. Por outro lado, os percentuais de redução de eclodibilidade relatados por Hofstätter et al. (2016) tanto para *P. lilacinum* como para *T. virens* foram inferiores aos observados no presente estudo. Os maiores percentuais de redução de eclosão dos ovos de tricostrongilídeos obtidos com os extratos fúngicos avaliados sugerem que os ovos destes nematoides podem ser mais sensíveis à ação enzimática dos extratos de *P. lilacinum* e *T. virens*.

Previamente, Bonants et al. (1995), demonstraram que *P. lilacinum* produz uma enzima serina protease que danifica a casca e induz a vacuolização dos ovos de *Meloidogyne hapla*. Posteriormente, Kahn et al. (2004) avaliando o efeito deste fungo sobre *Meloidogyne javanica* observaram que as lesões de desintegração da camada vitelínica, quitínica e lipídica observadas nos ovos eram decorrentes da degradação enzimática de proteases e quitinases. Esses autores também observaram que uma enzima com atividade de quitinase estava presente no sobrenadante da cultura de *P. lilacinum* e concluíram que essas enzimas facilitavam a penetração física do fungo no ovo, auxiliando no processo de infecção.

Todavia, observou-se que os percentuais de redução de eclodibilidade do MB para ambos os fungos sempre foram superiores, atingindo valores acima de 87%, concordando com os resultados relatados por Hofstätter et al. (2016). Esses autores sugeriram que a atividade superior do MB poderia ser decorrente da presença de enzimas intracelulares que são liberadas durante o processo de maceração e que somadas à ação das enzimas extracelulares secretadas no sobrenadante aumentariam a eficácia do extrato do fungo.

Pesquisas empregando outros gêneros de fungos nematófagos têm sido desenvolvidas com o intuito de avaliar a atividade enzimática de culturas filtradas ou enzimas purificadas sobre larvas e/ou ovos de helmintos gastrointestinais de animais. Similar aos resultados obtidos no presente estudo, Braga et al. (2010,

2011) ao utilizarem extratos brutos enzimáticos do fungo *Pochonia clamydosporea* sobre ovos de ciastostomíneos e *Ancylostoma* spp. reduziram em 72,8% e 76,8%, respectivamente, a eclodibilidade dos ovos em 24 horas, sugerindo o emprego desse fungo no controle biológico dessas parasitoses.

A capacidade dos extratos MB e EF dos fungos avaliados em inibir a eclosão de ovos dos tricostrongilídeos que parasitam ovinos é relevante e merece maiores estudos. Considerando a metodologia de preparação dos extratos, que incluiu a filtração do meio de cultura sobrenadante e a maceração da massa micelial do fungo, e as evidências que proteases, collagenases e quitinases estejam envolvidas na penetração e digestão da cutícula dos nematoides, incluindo *H. contortus* (MANSFIELD et al., 1992; HUANG et al., 2004.; MORTON et al., 2004; YANG et al., 2007), acredita-se que a ação inibitória sobre a eclodibilidade dos ovos de tricostrongilídeos ocorreu pela ação de enzimas hidrolíticas secretadas pelo fungo. De acordo com Homero (1984) os ovos do filo Nematoda possuem uma camada interna lipoproteica, uma intermediária quitinosa e uma externa vitelínica, as quais podem ser suscetíveis a ação dessas enzimas. Contudo, neste estudo não caracterizou-se as enzimas presentes nos extratos enzimáticos avaliados e estudos são necessários para determinar o perfil enzimático desses isolados fúngicos.

Similarmente, estudos realizados por Santin (2008), Romão-Dumaresq et al. (2012) e Ochandía et al. (2015) apontaram que o potencial de *Trichoderma* spp. no controle de fitonematóides deve-sea síntese de metabólitos voláteis inibitórios, bem como de enzimas líticas que degradam a quitina dos ovos, sendo a atividade quitinolítica provavelmente a mais relevante para a lesão da bainha do ovo. Embora o gênero *Trichoderma* seja predominantemente utilizado no controle biológico de fitonematóides (ETHUR et al., 2005; PATRÍCIO et al., 2007), nos últimos anos alguns estudos tem evidenciado sua ação sobre ovos e larvas de *T. canis* (CIARMELA et al., 2002, 2010; MAIA FILHO et al., 2013, 2017) demonstrando o potencial deste fungo como um agente de biocontrole. Igualmente, a utilização de extratos enzimáticos de *T. virens* no presente estudo demonstrou o potencial ovicida deste gênero fúngico sobre ovos de tricostrongilídeos, evidenciando percentuais de redução de eclodibilidade acima de 78%.

Considerando que este é o primeiro estudo a avaliar a ação de extratos fúngicos sobre ovos de tricostrongilídeos que parasitam ovinos e ponderando os

resultados obtidos, acreditamos no potencial de *P. lilacinum* e *T. virens* como agentes de biocontrole.

4.1.5 Conclusão

A eclodibilidade de ovos de tricostrongilídeos que parasitam ovinos após a exposição aos extratos enzimáticos dos fungos *P. lilacinum* e *T. virens* nos períodos de 24 e 48 horas foi significativamente reduzida. No entanto, estudos são necessários para identificar e caracterizar as moléculas responsáveis pelos efeitos observados, bem como para avaliar o comportamento dos extratos fúngicos em experimentos que envolvam interações bióticas e abióticas.

Referências

- ARAUJO, J. V.; SANTOS, M. A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n.47, p.37-42, 1995.
- ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematoides trichostrongilídeos (nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.2, p.65-71, 2004.
- ARAUJO, J.M.; BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.V.; CARVALHO, R.O. Atividade dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas de ovos de *Dipylidium caninum*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, p.488-491, 2009.
- BASUALDO, J. A.; CIARMELA, M. L.; SARMIENTO, P.L; MINVIELLE, M. C. Biological activity of *Paecilomyces* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v.86, p.854–859, 2000.
- BONANTS, P. J. M.; FITTERS, P. F. L.; THIJS, H.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. D. M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, v.141, p.775–784, 1995.
- BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.V.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.686-688, 2008a.
- BRAGA, F. R.; ARAUJO, J.V.; ARAUJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; CAMPOS, A.K.; TAVELA, A.O. Ovicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* on *Moniezia* sp. eggs. **Journal of Helminthology**, n.10, p.1-3, 2008b
- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. H.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; FERREIRA, S. R.; QUEIROZ, J. H. Ovicidal

action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 264-268, 2010.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; GENIÊR, H. L. A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44(1), p.116-118, jan-fev, 2011.

CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* spp. evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. **Journal Helminthology**, v.83, p.1–6, 2009.

CIARMELA, M. L.; LORI, M. G.; BASUALDO, J. A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n.3, p.251-257, 2002.

CIARMELA, M. L.; ARAMBARRI, A. M.; BASUALDO, J. A.; MINVIELLE, M. C. Effect of saprotrophic soil fungi on *Toxocara canis* eggs. **Malaysian Journal of Microbiology**, n.6, p.75-80, 2010.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.127-133, 2005.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in sheep faeces. **Journal Council Science Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

GORTARI, M. C.; GALARZA, B.C.; CAZAU, M.C.; HOURS, R.A. Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. **Malaysian Journal of Microbiology**, n.4, p.35- 41, 2008.

HOFSTATTER, B. D. M.; FONSECA, A. da S.; MAIA-FILHO, F. de S.; VALENTE, J. de S. S.; PERSICI, B. M.; POTTER, L.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, D. I. B. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* spp. Eggs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 2016.

HOMERO, H. Q. **Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos**-Limusa, 1 (1 ed), 1984.

HUANG, X.; ZHAO, N.; ZHANG, K. Extracellular enzymes serving as factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research in Microbiology**, v.155, p.811–816, 2004.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v.130, p.442-446, 1992.

JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; RUE, M. L. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematódeos de bovinos à campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.2256-2263, 2008.

KAPLAN, R. M.; BURKE, J. M.; TERRIL, T. H.; MILLER, J. E.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; LARSEN, M.; VATTA, A. F. Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anaemia in sheep and goats on farms in southern United States. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1, p.105-120, 2004.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggs hell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v.31, p.346 – 352, 2004.

MAIA FILHO, F. S.; VIEIRA, J. N.; BERNE, M. E. A.; STOLL, F. E.; NASCENTE, P. S.; POTTER, L.; PEREIRA, D. I. B. Fungal Ovicidal Activity on *Toxocara canis* eggs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.30, p.226-230, 2013.

MAIA FILHO, F. S.; FONSECA, A. O. S.; PERSICI, B. M.; SILVEIRA, J. S.; BRAGA, C. Q.; POTTER, L.; BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B. *Trichoderma virens* as a biocontrol of *Toxocara canis*: *In vivo* evaluation. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 2017.

