

## Extrato Etanólico e Filtrado do Cultivo de *Aspergillus terreus* na Eclobilidade e Desenvolvimento de Nematódeos Gastrointestinais de Ovinos e Bovinos

### Ethanol Extract and Filtrate from the Cultivation of *Aspergillus terreus* on Hatchability and Development of Gastrointestinal Nematodes in Sheep and Cattle

Thallyta Maria Vieira<sup>ab</sup>; Leydiana Duarte Fonseca<sup>bc</sup>; Marcelo Dourado de Lima<sup>b</sup>; Valdo Soares Martins Júnior<sup>b</sup>; Renata Cristina de Souza Cândido<sup>b</sup>; Neide Judith Faria de Oliveira<sup>b</sup>; Eduardo Robson Duarte<sup>\*b</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual de Montes Claros. MG, Brasil.

<sup>b</sup>Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. MG, Brasil.

<sup>c</sup>Universidade Virtual do Estado de São Paulo. SP, Brasil.

\*E-mail: [duartevet@hotmail.com](mailto:duartevet@hotmail.com)

#### Resumo

Objetivou-se avaliar a eficácia *in vitro* do filtrado e extrato etanólico de isolados de *Aspergillus terreus*, na inibição da eclobilidade (IE) e do desenvolvimento larval (IDL) de *Haemonchus contortus*. Para a avaliação da IE, após 72 horas de incubação com filtrado (1, 2, 3,01 e 4,02 mg/ml), e extrato etanólico (17,31, 34,62, 51,93 e 69,25 mg/ml), foram quantificados ovos não embrionados, larvados e larvas infectantes de primeiro estágio (L1). Utilizou-se água destilada estéril como controle negativo e 15 mg/ml de fosfato de levamisol como controle positivo. Para a IDL foi utilizado o método adaptado de coprocultura quantitativa. Após sete dias de incubação das fezes com diferentes concentrações dos filtrados dos fungos, as larvas infectantes foram coletadas e quantificadas, obtendo-se o número de larvas desenvolvidas por grama de fezes (LDGP). Foram utilizados como controles 15 mg/ml de ivermectina ou água destilada. Na IE, o extrato etanólico de *Aspergillus terreus*, na concentração de 69,25 mg/ml, apresentou eficácia de 100%. Quanto ao IDL, concentrações iguais ou superiores a 34,62 mg/ml apresentaram resultados semelhantes ao controle positivo (levamisol). Em bovinos, o extrato etanólico apresentou eficiência de 100% em todos os níveis testados sobre diversos gêneros de parasitas gastrointestinais. Conclui-se que os filtrados e extratos etanólicos dos fungos avaliados neste trabalho apresentam potencial para o controle alternativo de parasitos intestinais.

**Palavras-chave:** *Aspergillus terreus*. Controle Alternativo. Ovinocultura. Bovinocultura.

#### Abstract

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* efficacy of the filtrate and ethanol extract of *Aspergillus terreus* isolates in inhibiting the hatchability (IE) and larval development (IDL) of *Haemonchus contortus*. For the evaluation of IE, after 72 hours of incubation with filtrate (1, 2, 3.01 and 4.02 mg/ml) and ethanol extract (17.31, 34.62, 51.93 and 69.25 mg/ml), non-embryonic eggs, larvae and infective first stage larvae (L1) were quantified. Sterile distilled water was used as a negative control and 15 mg/ml of levamisole phosphate as a positive control. For IDL, the adapted method of quantitative stool culture was used. After seven days of incubation of feces with different concentrations of fungal filtrates, the infecting larvae were collected and quantified, obtaining the number of larvae developed per gram of feces (LDGP). 15 mg/ml of ivermectin or distilled water were used as controls. In IE, the ethanol extract of *Aspergillus terreus*, at a concentration of 69.25 mg/ml, showed 100% efficacy. As for the IDL, concentrations equal to or greater than 34.62 mg/ml presented results similar to the positive control (levamisol). In cattle, the ethanol extract showed 100% efficiency at all levels tested on different genera of gastrointestinal parasites. It is concluded that the ethanol filtrates and extracts of the fungi evaluated in this paper have potential for the alternative control of intestinal parasites.

**Keywords:** *Aspergillus terreus*. Alternative Control. Sheep Farming. Cattle Farming.

#### 1 Introdução

A criação de ovinos e bovinos é amplamente praticada nos países tropicais e contribui para a produção sustentável de carne, de leite e de peles (OLIVEIRA *et al.*, 2021). A grande extensão territorial e clima favorável têm contribuído para o Brasil apresentar crescente elevação da produção de ovinos (ROBERTO *et al.*, 2018). A bovinocultura brasileira, por sua vez, ocupa posição de destaque no agronegócio mundial, possuindo rebanho de aproximadamente 1 bilhão de cabeças, contribuindo para crescimento significativo nos últimos anos, destacando-se a produção e venda de carne e leite (USDA, 2021).

