

THALLYTA MARIA VIEIRA

**EXTRATOS DE FUNGOS NA INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE E DO
DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Haemonchus contortus***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

Área de concentração: Agroecologia

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte

Coorientadora: Prof.^a Neide Judith Faria de Oliveira

Montes Claros

2012

Vieira, Thallyta Maria.

V657e
2013

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.

83 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Prof. Eduardo Robson Duarte.

Banca examinadora: Vera Lúcia dos Santos, Anna Christina de Almeida, William James Nogueira Lima, Neide Judith Faria de Oliveira, Eduardo Robson Duarte.

Inclui bibliografia: f: 70-82.

1. Ovinos. 2. Helmintoses gastrintestinais. 3. Parasitologia animal - Extratos de fungos. I. Duarte, Eduardo Robson. II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 636.32

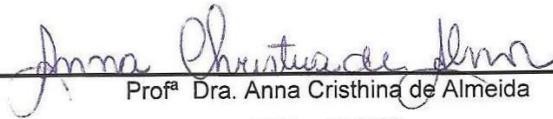
THALLYTA MARIA VIEIRA

EXTRATOS DE FUNGOS NA INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE E DO
DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Haemonchus contortus*



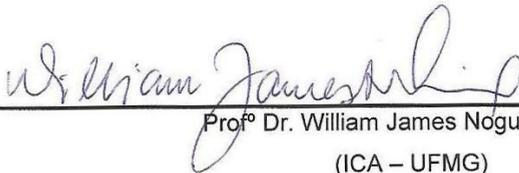
Prof^a Dra. Vera Lúcia dos Santos

(ICB – UFMG)



Prof^a Dra. Anna Cristhina de Almeida

(ICA – UFMG)



Prof^o Dr. William James Nogueira Lima

(ICA – UFMG)



Prof^a Dra. Neide Judith Faria de Oliveira

(Coorientadora - ICA-UFMG)



Prof^o Dr. Eduardo Robson Duarte

(Orientador – ICA-UFMG)

Aprovada em 21 de dezembro de 2012.

Montes Claros
2012

Dedico a minha mãe Ailde e aos meus irmãos Gustavo Henrique e Vinícius pelo amor em pleno significado!

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Deus, que sempre cuida de mim e é fiel!

Ao Professor Eduardo Robson, exemplo como profissional e como pessoa, pela paciência e incentivo na orientação, pela confiança, ensinamentos e conselhos. Serei eternamente grata por ter tido a benção de ter um orientador tão especial e que ainda conferiu prestígio e valor a meu trabalho.

A toda a minha família... agradeço com carinho, por entenderem as minhas ausências, pelo apoio, respeito e amor. Em especial a três pessoas que sempre cuidaram de mim e foram a minha base: Minha tia Anésia, e os meus amados avós Feliciano e Maria Eva (*no coração*). Amo muito vocês!

Mãe, Gustavo e Vinícius: não tenho vocês ao meu lado no dia a dia, mas tenho vocês a todo instante no coração! Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando eu não acreditava. Vocês são as minhas fortalezas e eu amo vocês incondicionalmente!

Meu amor, Thiago Neves, sou grata pelo carinho, companheirismo, amor e incentivo dispensados em todos os momentos que precisei.. Principalmente nos momentos de desespero e nas idas ao ICA aos domingos!

Messulan, Franciellen, professor Délcio e Otávio vocês foram fundamentais! Obrigada pelo incentivo, apoio, amizade e por não terem me deixado desistir. Messulan, essa vitória não é minha, é nossa, obrigada por tudo! Fran, obrigada pela força e motivação sempre!

A todos os meus companheiros de laboratório hoje amigos: Franciellen, Isabela, Viviane, Maria Alice, Gabriela, Roberta, Débora, Ludmila, Adriano, Marco Aurélio, Maria Luiza, Fernanda, Vanessa, Leonardo, Ed e Leydiana. Em especial a Renata, que tanto me ajudou, muito obrigada! Ter todos vocês por perto foi importante! Sinto que nós percorremos este caminho juntos, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade. Saibam que tenho por vocês todo carinho do mundo e toco por todos!