MOLENTO, M. B.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. **Parasitology Research**, v.92, p.121-127, 2004.

MORTON, C.O.; HIRSCH, P.R.; KERRY, B.R. Infection of plantparasitic nematodes by nematophagous fungi: a review of the application of molecular biology to

understand infection processes and to improve biological control. **Nematology**, n.6, p.161–170, 2004.

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

OCHANDÍA, D. H.; RODRÍGUES, M. G.; PETEIRA, B.; MIRANDA, I.; ARIAS, Y.; MARTÍNEZ, B. Effect of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckeldt and Nirenberg strain on the development of tomato and *Meloidogyne incognita* (Kofoed and White) Chitwood population. **Revista de Protección Vegetal**, v.30, n.2, 2015.

PADILHA, T. Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil In: Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes. Terezinha Padilha (Ed.) Coronel Pacheco: **EMBRAPA-CNPGL**, p.169-178, 1996.

PADILHA, T.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos tricostrongilídeos: uma alternativa para higienização das pastagens. In: PADILHA, T. Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. Coronel Pacheco: **Embrapa-CNPGL**, p.215-236, 1996.

PARAUD, C.; HOSTE, H.; LEFRILEUX, Y.; POMMARET, A.; PAOLINI, V.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. **Veterinary Research**, v.36, p.157–166, 2005.

PARAUD, C.; LARRAIN, R.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to goats: an evaluation of the impact of this fungus on the degradation of faeces and on free-living soil nematodes. **Journal of Helminthology**, p.1-9, 2011.

PATRICIO, F. R. A.; KIMATI, H.; NETO, J. T.; PETENATTI, A.; BARROS, B. C. Efeito da solarização do solo, seguida pela aplicação de *Trichoderma* spp. ou de fungicidas, sobre o controle de *Pythium aphanidermatum* e de *Rhizoctonia solani* AG-4. **Summa Phytopathology**, Botucatu., v.33, p.142-146, 2007.

ROMAO-DUMARESQ, A. S.; DE ARAUJO, W. L.; TALBOT, N. J.; THORNTON, C. R. RNA Interference of Endochitinases in the Endophyte *Trichoderma virens* 223 Reduces Its Fitness as a Biocontrol Agent of Pineapple Disease Sugarcane. **American Journal Experimental**. n.7, p.1-10, 2012.

SAS Insititute. 2012. SAS 9.4 for Windows. . SAS Institue Inc., Cary, NC, USA.

SAGUES, M. F.; PURSLOW, P.; FERNANDEZ, S.; FUSE, L.; IGLESIAS, L.; SAUMELL, C. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales em el ganado y sus formas de administración. **Revista Iberoamericana de Micologia**, n.28, p.143-147, 2011.

SANTIN, R. C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris*.** Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 91pp.(thesis in portuguese), 2008.

SANTOS, P. R.; BAPTISTA, A. A.S.; LEAL, L. S.; MOLETTA, J. L.; ROCHA, R. A. Nematódeos gastrintestinais de bovinos – revisão. **Revista Científica de medicina Veterinária**, n.24, Ano XXIV, 2015 – Periódico Semestral.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; FANFA, V. R.; FARRET, M. H.; RAGAGNIN, L.; HECKTHEUER, P. A.; MONTEIRO, S. G. A suitable model for the utilization of *Duddingtonia flagrans* fungus in small-flock-size sheep farms. **Revista Experimental Parasitology**, n.127, p.727-731, 2011.

SILVA, A. S.; SCHAFE, A. S.; AIRES, A. R.; TONIN, A. A.; PIMENTEL, V. C.; OLIVEIRA, C. B.; ZANINI, D.; SCHETINGER, M. R. C.; LOPES, S. T. A.; LEAL, M. L. R. E-ADA activity in erythrocytes of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and its possible functional correlations with anemia. **Research in Veterinary Science**, v.1, p.1026-1030, 2013.

SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends Parasitology**, n.27, p.176–181, 2011.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo. **Revista Ovinos**, ano 4, n.12, 2008.

WALLER, P. J.; LJUNGTROM, B.-L.; SCHWAN, O.; RUDBY MARTIN, L.; MORRISON, D. A.; RYDZIK, A. Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: Trials on commercial farms in Sweden. **Revista Acta Veterinaria Scandinavica**, n.47, p.23-32, 2006.

YANG, J.; TIAN, B.; LIANG, L.; ZHANG, K. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.21-31, 2007.

4.2 Manuscrito 2

Ação *in vitro* de extratos de *Trichoderma virens* e *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de tricostrongilídeos parasitos de ovinos

Cristiane Telles Baptista; Andrios da Silva Moreira; Fernando de Souza Maia Filho;
Júlia de Souza Silveira Valente; Carolina Brasil; Natália Pinto Berne; Leonardo
Mortagua de Castro; Caroline Quintana Braga; Luciana Potter; Daniela Isabel Brayer
Pereira

Será submetido à revista Parasitology Research
Artigo formatado segundo as normas da UFPel

Resumo

Este estudo determinou a ação de extratos enzimáticos de *Duddingtonia flagrans* e *Trichoderma virens* sobre larvas L3 de tricostrongilídeos parasitos de ovinos. A partir de culturas em meio mínimo líquido dos *D. flagrans* e *T. virens* foram preparados dois diferentes extratos: extrato filtrado (EF) e extrato macerado bruto (MB). Larvas L3 de tricostrongilídeos foram obtidas a partir de fezes de ovinos naturalmente infectados. Nos testes *in vitro* aproximadamente 100 larvas L3 foram expostas a cada extrato fúngico, durante 24 e 48 horas/25°C. O grupo controle consistiu de larvas L3 e meio mínimo. Os ensaios foram realizados com cinco repetições e quatro tratamentos. Observou-se que, com exceção do EF de *D. flagrans* avaliado em 24 horas, o efeito dos demais extratos fúngicos sobre as larvas L3 diferiram do grupo controle ($P < 0.05$). Em *D. flagrans* o extrato macerado foi superior ($P < 0.05$) ao extrato filtrado em sua capacidade de causar a imobilização das larvas. Já em *T. virens* observou-se que a ação dos extratos MB diferiu entre si, sendo o efeito do MB avaliado em 48 horas superior ($P < 0.05$). Conclui-se que os extratos enzimáticos destes fungos podem vir a ser utilizados no controle biológico de tricostrongilídeos que parasitam ovinos. No entanto, adicionais pesquisas são imprescindíveis para melhor avaliar a ação dos extratos sobre as formas infectantes destes parasitos.

Palavras chaves: Fungos nematófagos, agentes de biocontrole, Trichostrongylidae, helmintos.

Abstract

This study determined the action of enzymatic extracts of *Duddingtonia flagrans* and *Trichoderma virens* on larvae L3 of trichostrongylidea parasitizing sheep. From the *D. flagrans* and *T. virens* cultures in minimal liquid medium, two different extracts were prepared: filtered extract (FE) and crude macerated extract (CME). Trichostrongylidea larvae L3 were obtained from naturally infected sheep. To *in vitro* tests approximately 100 larvae L3 were exposed to fungal extract from each fungal isolate, for 24 and 48 hours/25 °C. The control group consisted of larvae L3 and minimal liquid medium. The assays were performed with five replicates and four treatments. It was observed that, except for *D. flagrans* fungal extract evaluated at 24 hours, the other fungal extracts differed ($P<0.05$) from the control group. For *D. flagrans*, the macerated extract was superior ($P<0.05$) to the filtered extract as to its ability to cause larvae L3 immobilization, while for *T. virens*, it was observed that CME action differed between the evaluated periods, its effect being higher when evaluated at 48 hours ($P<0.05$). We concluded that the enzymatic extracts of these fungi can be used in the biological control of trichostrongylideaparasitizing sheep. However, additional research is essential to better evaluate the action of the extracts on the infective forms of these parasites.

Key words: Nematophagous fungi, biocontrol agents, Trichostrongylidae, helminths.