Entretanto, ainda que tenham apresentado crescimento

eminente, ambas as criações têm apresentado problemas sanitários relacionados às parasitoses ocasionadas por nematódeos gastrointestinais (CHARLIER *et al.*, 2020). As helmintoses gastrointestinais estão associadas à redução no desenvolvimento e desempenho dos animais, sendo o *Haemonchus* spp. o nematódeo com maior relevância, em virtude da elevada prevalência em regiões tropicais e subtropicais e patogenia das infecções (MENDES *et al.*, 2020; PINILLA *et al.*, 2018). Desse modo, é indispensável a elaboração e aplicabilidade de métodos estratégicos de controle, visando reduzir os impactos desses helmintos (SZWEC *et al.*, 2021).

Altas taxas de infestação por *Haemonchus* spp. ocasionam perdas econômicas em criações de ovinos e bovinos, visto

que animais acometidos apresentam perda de apetite, redução no ganho de peso, e como consequência quadros severos de anemia, resultando em morte (STORILLO, 2016). O uso de alternativas para reduzir a prevalência de helmintos tem sido pautado em pesquisas realizadas em diferentes Continentes (BAPTISTA *et al.*, 2020). Nesse sentido, destaca-se a utilização de fungos oriundos do sulco ruminal, visto que possuem ações anti-helmínticas, e como consequência poderiam reduzir infecções desses parasitos (VIEIRA *et al.*, 2016).

A utilização de fungos do gênero *Aspergillus* sp. tem sido promissora no controle de helmintos em criações de ruminantes (KHATTAK *et al.*, 2018). Esses bioagentes poderiam complementar a ação de anti-helmínticos comerciais, reduzindo a seleção de nematódeos resistentes (AVRAMENKO *et al.*, 2020; SALGADO; SANTOS, 2016). Além disso, diminuem os riscos de contaminação aos produtos de origem animal e meio ambiente (AMADUCCI *et al.*, 2016). Sendo assim, objetivou-se com o presente estudo avaliar a eficácia de filtrado e extrato etanólico de *Aspergillus* sp. sobre a inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval de *Haemonchus* sp. proveniente de ovinos e bovinos.

## 2 Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no Norte do Estado de Minas Gerais, Brasil (16°44'06" S e 43°51'43" O). Os procedimentos com os ovinos foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG) e aprovado por este Comitê sob o protocolo 042/2008.

### 2.1 Obtenção e identificação molecular do isolado fúngico

O fungo *Aspergillus terreus* foi isolado, da ampola retal de ovino adulto e criado em pastagens tropicais (FREITAS, 2012) e sequenciado de acordo com a metodologia proposta por Rosa *et al.* (2009). A extração do DNA total dos microorganismos foi realizada de acordo com Rosa *et al.* (2009). O isolado fúngico foi crescido durante sete dias em ágar Sabouraud e a extração do DNA foi realizada segundo metodologia descrita por Rosa *et al.* (2009). O material genético obtido foi submetido à reação de cadeia polimerase, sendo os indicadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) utilizados para amplificar a região ITS do rDNA, conforme descrito por White *et al.* (1990).

O produto foi quantificado em NanoDrop 1000ND (NanoDrop Technologies) e ajustado para 100 ng ul-1 para ser utilizado em reações de sequenciamento. As sequências encontradas foram analisadas pelo BLASTn v. 2.215 de BLAST 2.0 disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Foi considerada a similaridade de  $\geq 99\%$  para isolado do fungo da mesma espécie. As sequências dos nucleotídeos foram

depositadas no GenBank, com números de acesso: MT355642 (*Aspergillus terreus*, isolate O45M1). Posteriormente, o fungo foi conservado em método descrito por Castellani (1967).

### 2.2 Preparo do filtrado e extrato fúngico

Para a obtenção do extrato etanólico dos isolados, foram preparados cinco discos de aproximadamente 5 mm de diâmetro das culturas fúngicas, cultivadas previamente em placas contendo Agar Sabouraud sólido (Ágar Sabouraud Dextrosado, Prodimol Biotecnologia, MG, Brasil), e foram transferidos para Erlenmeyers, contendo Sabouraud líquido, sem extrato de leveduras. Posteriormente, foram incubados em *thermo shaker* a 30° C e 150 rpm, durante sete dias. Os cultivos foram filtrados duas vezes em papel *Whatman* nº 1 e em membrana milipore de 0,22 µm de abertura, utilizando bomba a vácuo. O líquido obtido de cada cultura, denominado filtrado fúngico, foi utilizado imediatamente para os testes parasitológicos. Para obtenção do filtrado a massa fúngica foi congelada a -4 °C.

Adicionou-se 100 ml de álcool etílico P.A. (99,5° GL.) para cada 50 gramas de massa fúngica triturada. A mistura foi homogeneizada e transferida para um béquer vedado com papel filme, incubado em banho-maria a 40 °C por 90 minutos. Posteriormente, foram promovidas duas filtrações a quente em papel *Whatman* nº1. Decorrido o tempo de extração, o volume total dos extratos obtidos foi transferido para placas de Petri, desidratado em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C  $\pm$  5 por três dias e armazenado em freezer a -4 °C.

Determinou-se a matéria seca (MS) de subamostras dos filtrados e dos extratos etanólico a 105 °C conforme *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990), para cálculo das concentrações testadas (CUNNIF, 2000).

### 2.3 Coleta de fezes e exames parasitológicos

Foram utilizados três ovinos machos, castrados e criados em baias com mono infecção de *Haemonchus contortus* e com valores superiores a 1500 ovos por grama de fezes (OPG). Foram também coletadas amostras de fezes diretamente da ampola retal de três bezerros mestiços (Nelores x Holandês) com aproximadamente sete meses e, naturalmente, infectados por nematódeos gastrointestinais. Um pool das amostras fecais foi utilizado para os testes, com OPG médio de 1250.

As contaminações desses animais foram quantificadas com base na metodologia proposta por Ueno e Gonçalves (1998), utilizando dois gramas de fezes coletadas diretamente da ampola retal dos ovinos e bovinos. Promoveu-se flutuação dos ovos com adição de solução hipersaturada de cloreto de sódio (NaCl). A quantificação foi realizada em câmara de *McMaster* com auxílio de microscópio óptico em objetiva de 10x. Para a recuperação das larvas infectantes, foi utilizada a técnica de coprocultura, segundo Ueno e Gonçalves (1998) e as larvas infectantes foram identificadas, segundo chave de

Keith (1953).

#### 2.4 Eficácia do extrato etanólico inibição da eclodibilidade

Para verificar a eficácia dos fungos sobre a eclodibilidade das larvas, utilizou-se filtrado e extrato etanólico de fungos nas concentrações finais em matéria seca/ml descritas no Quadro 1. Para o controle positivo foram utilizados 15 mg/ml de fosfato de levamisol (Protall VP®, Vallée, Minas Gerais, Brasil) e água destilada estéril como controle negativo. Foram realizadas quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado.

**Quadro 1** - Concentração (mg/ml) do filtrado e extrato etanólico do fungo *Aspergillus terreus* na inibição da eclodibilidade

Filtrado do Cultivo	Extrato Etanólico
1,00	17,31
2,00	34,62
3,01	51,93
4,02	69,25

Fonte: dados da pesquisa.

Os ovos do nematódeo foram recuperados, conforme Bizimnyera *et al.* (2006). Maceraram-se aproximadamente 100 gramas de fezes, seguindo-se homogeneização, lavagem e filtrações em tamises com malhas de 106, 53 e 20 mm. Os ovos retidos no tamis de 20 mm foram coletados e centrifugados a 2.000 rpm durante seis minutos. O sobrenadante foi descartado, os ovos foram ressuspensos com solução salina hipersaturada e centrifugou-se a 2.000 rpm por seis minutos. O sobrenadante foi lavado com água destilada estéril em tamis de 20 mm, até a retirada da solução salina. A concentração de ovos foi estimada com a contagem em microscópio óptico de três sub- alíquotas de 50 µl da solução. Padronizou-se a concentração de 100 ovos em 100 µl de água destilada estéril.

No teste de inibição da eclodibilidade foi utilizada a metodologia adaptada de Coles *et al.* (1992). Em placas de microtitulação do tipo ELISA com 96 poços, foram adicionados 100 µl de solução com aproximadamente 100 ovos e incorporou-se volume igual das soluções dos filtrados e extratos etanólicos, bem como os controles positivo (fosfato de levamisol) ou negativo (água estéril e ágar Sabouraud). As amostras foram homogeneizadas e cobertas com filme plástico com orifícios para aeração.

Os cultivos foram mantidos em estufa BOD a 28 °C por 72 horas. Após esse período, acrescentou-se 100 µl de formol a 10% (v/v) com a finalidade de inibir o desenvolvimento das larvas e o crescimento de fungos. Os materiais foram armazenados sob refrigeração a ± 4 °C para posterior quantificação e diferenciação de ovos não embrionados, ovos larvados e larvas de primeiro estágio (L1). Para a leitura em microscópio óptico, com objetiva de 10x, utilizou-se câmara de Sedgewick.

As contagens foram transformadas em valores relativos referentes ao número inicial de ovos. Os resultados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados nos testes de *Duncan* e *Tukey* ( $p \leq 0,05$ ), no pacote estatístico SAEG 9.1 (2007). A fórmula adaptada de Coles *et al.* (1992) foi empregada para determinar a eficácia de redução da eclodibilidade: %Eficácia =  $100 \times (1 - \text{larvas L1} / \text{número inicial de ovos})$ .

#### 2.5 Eficácia do filtrado sobre a inibição do desenvolvimento larval

O teste de inibição do desenvolvimento larval foi realizado, segundo Nery *et al.* (2010) adaptado de Borges (2003). O filtrado de *Aspergillus terreus* foi utilizado nas concentrações finais 0,33 a 1,34 mg/ml. Como controle positivo foram usadas 16 µg/ml de ivermectina (Ranger LA®, Vallée, MG, Brasil) e água destilada estéril como controle negativo.