4.2.1 Introdução

Os parasitos da família Trichostrongylidae são os helmintos que mais acometem os pequenos ruminantes. A utilização de anti-helmínticos é a base do controle químico. No entanto, seu uso excessivo traz desvantagens que incluem o desenvolvimento de nematoides resistentes (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011; KAPLAN, 2004; MOLENTO, 2004), presença de resíduos químicos dos fármacos nos produtos de origem animal e prejuízos ao ambiente (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011). Com a finalidade de minimizar as desvantagens e os problemas do controle químico, pesquisas que visam a implementação de medidas alternativas tornam-se relevantes (MOTA et al., 2003). Neste sentido, o controle biológico constitui-se numa alternativa promissora de combate as parasitoses gastrointestinais, pois ao atuar nas formas infectantes dos helmintos no ambiente, reduz a quantidade de larvas disponíveis e previne a reinfecção das espécies suscetíveis (ARAÚJO, et al., 2004; BRAGA, et al., 2011a). Entre os diversos organismos de biocontrole, destacam-se os fungos nematófagos, que apresentam capacidade ovicida e larvicida sobre os parasitos gastrintestinais de ruminantes (GAMS; ZARE, 2001; CIARMELA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2007).

Estudos realizados utilizando *Duddingtonia flagrans* no controle de helmintos de importância em veterinária foram relatados frente a *Cooperia* spp. e *Oesophagostomum* spp. (ARAÚJO et al., 2006), trichostrongílídeos (ARAÚJO et al., 2004; PARAUD et al., 2005; WALLER et al., 2006; JOBIM et al., 2008; PARAUD et al., 2011; SANTURIO et al., 2011; SAGUÉS et al., 2011), *Ascaris lumbricoides* (BRAGA et al., 2007), *Ancylostoma* spp. (MACIEL et al., 2006; CARVALHO et al., 2009; MACIEL et al., 2010; MELLO et al., 2014), Ciatostomíneos (BRAGA et al., 2009) e *Angiostrongylus vasorum* (BRAGA et al., 2013). Adicionalmente, *Trichoderma* spp. tem se mostrado eficaz como um agente de biocontrole de fitonematóides (SHARON et al., 2001; SANTIN, 2008; BORGES et al., 2013; COSTA, 2015) e de helmintos de importância médica e veterinária como *Toxocara canis* (CIARMELA et al., 2002, 2010; MAIA FILHO et al. 2013; 2017).

Por outro lado, estudos têm demonstrado que o emprego de extratos enzimáticos dos fungos *D. flagrans* e *Monacrosporium thaumasium*, evidenciam expressiva atividade sobre larvas de *Angiostrongylus vasorum* (BRAGA et al., 2011a; SOARES et al., 2012). Adicionalmente, extratos enzimáticos dos fungos *Purpureocillium lilacinum*, *T. virens* e *Pochonia clamydosporia* foram capazes de reduzir a eclosão de ovos de *Ancylostoma* spp. (BRAGA et al., 2011b; HOFSTATTER et al., 2016) e Ciatostomíneos (BRAGA et al., 2010).

Este estudo objetivou avaliar a ação de extratos enzimáticos de *D. flagranse* *Trichoderma virens* sobre larvas de helmintos da família Trichostrongylidea.

4.2.2. Material e Métodos

Neste estudo foram utilizados dois isolados fúngicos: *D. flagrans* (CG 258) e *T.virens* (MICLAB 008) pertencentes a micoteca do Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas. As culturas foram mantidas em tubos contendo agar batata (PDA) a 4°C, posteriormente subcultivadas em placas de Petri com PDA e incubadas a 25°C, durante 10 dias, previamente descrito por Hofstatter et al. (2016).

A partir das culturas em meio mínimo líquido, dois diferentes extratos dos fungos foram preparados como segue: o extrato filtrado (EF) foi obtido pela passagem do caldo sobrenadante através de papel filtro Whatman nº1. Para a preparação do extrato macerado bruto (MB), previamente o micélio foi separado do meio sobrenadante e submetido a maceração em três banhos de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, o qual foi imediatamente ressuspensionado ao meio líquido sobrenadante. Os extratos foram preparados e utilizados no mesmo dia.

Aproximadamente 50 g de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de 32 ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrointestinais. As fezes foram acondicionadas em caixas isotérmicas, encaminhadas ao laboratório e imediatamente processadas através da técnica de Gordon; Whitlock (1939) para quantificação individual da infecção. As larvas L3 foram recuperadas através da

técnica de coprocultura descrita por Roberts; O'Sullivan (1950), quando foram mantidas por sete dias em estufa a 28°C e umidade relativa acima de 80%. Após este período foi realizada a recuperação seguindo a técnica de Baermann (CORT et al., 1922) com modificações. Brevemente, 8 a 10 gramas de fezes foram colocadas sobre uma tela ou peneira forrada com gaze e apoiada na borda superior de um funil, o qual foi fechado e adaptado a um tubo de borracha. Posteriormente, o funil foi preenchido com água aquecida (40-45°C) durante 1 a 2 horas em repouso. Um volume de 10 µL do sedimento utilizado para contagem e identificação das larvas L3 de tricostrongilídeos.

Uma alíquota de 500 µL de cada extrato fúngico (EF e MB) de *T. virens* e *D. flagrans* foi vertida para placas de cultivo de tecidos. A esse volume foi acrescido 500 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 100 larvas L3 de tricostrongilídeos. Nas placas correspondentes ao grupo controle verteu-se 500 µL de uma suspensão contendo aproximadamente 100 larvas L3 de tricostrongilídeos acrescido de 500 µL de meio mínimo. As placas foram incubadas a 25°C, durante 24 e 48 horas, sendo os tratamentos identificados como EF 24, EF 48, MB 24, MB 48, Controle 24 e Controle 48. Cada ensaio *in vitro* consistiu de cinco repetições e quatro tratamentos.

Após 24 e 48 horas de incubação, o conteúdo de cada poço contendo as L3 foi transferido para tamises de 25µm inseridas em outra placa de cultura de tecidos e novamente acondicionadas em estufa a 25 °C por 24 e 48 horas. Posteriormente, os tamises foram removidos e o conteúdo retido foi lavado, sendo coletado nos poços vazios da placa. A contagem das larvas L3 que migraram e das larvas L3 que ficaram retidas nos tamises foi realizada em lupa estereoscópica. Para o presente estudo, considerou-se o número total de larvas inviáveis de tricostrongilídeos presentes em cada placa dos grupos tratados e controle. A mesma metodologia de leitura foi realizada nas placas que foram incubadas durante 48 horas.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições. Como a variável resposta não apresentou normalidade, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando encontradas diferenças entre os tratamentos as médias foram

comparadas pelo teste de Bonferroni. As análises foram efetuadas com auxílio do programa estatístico SAS (SAS, 2012) considerando uma probabilidade de 5%.

4.2.3 Resultados

Evidenciou-se que em *D. flagrans*, os MB24 e MB48 não diferiram entre si, porém diferiram dos extratos filtrados (Tabela 1). Neste fungo, os extratos macerados brutos mostraram-se superiores em sua capacidade de causar a imobilização das larvas. Já em *T. virens* observou-se que os extratos MB24 e MB48 diferiram entre si ($P < 0.05$), sendo o efeito do MB48 superior. Adicionalmente, o efeito do EF24 não diferiu do MB48 (Tabela 1).

Tabela 1-Média de contagem de larvas inviáveis de tricostrongilídeos em 24 e 48 horas submetidos ao tratamento com diferentes extratos fúngicos de *Trichoderma virens* e *Duddingtonia flagrans*.

Fungo (Extrato)	Média de larvas inviáveis	Média de larvas inviáveis
	24 horas	48 horas
<i>T. virens</i>		
Macerado	15,40 ^b	22,15 ^a
Filtrado	18,0 ^{a,b}	13,65 ^b
Controle	4,9 ^c	7,0 ^c
<i>D. flagrans</i>		
Macerado	21,65 ^a	23,50 ^a
Filtrado	7,20 ^c	12,65 ^b
Controle	4,9 ^c	7,0 ^c

Médias seguidas de letras diferentes na coluna e linha diferiram estatisticamente ($p < 0,05$)

4.2.4 Discussão

Os fungos predadores representam um grupo de micro-organismos utilizados no controle biológico de nematoides. Atuam predando larvas infectantes (L3) presentes no ambiente (SOARES et al., 2012).

No geral, os extratos fúngicos avaliados no presente estudo diferiram do grupo controle ($P < 0.05$) em ambos os períodos avaliados. Evidenciou-se que em *D. flagrans* os extratos macerados mostraram-se superiores em sua capacidade de causar a imobilização das larvas, o que se repetiu com o extrato de *T. virens* em 48 horas de avaliação.