Foram realizados dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Fezes frescas coletadas diretamente da ampola retal dos ovinos e bezerras foram transportadas, imediatamente, em caixas isotérmicas ao laboratório de Parasitologia Animal do ICA/UFMG. As amostras das fezes dos três animais, de cada espécie de ruminante, foram homogeneizadas e dois gramas foram distribuídos aleatoriamente em copos plásticos livres de contaminação parasitária.

Posteriormente, 2 ml de cada concentração do filtrado e os respectivos controles foram adicionados às fezes. Após homogeneização, os cultivos foram mantidos em temperatura ambiente por uma hora. Em todos os cultivos foram adicionados dois gramas de vermiculita industrial fragmentada para a aeração e dois ml de água destilada para a umidificação, seguindo-se a homogeneização dos materiais (NERY *et al.*, 2010). Cada recipiente foi coberto com plástico filme, com pequenos orifícios para aeração dos cultivos e armazenado em cubas plásticas revestidas com toalha de papel umedecida diariamente. Os materiais foram incubados em estufa BOD, a 28 °C durante sete dias.

Após esse período, removeu-se o papel filme e adicionou-se água destilada estéril até a borda do copo. Após a homogeneização, cada cultivo foi coberto com a tampa de placa de *Petri* estéril e, depois de 60 minutos, esse cultivo foi virado bruscamente. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 20 ml de água destilada à placa para permitir a migração das larvas infectantes para fora do copo. Após duas horas, essas foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaio, contendo 1 ml de formol 10% (v/v) sob refrigeração a 4 °C, para preservação até a contagem.

O número de larvas desenvolvidas por grama de fezes (LDGP) foi quantificado em câmara de Sedgewick, no microscópio óptico com a objetiva de 10x. A porcentagem de eficácia na inibição do desenvolvimento larval foi calculada conforme a fórmula adaptada de Borges (2003): %Eficácia =  $100 - [(\text{LDGP do grupo tratado} / \text{LDGP do grupo controle negativo}) \times 100]$ .

Os valores de LDGP foram transformados em  $\text{Log}_{10}(x +$

10) e submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelos testes de *Duncan* e *Tukey* com 5% de significância, utilizando-se o pacote estatístico SAEG 9.1 (2007). Para estimar as concentrações letais (CL) capazes de inibir 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>) do desenvolvimento larval do nematódeo, empregou-se a análise de regressão *probit*, nesse mesmo programa estatístico.

### 3 Resultados e Discussão

Para o nematódeo *H. contortus* de ovinos, constatou-se que o filtrado do cultivo do fungo promoveu redução na média de larvas L1 eclodidas para todas as concentrações avaliadas. Especificamente, na concentração 4,02 mg/ml, observou-se eficácia de 88,15%, (Quadro 2). Para o extrato etanólico desse fungo, concentrações iguais ou superiores a 34,62 mg/ml, promoveram eficácias superiores a 80,49%, (Quadro 3).

**Quadro 2** - Eficácia do filtrado de *Aspergillus terreus* sobre a eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* de ovinos

Tratamentos (mg/ml)	Ovos não Embrionados	Ovos Larvados	Larvas (L1)	Eficácia (%)
1,00	7,25	1,75	25,00 b	34,44
2,00	5,25	2,00	22,75 b	27,16
3,01	6,75	13,00	32,75 b	42,86
4,02	5,25	19,25	4,00 a	88,15
Água estéril	0,25	0,00	74,75 c	-
Levamisol	28,75	43,75	0,00 a	100,00
C.V.				31,86

**Nota:** Médias seguidas pela mesma letra são similares estatisticamente pelo teste de *Duncan* a 5% ( $p \leq 0,05$ ). C.V.: Coeficiente de variação (%).

**Fonte:** dados da pesquisa.

**Quadro 3** - Eficácia de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Aspergillus terreus* sobre a eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus* em ovinos

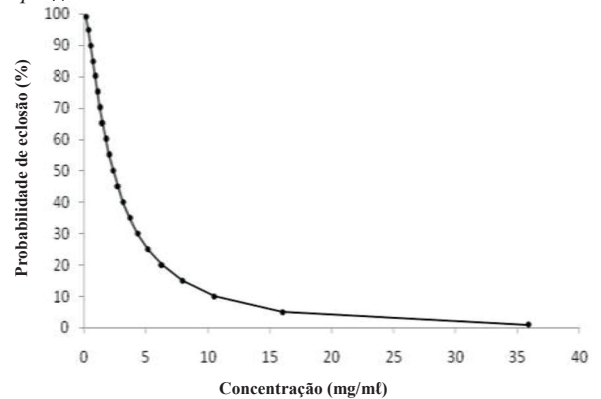
Tratamentos (mg/ml)	Ovos não Embrionados	Ovos Larvados	Larvas (L1)	Eficácia (%)
17,31	6,25	53,00	137,25 b	31,51
34,62	12,50	146,25	38,75 a	80,49
51,93	38,00	133,75	0,50 a	99,78
69,25	27,00	109,5	0,00 a	100
Água estéril	3,25	1,25	169,50 c	-
Levamisol	42,25	112,5	0,00 a	100
C.V.				38,37

**Nota:** Médias seguidas pela mesma letra são similares estatisticamente pelo teste de *Duncan* a 5% ( $p \leq 0,05$ ). C.V.: Coeficiente de variação (%).