Estudos prévios sugerem que o efeito de extratos enzimáticos de fungos sobre ovos e larvas de nematoides seja decorrente da ação de enzimas hidrolíticas, proteases e serinas que atuam sobre a cutícula dos nematoides, inviabilizando-os (LOPEZ-LLORCA; ROBERTSON, 1992; BONANTS et al., 1995; KHAN et al., 2004; SOARES et al., 2012). De acordo com estudos realizados por Soares et al. (2012), a serina protease Mt1 produzida pelo fungo *Monacrosporium thaumasium* (NF34a), causou a inviabilização de 23,9% das larvas (L1) de *Angiostrongylus vasorum*. Similarmente, Braga et al. (2011a) ao avaliarem a ação do extrato bruto enzimático de *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de *Angiostrongylus vasorum*, obtiveram um percentual de redução de larvas de 53,5% e 71,3% em 24 e 48 horas, respectivamente.

Os percentuais de redução de larvas encontrados no presente trabalho diferiram de Braga et al. (2011a) e Soares et al. (2012). Os autores acreditam que essas diferenças foram ocasionadas pelo número de larvas recuperadas para o desenvolvimento dos experimentos *in vitro* que não se comportou consistente em todas as repetições. Todavia, evidenciou-se que os extratos fúngicos, notadamente os extratos macerados de *D. flagrans* e *T. virens* diferiram do grupo controle ($P < 0.05$) em ambos os períodos avaliados. No entanto, outros experimentos são necessários para avaliar e comprovar tais resultados.

4.2.5 Conclusão

O presente estudo demonstrou que os extratos enzimáticos dos fungos *D. flagrans* e *T. virens* foram capazes de inviabilizar as larvas detricostrongilídeos em 24 e 48 horas de exposição. Desta forma, extratos enzimáticos destes fungos podem vir a ser utilizados no controle biológico de tricostrongilídeos que parasitam ovinos. No entanto, adicionais pesquisas são imprescindíveis para melhor avaliar a ação dos extratos sobre as formas infectantes destes parasitos.

Referências

- ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematoides tricostrongilídeos (nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.2, p.65-71, 2004.
- ARAÚJO, J. V.; FREITAS, B. W.; VIERA, T. C.; CAMPOS, A. K. Avaliação do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* em caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, p.76-79, 2006.
- ARAÚJO, J. V.; RODRIGUES, M. L. A.; SILVA, W. W.; VIEIRA, L. S. Controle biológico de nematoides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1177-1181, 2007.
- BONANTS, P. J. M.; FITTERS, P. F. L.; THIJS, H.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. D. M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, v.141, p.775–784, 1995.
- BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O.; MACIEL, A. S. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Veticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.3, p.356-358, 2007.
- BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V. ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; CAMPOS, A. K. Avaliação *in vitro* do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, p.83-85, 2009.
- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. H.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; FERREIRA, S. R.; QUEIROZ, J. H. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, p. 264-268, 2010.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; TAVELA, A. O.; ARAUJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; GENIER, H. L. A.; LIMA, W. S.; MOZZER, L. R.; QUEIROZ, J. H. Atividade larvica do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 383-385, 2011a.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; GENIÊR, H. L. A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44(1), p.116-118, jan-fev, 2011b.

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

BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; TEIXEIRA, W. C.; GUERRA, R. M. S. N. C. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do alto Mearim e Grajaú, estado do Maranhão. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, 2009.

CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* ssp. evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. **Journal Helminthology**, v. 83, p.1–6, 2009.

CIARMELA, M. L.; LORI, M. G.; BASUALDO, J. A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n.3, p.251-257, 2002.

CIARMELA, M. L.; ARAMBARRI, A. M.; BASUALDO, J. A.; MINVIELLE, M. C. Effect of saprotrophic soil fungi on *Toxocara canis* eggs. **Malaysian Journal of Microbiology**, n.6, p.75-80, 2010.

CORT, W.W.; ACKERT, J. E.; AUGUSTINE, D. L.; PAYNE, F. K. Investigations on the control of hookworm disease. II.The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. **American Journal of Hygiene**, v.2, n.1, p.1-16, 1922.

GAMS, W.; ZARE, R. A revisiono of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v.73, n.3-4, p.329-337, 2001.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in sheep faeces. **Journal Council Science Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

HOFSTATTER, B. D. M.; FONSECA, A. da S.; MAIA-FILHO, F. de S.; VALENTE, J. de S. S.; PERSICI, B. M.; POTTER, L.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, D. I. B. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* spp. Eggs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 2016.

JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; RUE, M. L. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematódeos de bovinos à campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.2256-2263, 2008.

KAPLAN, R. M.; BURKE, J. M.; TERRIL, T. H.; MILLER, J. E.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; LARSEN, M.; VATTA, A. F. Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anaemia in sheep and goats on farms in southern United States. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1, p.105-120, 2004.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggs hell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v.31, p.346 – 352, 2004.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; ROBERTSON, W. M. Ultrastructure of infection of cyst nematode eggs by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. **Nematologica**, v.39, p.65–74, 1992.

MAIA FILHO, F. S.; VIEIRA, J. N.; BERNE, M. E. A.; STOLL, F. E.; NASCENTE, P. S.; POTTER, L.; PEREIRA, D. I. B. Fungal Ovicidal Activity on *Toxocara canis* eggs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.30, p.226-230, 2013.

MAIA FILHO, F. S.; FONSECA, A. O. S.; PERSICI, B. M.; SILVEIRA, J. S.; BRAGA, C. Q.; POTTER, L.; BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B. *Trichoderma virens* as a biocontrol of *Toxocara canis*: In vivo evaluation. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 2017.

MACIEL, H. S.; ARAÚJO, J. V.; CECON, P. R. Atividade predatória *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.2, p.71-75, 2006.

MACIEL, A. S.; FREITAS, L. G.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; ARAUJO, J. V. The Biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm, **Veterinary Parasitology**, v.173, p.262-270, 2010.

MELLO, I. N. K.; BRAGA, F. R.; MONTEIRO, T. S. A.; FREITAS, L. G.; ARAUJO, J. M.; SOARES, F. E. F.; ARAUJO, J. V. Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.31, n.4, p.114-118, 2014.

MOLENTO, M. B.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. **Parasitology Research**, v.92, p.121-127, 2004.

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

PADILHA, T.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos tricostrongilídeos: uma alternativa para higienização das pastagens. In: PADILHA, T. Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. Coronel Pacheco: **Embrapa-CNPGL**, p.215-236, 1996.

PARAUD, C.; HOSTE, H.; LEFRILEUX, Y.; POMMARET, A.; PAOLINI, V.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. **Veterinary Research**, v.36, p.157–166, 2005.

PARAUD, C.; LARRAIN, R.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to goats: an evaluation of the impact of this fungus on the degradation of faeces and on free-living soil nematodes. **Journal of Helminthology**, p.1-9, 2011.

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOLL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1889-1895, 2004.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal Agriculture Research**, v.1, p.99-102, 1950.

SAS Insititute. 2012. SAS 9.4 for Windows. . SAS Institue Inc., Cary, NC, USA.

SAGUES, M. F.; PURSLOW, P.; FERNANDEZ, S.; FUSE, L.; IGLESIAS, L.; SAUMELL, C. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales em el ganado y sus formas de administración. **Revista Iberoamericana de Micología**, n.28, p.143-147, 2011.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; DA SILVA, A. S.; FANFA, V. R.; FARRET, M. H.; RAGAGNIN, L.; HECKTHEUER, P. A.; MONTEIRO, S. G. A suitable model for the utilization of *Duddingtonia flagrans* fungus in small-flock-size sheep farms. **Revista Experimental Parasitology**, n.127, p.727-731, 2011.

SILVA, A. S.; SCHAFE, A. S.; AIRES, A. R.; TONIN, A. A.; PIMENTEL, V. C.; OLIVEIRA, C. B.; ZANINI, D.; SCHETINGER, M. R. C.; LOPES, S. T. A.; LEAL, M. L. R. E-ADA activity in erythrocytes of lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus* and its possible functional correlations with anemia. **Research in Veterinary Science**, v.1, p.1026-1030, 2013.

SOARES, F. E. F.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; LIMA, W. S.; LANUSE, R. M.; QUEIROZ, J. H. Q. In vitro from of a serine protease *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, v.110, p. 2423-2427, 2012.

SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends Parasitology**, n.27, p.176–181, 2011.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo. **Revista Ovinos**, ano 4, n.12, 2008.

WALLER, P. J.; LJUNGTROM, B.-L.; SCHWAN, O.; RUDBY MARTIN, L.; MORRISON, D. A.; RYDZIK, A. Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: Trials on commercial farms in Sweden. **Revista Acta Veterinaria Scandinavica**, n.47, p.23-32, 2006.

5 Conclusões

A exposição dos ovos e larvas de tricostrongilídeos aos extratos enzimáticos dos fungos *T. virens*, *P. lilacinum* e *D. flagrans* é capaz de reduzir o percentual de eclodibilidade, assim como o número de larvas viáveis após interação de 24 e 48 horas com os mesmos. Os fungos *T. virens*, *P. lilacinum* e *D. flagrans* são promissores no controle biológico de tricostrongilídeos.