**Fonte:** dados da pesquisa.

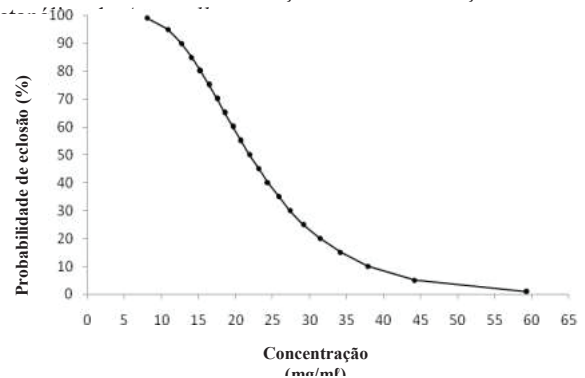
No presente estudo, verificou-se aumento da eficácia de inibição da eclodibilidade em função do aumento da concentração do filtrado e do extrato etanólico, indicando resposta dose-dependente. As CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> foram estimadas em 2,34 e 10,50 mg/ml para o filtrado, e 21,88 e 37,87 mg/ml para o extrato etanólico, respectivamente (Figuras 1 e 2).

**Figura 1** - Probabilidade de eclusão de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos em função das concentrações do filtrado de *Aspergillus terreus*



**Fonte:** dados da pesquisa.

**Figura 2** - Probabilidade de eclusão de larvas de *Haemonchus contortus* de ovinos em função das concentrações do extrato etanólico de *Aspergillus terreus*



**Fonte:** dados da pesquisa.

Em estudo realizado por Vieira *et al.* (2016), avaliou-se a eficácia *in vitro* de extratos aquosos e etanólicos de *Paecilomyces lilacinus* e *Trichoderma longibrachiatum* isolados do trato digestório de ovinos sobre a incubação de ovos e desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus*. Neste estudo, constatou-se que o extrato aquoso de *P. lilacinus* (1,96 mg/ml) e o extrato etanólico de (1,90 mg/ml) inibiram completamente os ovos. Adicionalmente, o extrato aquoso de *T. longibrachiatum* na concentração de 1,90 mg/ml apresentou eficácia de 92,88% na inibição do crescimento larval.

Em outra pesquisa, avaliou-se o potencial inibitório do fungo *A. niger* isolado de fezes de ovinos sobre a inibição de eclodibilidade em ovos, morte larval e morte em adultos de nematodeos da espécie *H. contortus* (KHATTAK *et al.*, 2018). Os resultados obtidos corroboram com aqueles do presente estudo, visto que o filtrado do cultivo de *A. niger* também promoveu inibição significativa sobre a eclusão de ovos não embrionados, mortalidade efetiva sobre as larvas (100%), entretanto, não houve eficácia para mortalidade em adultos do parasita (KHATTAK *et al.*, 2018).

Para nematódeos de bovinos, o filtrado de *A. terreus*, quando testado sobre a eclodibilidade dos ovos, inibiu completamente a eclusão (Quadro 4). As concentrações

17,31 e 34,62 mg/ml possibilitaram o desenvolvimento dos ovos até a fase de ovos larvados, entretanto, não permitindo o completo desenvolvimento dos embriões (Quadro 4). Nas amostras obtidas dos bezerros avaliados foi constatada infecção mista por nematódeos gastrointestinais, sendo que os gêneros identificados foram *Trichostrongylus* (37,75%), *Cooperia* (28,57%), *Haemonchus* (24,50%), *Bunostomum* (6,12%) e *Oesophagostomum* (3,06%). Esses resultados indicam o potencial do filtrado do fungo em inibir a eclodibilidade de diferentes nematódeos contribuindo para o controle de infecções mistas nos rebanhos.

**Quadro 4** - Eficácia de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Aspergillus terreus* sobre a eclodibilidade de nematódeos gastrointestinais de bovinos

Tratamentos (mg/ml)	Ovos não embrionados	Ovos Larvados	Larvas (L1)	Eficácia (%)
17,31	31,04b	0,98d	0a	100
34,62	71,24d	0,56b	0a	100
51,83	100,00e	0a	0a	100
69,25	100,00e	0a	0a	100
Levamisol	54,49c	0,74c	0a	100
Água estéril	2,80 <sup>a</sup>	0a	97,19c	
C.V.				64,40

Nota: Médias seguidas pela mesma letra são similares estatisticamente pelo teste de Duncan a 5% ( $p \leq 0,05$ ). C.V.: Coeficiente de variação (%).

Fonte: dados da pesquisa.

O efeito da suplementação do fungo *Duddingtonia fragrans* sobre o controle de nematoides gastrointestinais de bovinos mestiços Holandês x Zebu criados em pastagens de *Brachiaria decumbens* durante os meses de março a setembro. Nesse estudo, verificou-se que animais suplementados com *D. fragrans* apresentaram contagem média mensal de ovos por grama de fezes (OPG) 31% menor quando comparado ao grupo controle. As pastagens ocupadas pelo grupo tratado apresentaram menor contagem de larvas infectantes de nematoides, demonstrando potencial deste fungo no controle dos estágios de vida livre deste parasita (DIAS *et al.*, 2007). Resultados similares foram reportados por Campos *et al.*, (2007), que ao avaliarem a utilização de pellets contendo inóculo de *Monacrosporium sinense* em situação similar ao estudo anterior, propiciaram observar redução de 21% na média final do OPG dos animais tratados, quando comparados ao grupo controle.

O uso de fungos nematófagos em associação tem apresentado eficácia significativa para o controle de parasitas gastrointestinais em bovinos. Em pesquisa realizada por Oliveira *et al.* (2021), foi avaliada a atividade nematicida conjunta dos isolados dos fungos *Monacrosporium sinense* e *Pochonia chlamydsoporia* sobre larvas infectantes de parasitas bovinos (*Haemonchus* sp., *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp). Ao término do estudo, observou-se que a ação sinérgica dos fungos apresenta eficácia (98,90%) para o controle biológico de larvas infectantes dos parasitas estudados.

Fungos do gênero *Aspergillus* produzem diferentes metabólitos bioativos (TAKAHASHI, 2008), o que os torna bem-sucedidos quanto ao controle de nematódeos parasitas (NORDBRING-HERTZ *et al.*, 2011). De acordo com Zuckerman *et al.* (1994), o filtrado de isolado de *Aspergillus niger*, contendo ácido cítrico, ácido oxálico e moléculas indeterminadas maiores que 800MW como componentes nematicidas, apresentou eficácia na redução de populações do fitonematódeo *Rotylenchulus renjbrmis*, em estufa.

Determinadas espécies de fungos apresentam potencial inibitório frente a nematoides e efeito ovicida através da metabolização de toxinas (SOARES *et al.*, 2018). A ação de fungos nematófagos ocorre após o contato desses com a cutícula do nematoide ou casca do ovo, ocorrendo penetração seguida de digestão do conteúdo, resultando em formação de nova biomassa fúngica dentro e, posteriormente, fora do nematóide. As enzimas envolvidas neste processo são proteases e quitinases (BRAGA *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2014).

Proteases e quitinases diferentes foram identificadas a partir de fungos nematófagos (YANG *et al.*, 2013). Enzimas como lipases, proteases,  $\alpha$ -amilases, hidrolases, quitinases, exoglucanases e endoglucanases do tipo  $\beta$ -glucanases ( $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6) e celulasas ( $\beta$ -1,4- d-glucosidas) foram encontradas em extratos de fungos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* (BENNETT, 1998; JIANG; AN, 2000; MEYER, 2008; DE MARCO *et al.*, 2000).

Outro exemplo de composto sintetizado por fungos nematófagos são as lectinas. Estas por sua vez são proteínas que se unem com as moléculas de carboidratos e estão envolvidas nos processos intra e extracelulares de plantas e fungos. O estudo sobre o efeito de lectinas obtidas a partir do desenvolvimento dos fungos *Coprinopsis cinerea* (CGL2), lectina de *Aleuria aurantia* (AAL), Aglutinina de *Marasmius oreades* (MOA), e *Laccaria bicolor* (Lb-Tec2), sobre os estágios larvais de *Haemonchus contortus* isolados de ovinos foi avaliado. Ao término da pesquisa, os autores observaram que as lectinas CGL2, AAL e MOA através da capacidade ligante aos glicanos presentes no intestino dos parasitas, apresentaram maior eficácia no efeito inibitório do desenvolvimento larval (HEIM *et al.*, 2015).

Nas coproculturas quantitativas de fezes de bovinos, o filtrado de *Aspergillus terreus* promoveu redução da média de larvas infectantes para todas as concentrações avaliadas ( $p < 0,05$ ), com eficácias iguais ou superiores a 60,63%, demonstrando atividade sobre ovos e larvas do nematódeo, mesmo em material fecal (Quadro 5).

**Quadro 5** - Eficácia do filtrado de *Aspergillus terreus* sobre o desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* de ovinos em coproculturas quantitativas

Tratamentos (mg/g de coprocultura)	LDGP	Eficácia (%)
0,33	39,00 b	60,63
0,67	32,00 b	67,40
1,00	27,00 b	73,07
1,34	26,00 b	74,00
Ivermectina	0,00 a	100
Água estéril	99,00 c	-
C.V.		655,

**Nota:** Médias seguidas pela mesma letra são similares estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% ( $p \leq 0,05$ ). LDGP: Larvas desenvolvidas por grama de fezes. C.V.: Coeficiente de variação (%).

**Fonte:** dados da pesquisa.

Espécies de *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans* apresentaram eficácia contra nematódeos juvenis de *Meloidogyne javanica*. Entretanto, a atividade nematicida foi aumentada quando filtrados de *A. niger* foram aplicados em conjunto com inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* (SIDDIQUI *et al.*, 2004).