Referências

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, p.635, 1997.

ALMEIDA, G. L. **Atividade Predatória do Fungo *Duddingtonia flagrans* sobre Larvas Infectantes de Estrongilídeos Parasitos de Equinos na Pastagem no Sul do Brasil**. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. Santa Maria, RS, 2009,

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

AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France lambs to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v.120, p.91-106, 2004.

AMARANTE, A. F. T. Controle da verminose ovina. **Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n.34, p.19-30, 2005.30, 2005.

AMARANTE, A. F. T.; SALES, R. O. Controle de endoparasitoses dos ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, n.1, p.91-113, 2007.

ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H.; GAMS, W. Compendium of Soil Fungi. **Lubrecht & camp**; Cramer Ltd. 1995.

ANUALPEC: Anuário estatístico da produção animal. São Paulo: **FNP Consultoria e Comércio**. 2003. 380p.

ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, p.37-42, 1995.

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.1, p.165-171, 2004a.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematoides tricostrongilídeos (nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.2, p. 65-71, 2004b.

ARAÚJO, J. V.; GUIMARÃES, M. P.; CAMPOS, A. K.; SÁ, N. C.; SARTI, P.; ASSIS, R. C. L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciências Rural**, Santa Maria. v.34, n.2, p.457-463, 2004c.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; ALVES, P. H.; CAMPOS, A. K.; GANDRA, J. R. Controle biológico de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.4, p.467-471, 2004d.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.373-380, 2006.

ARAÚJO, J. V. Diagnóstico das helmintoses. Universidade Federal de Viçosa. **Caderno Didático**, 113, p.9-46, 2006a.

ARAÚJO, J. V.; FREITAS, B. W.; VIERA, T. C.; CAMPOS, A. K. Avaliação do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* em caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, p.76-79, 2006b.

ARAÚJO, J. V.; RODRIGUES, M. L. A.; SILVA, W. W.; VIEIRA, L. S. Controle biológico de nematoides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.8, p.1177-1181, 2007.

ARAUJO, J.M.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O. Atividade dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas de ovos de *Dipylidium caninum*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.68, p.488-491, 2009.

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

ARAÚJO, F. B. **Isolamento, caracterização e eficácia de fungos nematófagos autóctones do Rio Grande do Sul no controle de nematóides gastrintestinais de ovinos.** – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Pelotas, RS, 2014.

ARENA, J. P.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; CULLY, D. F. Avermectin-sensitive chloride currents induced by *Caenorhabditis elegans* RNA in *Xenopus oocytes*. **Molecular Pharmacology**. v.40, p.368-374, 1991.

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 gastrointestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. **Revista brasileira de Medicina Veterinária**. v.12, n.3, p.109-113, 2003.

ASSIS, R. C. L. **Viabilidade dos fungos predadores *Monacrosporium thaumasium* e *Duddingtonia flagrans* e da moxidectina sobre nematoides gastrintestinais de bovinos de corte**/Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, título II, Universidade Federal de Viçosa, 2014.

ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; JACKSON, F.; COOP, R. L. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Veterinary Parasitology**, v.99, p.205-219, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 24 out. 2015.

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

BASUALDO, J.; MINVIELLE, M.; PEZZANI, B.; NIEDFELD, G. Relationship between parasitological inoculum and immunologic parameters in experimental toxocariasis. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 282, p.465-473, 1995.

BASUALDO, J. A.; CIARMELA, M. L.; SARMIENTO, P.L; MINVIELLE, M. C. Biological activity of *Paecilomyces* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v.86, p.854–859, 2000.

BONANTS, P. J. M.; FITTERS, P. F. L.; THIJS, H.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. D. M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. **Microbiology**, v.141, p.775–784, 1995.

BORGES, F. G.; BATTISTUS, S. G.; MULLER, M. A.; MIORANZA, T. M.; KUHN, O. J. Manejo alternativo de nematoides de galha (*Meloidogyne incognita*) em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Scientia Agraria Paranaensis – SAP**. Mal. Cdo. Rondon, v.12, p.425-433, 2013.

BOWMAN, D. D.; GEORGI, J. R.; LYNN, R. C. Georgi's parasitology for veterinarians. 8th ed. St. Louis; **Saunders Publishing Company**, 2003. 422p.

BLACKHALL W. J., POULIOT, J. F. PRICHARD, R. K., BEECH, R. N. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. **Experimental Parasitology**, v.90, n.1, p.42-48, 1998.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, p.356-358, 2007.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.686-688, 2008a.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; CAMPOS, A. K.; TAVELA, A. O. Ovicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* on *Moniezia* sp. eggs. **Journal of Helminthology**, n.10, p.1-3, 2008b.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O. Observação *in vitro* da ação dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Pochonia clamydosporea* sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum*. **Parasitologia Latinoamericana**, v.63, p.40-45, 2008c.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. *In vitro* evaluation of the action of the nematophagous

fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.1559–1564, 2008d.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R.O.; CAMPOS, A.K. Avaliação *in vitro* do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v.18, p.83-85, 2009b.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; FERREIRA, R. S.; QUEROZ, H. J. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, n.172, p.264-268, 2010a.

BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; FRASSY, L. N. Atividade predatória dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Artrobotrys robusta* sobre larvas infectantes de *Strongyloides stercoralis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.5, p. 588-590, set-out, 2010b.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; GENIÊR, H. L. A. Ação do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.1, 2011a.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; LIMA, W. S.; MOZZER, L. R.; QUEIROZ, J. H. Atividade larvicida do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.3, 2011b.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; SILVA, M. E.; FERNANDES, F. M.; MELO, A. L. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.3, p. 389-391, mai-jun, 2011c.

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

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

BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; TEIXEIRA, W. C.; GUERRA, R. M. S. N. C. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do alto Mearim e Grajaú, estado do Maranhão. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.3, 2009.

BRUNDSON, R. V. Principles of helminth control. **Veterinary Parasitology**, v.6, p.185-215, 1980.

CABARET, J. Pro and cons of targeted selective treatment against digestive-tract strongyles of ruminants. **Parasite**, v.15, p.506–509, 2008.

CADIOLE, M. C.; SANTIAGO, D. C.; HOSHINO, A. T.; HOMECHIN, M. Crescimento micelial e parasitismo de *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Meloidogyne paranaensis* em diferentes temperaturas “*in vitro*”. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, 2007.

CARNEIRO, R. M. D. G. **Etude des possibilités d'utilisation du champignon nematophage *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, 1974, comme agent de lutte biologique contre *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889)**, Chitwood, 1949. 1986. 119f. Tese (Doutorado)-Universite des Sciences et Techniques du Languedoc, Paris.

CARNEIRO, R.M.G.G.; GOMES, C.B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecylomices lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.7, p.66-75, 1993.

CARVALHO, L. M. M.; GILLESPIE, A. T.; SERRA, P. M.; BERNARDO, F. A.; FARRIM, A. P.; FAZENDEIRO, I. M. Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrongilidose equina no Ribatejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. 2007.

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

CARVALHO, R.O; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; ALVES, C.D. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p.123-127, 2010.

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

CIARMELA, M. L.; LORI, M. G.; BASUALDO, J. A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 103, n.3, p.251-257, 2002.

CIARMELA, M. L.; ARAMBARRI, A. M.; BASUALDO, J. A.; MINVIELLE, M. C. Effect of saprotrophic soil fungi on *Toxocara canis* eggs. **Malaysian Journal Microbiology**, n.6, p.75-80, 2010.

CORT, W.W.; ACKERT, J. E.; AUGUSTINE, D. L.; PAYNE, F. K. Investigations on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. **American Journal of Hygiene**, v.2, n.1, p.1-16, 1922.

COSTA, F. S. M. **Dinâmica das infecções por helmintos gastrintestinais de bovinos na região do vale do Mucuri**, 128 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2007.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.31, p. 65-71, 2011.

COSTA, M. A. **Biocontrole de nematoides com fungos**. 44 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, 2015.

COUTO, F. A. d'A. Dimensionamento do mercado da carne ovina e caprina no Brasil. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: EMEPA, 2003. CD ROM.

COOKE, R. C.; GODFREY, B. E. S. A key to nematode destroying fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.47, n.1, p. 61, 74, 1964.

CHARLES, T.P. FURLONG, J. A survey of dairy cattle worm control practices in Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.65, p.65-73, 1996.

DE MARCO, J. L.; LIMA, L. H. C.; SOUSA, M. V. DE; FELIX, C. R. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicios*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.16, n.1, p.383-386, 2000.