Por outro lado, a utilização de extrato hidroalcolólico de cogumelos comestíveis dos gêneros *Pleurotus ostreatus* 0152, *Pleurotus cornucopiae* 1330, *Pleurotus ostreatus* 1123, *Pleurotes eryngii* 1992 e *Lentinula edodes* 401 apresentaram eficácia para mortalidade de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. Neste estudo, os gêneros fúngicos avaliados apresentaram, respectivamente, as seguintes taxas de inibição para mortalidade 88, 88,5, 91, 93 e 93,93%, ( $p < 0,05$ ) (JOSÉ COMANOS-PÉREZ *et al.*, 2021). Tais resultados são obtidos em função da ação nematicida desta família fúngica, que produz toxinas que imobilizam e retardam o desenvolvimento de nematóides antes da infecção e digestão, além de alterarem a permeabilidade da membrana celular (SATOU *et al.*, 2008; ROSADO *et al.*, 2003).

#### 4 Conclusão

O filtrado e extrato etanólico de *A. terreus* reduzem, significativamente, a eclodibilidade de ovos e promovem inibição do desenvolvimento larval *H. contortus* de ovinos. O extrato etanólico é também efetivo para inibir a eclosão de larvas de diferentes gêneros de helmintos gastrointestinais de bovinos. Os metabolitos desse fungo apresentam potencial alternativo para o controle integrado de nematódeos de ruminantes

#### Agradecimentos

Agradecimentos ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil. Os autores também agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil fundo 0001), Banco do Nordeste e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Graduação da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### Referências

- ALTSCHUL, S.F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acid. Res.*, v.25, n.17, p.3389-3402, 1997. doi: 10.1093/nar/25.17.3389.
- AMADUCCI, A.G. *et al.* Parâmetros sanguíneos e OPG (ovos por grama de fezes) de ovelhas mestiças da raça Dorper em diferentes graus do método Famacha. *Arq. Bras. Cienc. Vet. Zootec. Zool. UNIPAR.*, v.19, n.4, p.1-5, 2016. doi: 10.25110/arqvet.v19i4.2016.6100.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Washington: AOAC, 1990.
- AVRAMENKO, R.W. *et al.* Assessing anthelmintic resistance risk in the post-genomic era: a proof-of-concept study assessing the potential for widespread benzimidazole-resistant gastrointestinal nematodes in North American cattle and bison. *Parasitol.*, v.147, n.8, p.897-906, 2020. doi.org/10.1017/S0031182020000426.
- BAPTISTA, C.T. *et al.* *Purpureocillium lilacinum* and *Trichoderma virens* for biological control of trichostrongylid parasites of sheep: in vitro evaluation. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.29, n.4, p.1-5, 2020. doi: 10.1590/S1984-29612020085.
- BENNETT J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotechnol.*, v.66, n.2-3, p.101-107, 1998. doi:10.1016/S0168-1656(98)00133-3.
- BIZIMENYERA, E.S. *et al.* *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.*, v.142, n.1, p.336-343, 2006. doi:10.1016/j.vetpar.2006.06.013.
- BORGES, C.C.L. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de Nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). *Parasitol. Latinoam.*, v.58, n.3/4, p.142-147, 2003. doi:10.4067/S0717-77122003000300010.
- BRAGA, F.R. *et al.* Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Vet. Parasitol.*, v.212, n.3/4, p.214-218, 2015. doi:10.1016/j.vetpar.2015.08.018.
- CAMPOS, A.K. *et al.* Viabilidade de alimentação peletizada do fungo nematófago *Monacrosporium sinense*, sem controle biológico de nematóides parasitos gastrintestinais de bezerras. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, n.1, p.14-20, 2007. doi:10.1590/S0102-09352007000100003.
- CASTELLANI, A.A. Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. Trop. Medic. Hyg.*, v.70, n.1, p.181-184, 1967.
- CHARLIER, J. *et al.* Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev. Vet. Med.*, v.182, n.8, p.1-12, 2020. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105103.
- COLES, G.C. *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) – methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*, v.44, n.1/2, p.35-44, 1992. doi:10.1016/0304-4017(92)90141-U.
- CUNNIFF, P. Official methods of analysis of AOAC international. Washington: AOAC, 2000.
- DE MARCO, J.L. *et al.* *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.16, n.4, p.383-386, 2000.

doi:10.1023/A:1008964324425.

DIAS, A.S. *et al.* Aplicação de uma formulação do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controle da nematodíose gastrointestinal em bovinos. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v.23, n.9, p.1-8, 2007. doi:10.1007/s11274-007-9356-0.

FREITAS, C.E.S. *et al.* Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.1, p.225-227, 2012. doi:10.1590/S0102-09352012000100033.

HEIM, C. *et al.* Inibição do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* por lectinas fúngicas. *Parasi. Vect.*, v.8, n.1, p.1-10, 2015. doi:10.1186/s13071-015-1032-x.

JIANG, Z.D; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, v.22, p.245-272, 2000. doi:10.1016/S1572-5995(00)80027-7.

JOSÉ COMANS-PÉREZ, R. *et al.* Biological control of sheep nematode *Haemonchus contortus* using edible mushrooms. *Biologi Contr.*, v.152, n.1, p.1-8, 2020. doi:10.1016/j.bioccontrol.2020.104420.