DESCAZEUX, J. Action des champignons Hyphomycetes predateur sur les larves de certain nematodes parasites des ruminants. **Bulletin de la Societe de Pathologic Exotique**, v.32, p.457-459, 1939.

DESCAZEUX, J. & CAPELLE, R. Contribution à l'etude des champignons prédateurs des larves de nématodes parasites des animaux domestiques. **Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France**, v.12, p.284-288, 1939.

DEVRAJAN, K.; SEENIVASAN, N. Biochemical changes in banana roots due to *Meloidogyne incognita* infected with *Paecilomyces lilacinus*. **Current Nematology**, v.13, n.1, p.1-5, 2002.

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

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T. H. Compendium of soil fungi. CRC Pres, London, p.630, 1980.

DUNN, M.; SAYRE, R. M.; WERGIN, W. P. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson as observed with scanning electron microscope. **Scanning Electron Microscopy**, p.1351-1357, 1982.

DJIAN, C.; PIJAROWSKI, L.; PONCHET, M.; ARPIN, N. & BONVIN, F. J. Acetic acid: a selective nematicidal metabolite from culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson and *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. **Nematologica**, n.7, p.101-112. 1991.

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

EAPEN, S.J.; BEENA, B.; RAMANA, K.V. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.88, p.218-225, 2005.

ECHEVARRIA, F. A. M.; TRINDADE, G. N. P. Anthelmintic resistance by *Haemonchus contortus* to ivermectin in Brazil. **Veterinary Record**, v.124, p.147-148, 1989.

EDWARDS, C. A; ATIYEH, R. M; ROMBTE. Journal of Environment Impact of Avermectins. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.171, p.111-137, 2001.

EL GORBAN, A.M.; ABDEL-WAHAB, M.A.; BAHKALI, A.H.; AL-SUM, B.A. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* on Tomato Plants by *Hypocrea lixii* (the Teleomorph of *Trichoderma harzianum*). *Clean – Soil, Air, Water*, v.42, p.1464–1469, 2014.

EMATER. Pesquisa de mercado: carne de ovinos e caprinos. Brasília, DF: Emater-DF, 2005. Disponível em: <http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/mercado_cap_ov_sebrae.pdf>. Acesso em: 15 out. 2016.

ESPÓSITO, E.; SILVA, M. DA. Sisthematics and Environmental Applications of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews In Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 89-98, 1998.

ETHUR, L. Z.; BLUME, E.; MUNIZ, M.; SILVA, A. C. F.; STEFANELO, D. R.; ROCHA, E. K. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.127-133, 2005.

FAEDO, M.; LARSEN, M.,S.; THAMSBORG, S. Effect different times of administration of the nematophagous fungus *Dunndingtonia flagrans* on the transmission of ovine parasitic nematodes on pasture – a plot study. **Veterinary Parasitology**, v.94, p.55-65, 2000.

FARIA, M.R.; TIGANO, M.S. Coleção de fungos entomopatogênicos do Cenargen. **Embrapa** - Serviço de Produção e Informação. 76P, 1996.

FAO, 2015. <http://www.fao.org/faostat/en/#country/21>

FERNANDES, F. M. **Controle Biológico de Nematoides Gastrintestinais de Bovinos por meio da Associação de Fungos Helmintófagos e Pesquisa de Parasitose Intestinais em Humanos na Zona da Mata de Minas Gerais.** Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 48f, 2015.

FERNANDEZ, M. F. **Avaliação da ação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*.** 2011. 44f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

FERREIRA, P. A.; FERRAZ, S.; LOPES, E.A.; FREITAS, L.G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.2, p15-21, 2008.

FERREIRA, S. R. F.; ARAÚJO, J. V. A.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; FERNANDES, F. M. *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of *Oesophagostomum* spp. after passing through gastrointestinal tract of pigs. **Original Research**, 2011.

FIELD, J. I.; WEBSTER, J. Traps of predacious fungi attract nematodes. **Transactions of the British Mycological Society**, v.68, p. 467-469, 1977.

FONTENOT, M. E.; MILLER, J. E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.1, p.203-213, 2003.

FLAJS, V.C.; GRABNAR, I.; ERZEN, N.K.; MARC, I.; POZGAN, U.; GOMBAC, M.; KOLAR, L.; POGACNIK, M. Pharmacokinetics of doramectin in lactating dairy sheep and suckling lambs. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.529, p.353-359, 2005.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas e substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. **Nematologia Brasileira**, Brasília, v.23, n.1, p.65-73, 1999.

GAMS, W.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v.73, n.3-4, p.329-337, 2001.

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

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in sheep faeces. **Journal Council Science Industrial Research**, v.12, p.50-52, 1939.

GORTARI, C.; CAZAU, C.; HOURS, R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.24, p.24-28, 2007.

GORTARI, M. C.; GALARZA, B. C.; CAZAU, M. C.; HOURS, R. A. Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. **Malaysian Journal of Microbiology**, n.4, p.35- 41, 2008.

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

GRAMINHA, É. B. N.; MONTEIRO, A. C.; SILVA, H. C. da; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. da. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.927-933, 2005.

GRAY, N. F. Fungi attackhing vermiform nematodes. In: POINAR, O.G.; BORNE, J.H. (Eds). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, p.3- 38, 1988.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. Wiley-Liss, New York, p. 1- 458, 1994.

GROONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **Veterinary Parasitology**,v. 64, n.1-2, p.47-64. 1996.

HART S. Effective and sustainable control of nematode parasites in small ruminants: The need to adopt alternatives to chemotherapy with emphasis on biologic control. 5º SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS. João Pessoa. In CD-ROM, 2011.

HOFSTATTER, B. D. M. ; FONSECA, A. da S.; MAIA-FILHO, F. de S.; VALENTE, J. de S. S.; PERSICI, B. M.; POTTER, L.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, D. I. B. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* spp. Eggs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 2016.

HOMERO, H. Q. **Parasitología y enfermedades parasitárias de animales domésticos**-Limusa, 1 (1 ed), 1984.

HOWELL, C. R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control diseases. **Phytopatology**, Lancaster, v.96, p.178-180, 2006.

HUANG, X.; ZHAO, N.; ZHANG, K. Extracellular enzymes serving as factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research in Microbiology**, v.155, p.811–816, 2004.

HUBERT, J.; KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v.130, p.442-446, 1992.

IMPERIALE, F.; LIFSCHITZ, A; SALLOVITZ, J. et al. Comparative, depletion of ivermectin and moxidectin Milk residues in dairy sheep after oral and subcutaneous Administration. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.427-433, 2004.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatísticas: pecuária (rebanhos)**, 2012. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: **Produção da pecuária municipal**, 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/default.shtm>> Acesso em: 21 fev. 2015.

JACOBS, P. Nematophagous fungi: Guide Philip Jacobs, BRIC version. <http://www.biologicalresearch.com/philipjacobs%20BRIC/palila.htm>. 2002.

JACKSON, F. Antihelmintics - What's the alternative? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, s.1, p.62-8, 2004.

JANSSON, H. B.; POINAR, O. G. Some possible fossil nematophagous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.87, p.471-474, 1986.

JASMER, D. P.; YAO, C.; REHMAN, A.; JOHNSON, S. Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.105, p.81-90. 2000.

JATALA, P. Biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p.453-489, 1986.

JOBIM, M. B.; SANTURIO, J. M.; RUE, M. L. Duddingtonia flagrans: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.8, p. 2256-2263, nov, 2008.

KAPLAN, R. M.; BURKE, J. M.; TERRIL, T. H.; MILLER, J. E.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; LARSEN, M.; VATTA, A. F. Validation of the FAMACHA® eye color chart for detecting clinical anaemia in sheep and goats on farms in southern United States. **Veterinary Parasitology**, v.123, n.1, p.105-120, 2004.

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

KENYON, F.; GREER, A. W.; COLES, G. C.; CRINGOLI, G.; APADOPOULOS, E.; CABARET, J.; BERRAG, B.; VARADY, M.; VAN WYK, J. A.; THOMAS, E.; VERCROYSE, J.; JACKSON, F. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants, **Veterinary Parasitology**, v.164, p.3–11, 2009.

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, n.1, p.323-441, 2000.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v.31, p.336-345. 2001.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggs hell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, v.31, p.346 – 352, 2004.

KNOX, D. P. The pathogenesis of ostertagiosis – worm or host-mediated changes? **The Veterinary Journal**, London, v.159, p. 217-219, 2000.

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

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **International Journal of Parasitology**, v.18, p. 885–936, 1988.