KEITH, R.K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Aust. J. Zool.*, v.1, n.2, p.223-235, 1953. doi:10.1071/ZO9530223.

KHATTAK, B. *et al.* Biological control of *Haemonchus contortus* by fungal antagonists in small ruminants. *A. Ecol. Environm. Res.*, v.16, n.5, p.5825-5835, 2018.

MENDES, J.P. *et al.* *Haemonchus contortus* e medidas estratégicas de controle para ovinos. *Ensaio e Ciência: Ciênc. Agrár. Saúde*, v.24, n.2, p.1-6, 2020. doi:10.17921/1415-6938.2020v24n2p105-110.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi—Progress, obstacles and future trends. *Biotechnol. Adv.*, v.26, n.1, p.177-185, 2008. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.001.

NERY, P.S. *et al.* Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. *Vet. Parasitol.*, v. 171, n. 3/4, p. 361-364, 2010. doi:10.1016/j.vetpar.2010.03.043.

NORDBRING-HERTZ, B. *et al.* Nematophagous Fungi. 2011. doi: 10.1002/9780470015902.a0000374.pub3.

OLIVEIRA, A.D. *et al.* Avaliação do ciclo de vida (ACV) na ovinocultura de corte: um estudo bibliométrico. *Rev. Bras. Pesq. Agric.*, v.2, n.2, p.1-8, 2021.

OLIVEIRA, I.C. In vitro compatibility and nematicidal activity of *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* for biological control of bovine parasitic nematodes. *Parasitol.*, v.148, n.8, p.956-961, 2021. doi:10.1017/S0031182021000652.

PINILLA, J.C. *et al.* Prevalencia del parasitismo gastrointestinal en bovinos del departamento Cesar, Colombia. *Rev. de Invest. Vet. Per.*, v.29, n.1, p.278-287, 2018. doi: 10.15381/rivec.v29i1.14202.

ROBERTO, F.F.S. *et al.* Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. *Pubvet*, v.12, n.4, p.1-12, 2018.

ROSA, L.H. *et al.* A Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv (Poaceae). *Polar Biol.*, v.32, n.8, p.161-167, 2009.

ROSADO, F.R. *et al.* Biomass and exopolysaccharide

production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* “florida” (Jack.: Fr.) Kummer. *J. Bas. Microbiol.*, v.43, n.3, p.230-237, 2003. doi:10.1002/jobm.200390026.

SAEG. Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes. Viçosa: UFV, 2007.

SALGADO, J.A; SANTOS, C.P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.25, n.1, p.3-17, 2016. doi: 10.1590/S1984-29612016008.

SATOU, T. *et al.* The Toxin Produced by *Pleurotus ostreatus* Reduces the Head Size of Nematodes. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.4, p.574-576. doi:10.1248/bpb.31.574.

SIDDIQUI, I.A.; SHAUKAT, S.S.; KHAN, A. Differential impact of some Aspergillus species on *Meloidogyne javanica* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.39, n.1, p.74-83, 2004. doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01540.x.

SOARES, F.E.F. *et al.* Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. *Biocontrol Sci. Technol.*, v.25, n.3, p.337-344, 2014. doi:10.1080/09583157.2014.979133.

SOARES, F.E.F.; SUFIATE, B.L.; QUEIROZ, J. H. Nematophagous fungi: Far beyond the endoparasite, predator and ovicidal groups. *Agric. Nat. Resour.*, v.52, n.1, p.1-8, 2018. doi: 10.1016/j.anres.2018.05.010.

STORILLO, V.M. Resistência, resiliência e sensibilidade de ovinos ao *Haemonchus contortus*: comparações hematológicas e bioquímicas. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2016. doi: 10.11606/T.10.2017.tde-20032017-164340.

SZWEC, M.; DE WAAL, T.; ZINTL, A. Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. *Vet. J.*, v.268, n., p.1-8, 2021. doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105602.

TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Quím. Nova*, v.31, n.7, p.1807-1813, 2008.

UENO, H; GONÇALVES, P.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4Salvador: Japan International Cooperation Agency, p.143, 1998.

USDA - United States Department of Agriculture - Economic Research Service - Livestock & Meat Domestic Data. Disponível em: <https://www.ers.usda.gov/topics/animal-products/cattle-beef/market-outlook/>. Acesso em: 20 set. 2021.

VIEIRA, T.M. *et al.* Fungi extract in the inhibition of the egg hatching and larval development of the *Haemonchus contortus*. *Afric. J. Microbiol. Res.*, v.10, n.27, p.1044-1050, 2016. doi:10.5897/AJMR2016.8027.

WHITE, T.J. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.

YANG, J. *et al.* Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.97, n.16, p.7081-7095, 2013. doi:10.1007/s00253-013-5045-0.

ZUCKERMAN, B.M.; MATHENY, M.; ACOSTA, N. Control of plant-parasitic nematodes by a nematicidal strain of *Aspergillus niger*. *J. Chem. Ecol.*, v.20, n.1, p.33-43, 1994. doi: 10.1007/BF02065989.