LACEY, E.; GILL, J. H. Biochemistry of benzimidazole resistance. **Acta Tropica**, v. 56, p.245-62, 1994.

LANUSSE, C. E. Farmacologia dos compostos anti-helmínticos. In: CHARLEST.P. (Ed) **Controle dos nematódeos gastrintestinais**. Juiz de Fora, Minas Gerais, p.1-44, 1996.

LANUSSE, C. E.; ALVAREZ, L. I.; LIFSCHITZ, A. L. Princípios farmacológicos da terapia anti-helmíntica. CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; CHAGAS, A. C. S.; LAPAGE, G. **Parasitologia veterinária**. 4ª Ed. México: Companhia Editorial Continental S. A., 1976, 790p.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P. 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., 2000. Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. **Parasitology**, v.20 p.121–131, 2000.

LARSSON, A.; DIMANDER, S. O.; RYDZIK, A.; UGGLA, A.; WALLER, P.J.; HÖGLUND, J. A 3- year field evaluation of pasture rotation and supplementary feeding to control parasite infection in first-season grazing cattle – dynamics of pasture infectivity. **Veterinary Parasitology**, v.145, p.129–137, 2007.

LEAL, T. M. A redução de anti-helmínticos no controle da verminose em caprinos e ovinos. **Portal dia de campo**. 2012. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/>>. Acesso em: 24 nov. 2015.

LI, G. H.; ZHANG, K. Q.; XU, J. P.; DONG, J. Y.; LIU, Y. J. Nematicidal substances from fungi, **Recent Pathology and Biotechnology**, v.1, p.212-233. 2007.

LOPEZ-LLORCA, L. V.; ROBERTSON, W. M. Ultrastructure of infection of cyst nematode eggs by the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. **Nematologica**, v.39, p.65–74, 1992.

LUBEGA, G. W.; PRICHARD, R. K. Interaction of Benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: Binding affinity and anthelmintic efficacy. **Experimental Parasitology**, v.73, p.203- 13, 1991.

LUANGSA-ARD, J. J.; HOUBRAKEN, J.; VAN DOORN, T.; HONG, S-B.; BORMAN, A.M.; HYWEL-JONES, N.L.; SAMSON, R. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.321, p.141–149, 2011.

LYSEK, H.; CHALUPOVÁ, V. Quantitative determination of activity of ovicidal fung. *gfvActa* **Univesity Palackianae Olomucensis**, 1978.

LYSEK, H. The problem of human geohelminthoses and the prospects for their biological control. **Acta Univesity Palackianae Olomucensis**, Fac Med, v.103, p.315-329, 1982.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de autodeshelmintización del suelo. **Salud Pública de México**. v.31, p.763-771, 1989.

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

MACEDO, F. A. F.; SIQUEIRA, E. R.; MARTINS, E. N. Análise econômica da produção de carne de cordeiros sob dois sistemas de terminação: pastagem e confinamento. **Ciência Rural**, v.30, n.4, p.677-680, 2000.

MACIEL, A. S.; ARAUJO, J. V.; CAMPOS, A. K. Viabilidade sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. dos fungos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* após esporulação em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, n.1, p. 182-187, 2006.

MACIEL, A. S.; FREITAS, L. G.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; ARAÚJO, J. V. The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. **Veterinary Parasitology**, v.173, p. 262-270, 2010.

MAHONEY, C. J.; STRONGMAN, D. B. Nematophagous fungi from cattle manure in four states of decomposition at three sites in Nova Scotia, Canada. **Mycologia**, v.86, n.3, p.371-375, 1994.

MAIA-FILHO, F. de S.; VIEIRA, J. N.; BERNE, M. E. A.; STOLL, F. E.; NASCENTE, P. S.; POTTER, L.; PEREIRA, D. I. B. Fungal ovicidal activity on *Toxocara canis* eggs. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.30, l. 4, p.226-230, 2013.

MAIA FILHO, F. S.; FONSECA, A. O. S.; PERSICI, B. M.; SILVEIRA, J. S.; BRAGA, C. Q.; POTTER, L.; BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B. *Trichoderma virens* as a biocontrol of *Toxocara canis*: In vivo evaluation. **Revista Iberoamericana de Micología**, 2017.

MANUELLI, P. R.; WALLER, P. J.; FAEDO, M.; MAHOMMED, F. Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. **Veterinary Parasitology**, v.81, p.39-45, 1999.

MANKAU, R. Biological control of nematode pest by natural enemies. **Annual Review of the Phytopathology**, v.18, p.415-440, 1980.
MARTIN, R. J. Modes of action of anthelmintic drugs. **Veterinary Parasitology**, v.154, p.11-34. 1997.

MELLO, I. N. K.; BRAGA, F. R.; MONTEIRO, T. S. A.; FREITAS, L. G.; ARAÚJO, J. M.; SOARES, F. E. F.; ARAÚJO, J. V. Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n.2, p.114-118, 2014.

MENDOZA-de-GIVES, P.; ZAVALA-MEJIA, E.; QUIROZ-ROMERO, H.; HERRERA-RODRIGUES, D.; PERDOLMO-ROLDAN, F. Interaction between the nematode destroying fungus *Arthrobotrys robusta* (Hyphomycetales) and *Haemonchus contortus* infective larvae *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v.41, p.101-107, 1992.

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.2, p.181-191, 2006.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino- Americano de Ricketisioses**, Ouro Preto, MG, 2004a.

MOLENTO, M. B.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. **Parasitology Research**, v.92, p.121-127, 2004b.

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

MOLENTO, M. B. (Eds). **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**, p.549-603, 2009.

MOLENTO, M. B. Resistência Parasitária. In: CAVALCANTE, A.C.R.; VIEIRA, L. da S. et al. **Doenças parasitárias de caprinos e ovinos: epidemiologia e controle**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p.603, 2009.

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

MORGAN-JONES, G.; WHITE, J.F.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R. Phytonematode pathology: ultrastructural studies.II.Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. **Nematropica**, v.14, p.155-170, 1984.

MORTENSEN, L. L.; WILLIAMSON, L. H.; TERRILL, T.H. et al. Evaluation of revalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of goats. **Journal Of the American Veterinary Medical Association**, v.23, p.495–500, 2003.

MORTON, C.O.; HIRSCH, P.R.; KERRY, B.R. Infection of plantparasitic nematodes by nematophagous fungi: a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. **Nematology**, n.6, p.161–170, 2004.

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

NOGUEIRA FILHO, A. Ações de fomento do Banco do Nordeste e potencialidades da caprino-ovinocultura. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 2., 2003, João Pessoa. **Anais...**João Pessoa: EMEPA, 2003. CD ROM.

NOGUEIRA, E. A.; NOGUEIRA JUNIOR, S. Ovinos e caprinos avançam em São Paulo. São Paulo: **Instituto de Economia Agrícola**, 2005.

OCHANDÍA, D. H.; RODRÍGUES, M. G.; PETEIRA, B.; MIRANDA, I.; ARIAS, Y.; MARTÍNEZ, B. Effect of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckeldt and Nirenberg strain on the development of tomato and *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood population. **Revista de Protección Vegetal**, v.30, n.2, 2015.

PADILHA, T. Controle da verminose gastrintestinal em pequenos ruminantes nas regiões áridas e semi-áridas do nordeste do Brasil In: Controle dos nematódeos gastrintestinais dos ruminantes. Terezinha Padilha (Ed.) Coronel Pacheco: **EMBRAPA-CNPGL**, p.169-178, 1996.

PADILHA, T.; MENDOZA-DE-GIVES, P. Controle microbiano das formas de vida livre dos nematódeos tricostrongilídeos: uma alternativa para higienização das pastagens. In: PADILHA, T. **Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes**. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL, p.215-236, 1996.

PARAUD, C., HOSTE, H., LEFRILEUX, Y., POMMARET, A., PAOLINI, V., PORS, I.Ç CHARTIER, C. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. **Veterinary Research** n.36, p.157–166, 2005.

PARAUD, C.; LORRAIN, R.; PORS, I.; CHARTIER, C. Administration of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to goats: an evaluation of the impact of this fungus on the degradation of faeces and on free-living soil nematodes. **Journal of Helminthology**, p. 1-9, 2011.

PATRICIO, F. R. A.; KIMATI, H.; NETO, J. T.; PETENATTI, A.; BARROS, B. C. Efeito da solarização do solo, seguida pela aplicação de *Trichoderma* spp. ou de fungicidas, sobre o controle de *Pythium aphanidermatum* e de *Rhizoctonia solani* AG-4. **Summa Phytopathology**, Botucatu.,v.33, p.142-146, 2007.

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

RAMOS, C. I.; BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; ÁVILA, V. S.; COUTINHO, G. C.; DALAGNOLL, C. A. Epidemiologia das helmintoses gastrintestinais de ovinos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1889-1895. 2004.

RIBEIRO, R. R. **Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos**. Viçosa: UFV, 2003. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, P.J. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infecting the gastro-intestinal tract of cattle. **Australian Journal Agriculture Research**, v.1, p.99-102, 1950.

ROCHA, R. A.; BRESCIANI, K. D. S.; BARROS, T. F. M.; FERNANDES, L. H.; SILVA, M. B.; AMARANTE, A. F. T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Ruminants Research**, v.75, p.135-143, 2008.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S.; DE ARAÚJO, W. L.; T., NICHOLAS J.; THORNTON, C. R. RNA interference of endochitinases in the sugarcane endophyte *Trichoderma virens* 223 reduces its fitness as a biocontrol agent of pineapple disease. **Plos One**, v.7, p.47-50, 2012.

ROUBAUD E. & DESCAZEUX J. Action des Hyphomycetes prédateurs sur les larves de Synthétocauls et de Bunostomes. **Bulletin De la Société de Pathologie Exotique**, v.34 p.127-130, 1941.

RUAS, J. L. & BERNE, M.E.A. **Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos e ovinos**, p.584-604. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Eqüídeos. Vol.1. Equali, Campo Grande, MS. 722p, 2007.

SAGÜÉS, M. F.; PURSLOWC, P.; FERNÁNDEZ, S.; FUSÉA, L.; IGLESIAS, L.; SAMUELL, C. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrintestinales en el ganado y sus formas de administración. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 28, p. 143-147, 2011.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology* (Baarn: Centralbureau voor Schimmelcultures), v.6: p.58, 1974.

SANCHO, F. V. **Atlas de parasitologia ovina**. Zaragoza: Grupo Asís Biomedica, 2009.

SANGSTER, N. C. Pharmacology of anthelmintic resistance. **Parasitology**, v.113, p. 201-216, 1996.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.89-109. 2001.

SANTIN, R. C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris***. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em. Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 91pp. (thesis in portuguese), 2008.

SANTOS, P. R.; BAPTISTA, A. A.S.; LEAL, L. S.; MOLETTA, J. L.; ROCHA, R. A. Nematódeos gastrintestinais de bovinos – revisão. **Revista Científica de medicina Veterinária**, n.24, Ano XXIV, 2015 – Periódico Semestral.

SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R. A.; SILVA, A. S.; FANFA, V. R.; FARRET, M. H.; RAGAGNIN, L.; HECKTHEUER, P. A.; MONTEIRO, S. G. A suitable model for the utilization of *Duddingtonia flagrans* fungus in small-flock-size sheep farms. **Experimental Parasitology**, v.127, p. 727-731, 2011.

SARGISON, N. *Sheep flock health: a planned approach*. Oxford: **Blackwell Publishing**, 2008.

SAS Insititute. 2012. SAS 9.4 for Windows. . SAS Institue Inc., Cary, NC, USA.

SAUMELL, C. A.; PADILHA, T. Influence of weather and time of deposition on sheep faeces colonization by nematophagous fungi in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. **Applied Soil Ecology** , v.14, p.63-70, 2000.

SILVA, A. S.; SCHAFE, A. S.; AIRES, A. R.; TONIN, A. A.; PIMENTEL, V. C.; OLIVEIRA, C. B.; ZANINI, D.; SCHETINGER, M. R. C.; LOPES, S. T. A.; LEAL, M. L. R. E-ADA activity in erythrocytes of lambs experimentally infected with

Haemonchus contortus and its possible functional correlations with anemia. **Research in Veterinary Science**, v.1, p.1026-1030, 2013.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; YADAV, S.; NAIK, S. N.. Role of Karanja deoiled cake based medium in production of protease and fatty acids by *Paecilomyces lilacinus* 6029. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.118, p. 270-271, 2014.

SHARON, E.; CHET, I.; VITERBO, A.; BAR-EYAL, M.; NAGAN, H.; SAMUELS, G.J.; SPIEGEL, Y. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European Journal of Plant Pathology**, v.118, p.247–258, 2007.

SILVA, L. Fitoterápicos no Controle de Endoparasitoses de Caprinos e Ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, n.2, p.37–43, 2007.

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

SOARES, F. E. F.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; LIMA, W. S.; LANUSE, R. M.; QUEIROZ, J. H. Q. *In vitro* from of a serine protease *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. **Parasitology Research**, v.110, p.2423-2427, 2012.

SOSA-GOMEZ, D.R. Fungos entomopatogênicos: catálogo de isolados. Londrina: **Embrapa Soja**, 2002. V.1, p.1-32. (Série Documentos).

SOTOMAIOR, C. S.; ROSALINSKI-MORAES, F.; SOUZA, F. P.; MILCZEWSKI, V.; PASQUALIN, C. A. Parasitoses Gastrintestinais dos Ovinos e Caprinos – Alternativas de Controle. Curitiba: Instituto **EMATER**, 36 p. 2009. (Série Informação Técnica, 80).

SOUZA, M. F. **Recuperação de larvas infectantes, carga parasitária e desempenho de cordeiros terminados em pastagens com distintos hábitos de crescimento**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I. HERRERA-ESTRELLA, AA.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, v.91, p.687-693, 2001.

SRIVASTAVA, M.; SHAHID, M.; PANDEY, S.; SINGH, A.; KUMAR, V.; GUPTA, S.; MAURYA, M. Trichoderma Genome to Genomics: A Review. **Data Mining Genomics Proteomics**, v.5, p.162. 2014.

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

SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends Parasitology**, n.27, p.176–181, 2011.

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

TAYLOR, M. A. Veterinary Parasitology, 3ed: Blackwell Publishing, 2007, 874p.
UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para o diagnóstico das helmintoses de ruminantes**. [S.l.]: JICA, 1998. p 143.

TORRES-ACOSTA, J.F. J.; SANDOVAL-CASTRO, C. A.; HOSTE, H.; AGUILAR CABALLERO; CÁMARA-SARMIENTO, R. & ALONSO-DIAZ, M.A. Nutritional manipulation of sheep and goats for the controlo f gastrointestinal nematodes under hot humid and subhumid tropical conditions. **Small Rum Research**, 103:28-40, 2012.

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

VAN WYK, J. A.; CABARET, J.; MICHAEL, L. M. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.119, p. 277-306, 2004.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo. **Revista Ovinos**, ano 4, n.12, 2008.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoidesgastrintestinais em caprinos e ovinos. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, n.1, p.49-56, 2008.

VIEIRA, T. M. Extratos de fungos na inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* provenientes de ovinos / Thallyta Maria Vieira. Montes Claros, MG: **Instituto de Ciências Agrárias/UFMG**, 2013.

VIEIRA, T. M.; FRANÇA, D. E. G.; CÂNDIDO, R. C. S.; BASTOS, G. A.; FERREIRA, A. V. P.; REIS, I. M. F.; VASCONCELOS, V. O.; DUARTE, E. R. Filtrado de *Pecilonyces* sp: na inibição da eclodibilidade de *Haemonchus contortus* provenientes de borregos. **XXI Congresso Brasileiro de Zootecnia**. Vitória, ES, 2014.

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

WALLER, P.J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematodes parasites of sheep in Southern Latin America: General over view. **Veterinary Parasitology** , v.62, p.181-187, 1996.

WALLER, P. J.; BERNES, G; THAMSBORG, S. M.; SUKURA, A.; RICHTER, S. H.; INGEBRIGTSEN, K.; HÖGLUND, J. Plants as de-worming agents of livestock in the nordic countries: historical perspective, popular beliefs and prospects for the future. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.42, n.1, p.31-44, 2001.

WALLER, J.; CHANDRAWATHANI, P. *Haemonchus contortus*: Parasite problem Nº1 from Tropics – Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. **Tropical Biomedicine**, Kuala Lumpur, v.22, n.2, p.131-137, 2005.

WALLER, P. J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science and Technology**, 2005 (no prelo).

WALLER, P. J.; LJUNGSTRÖM, B. L.; SCHWAN, O.; RUDBY MARTIN, L.; MORRISON, D. A.; RYDZIK, A. Biological Control of Sheep Parasites using *Duddingtonia flagrans*: Trials on Commercial Farms in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica** , v.47, p.23-32, 2006.

WINDHAM, G.L.; WINDHAM, M.T.; WILLIAMS, W.P. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. **Plant Disease**, v.73, p.493-495, 1989.

YANG, J.; TIAN, B.; LIANG, L.; ZHANG, K. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.21-31, 2007.