Viviane, não posso agradecer você pelo apoio, amizade e não falar de Mariana! Vocês se esforçaram muito. Nunca vou esquecer-me de quando

iniciamos os experimentos. Obrigada por tudo!

Minha “anja” Leidyana, companheira de todas as horas e amiga fiel, que esteve ao meu lado nos momentos cruciais do experimento e da elaboração desta dissertação. Obrigada pelo enorme aprendizado, apoio, força, ajudas, conselhos e carinho.

A todos os meus colegas do mestrado! Em especial a minhas companheiras lindas. Anne Karoene, Danielle Malveira (e Túlio), Bruna Amaral, Emanuela Ribeiro e Maria Alice pelo pensamento positivo e força nunca dispensados nos momentos difíceis. Nós conseguimos amigas!

Ao professor Fábio Ribeiro por me mostrar o caminho da ciência através do exemplo e pelo apoio. À Gisele Lopes, Everton, Vitor, Leo, Pablo, Janete e Milene pelo incentivo, amizade e motivação nos momentos difíceis.

À minha segunda família: Marlene, Elson, Larissa, Diogo agradeço pelo apoio e amor! Vocês são especiais! E foram fundamentais para essa conquista! Agradeço também aos demais familiares Neves e Silva.

A Débora, William e minha afilhada Alice pela cumplicidade e amor!

Agradeço aos irmãos do escoteiro, amigos e amigas (que tanto me cobravam atenção), pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva e também pelo incentivo e carinho de sempre! Não citarei nomes porque os agradecimentos não podem ser maiores que a dissertação.

Aos amigos da FASI e do PROJOVEM obrigada pela amizade, apoio, companheirismo e incentivo sempre. Vocês me motivaram!

Aos professores do Instituto de Ciências Agrárias (ICA), Anna Christina, Lourdes, Ernani, Igor, Frederico Mineiro e, em especial, à professora Neide, pela coorientação e os muitos ensinamentos!

À Universidade Federal de Minas Gerais e todos os funcionários do ICA. À coordenação da Pós-graduação em Ciências Agrárias, em especial à Priscila. À Capes, a bolsa concedida durante a minha pesquisa.

Aos ovinos, pois sem eles não teria essa dissertação!

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse realizado, meu eterno AGRADECIMENTO!

Tudo no fim dá mesmo certo...

RESUMO

A ovinocultura tem posição de destaque na exploração comercial e de subsistência. Porém, as práticas adotadas nos criatórios contribuem para a ocorrência de doenças parasitárias, que constituem um dos principais entraves para esse setor produtivo. O uso de anti-helmínticos comerciais nos animais, além de ser oneroso, permite a seleção para a resistência às bases anti-helmínticas. Resíduos desses produtos ainda podem contaminar o homem, permanecendo na carne e no leite dos ovinos, ou no meio ambiente. Os fungos são considerados fontes promissoras de metabólitos secundários para uso terapêutico. Objetivou-se avaliar a eficácia anti-helmíntica *in vitro* de fungos ascomicetos e basidiomiceto no controle de *Haemonchus contortus* sob diferentes formas de preparo. Realizaram-se testes de inibição da eclodibilidade (IE) e de inibição de desenvolvimento larval (IDL) para determinar a eficácia do pó bruto, extrato aquoso e etanólico de *Agaricus brasiliensis*, e do filtrado e extrato etanólico de *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum*. O filtrado e extrato etanólico de *A. brasiliensis* apresentaram eficácias de 100% na IE de *Haemonchus contortus* em todas as concentrações testadas. O pó bruto apresentou eficácia de 98,39% na IDL. Para os ascomicetos, verificou-se eficácias na IE superior a 96% para os extratos etanólicos. Entretanto, as concentrações efetivas variaram em função dos gêneros dos fungos. Na IDL, o filtrado de *Trichoderma longibrachiatum* foi efetivo na concentração 0,79 mg/g, com eficácia de 92,8%. Conclui-se que os fungos estudados apresentam potencial promissor para o controle alternativo de *Haemonchus contortus* de ovinos.

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*. *Aspergillus terreus*. *Paecilomyces* sp.. *Trichoderma longibrachiatum*. Controle alternativo.

ABSTRACT

The sheep industry has an outstanding position in the commercial exploitation and subsistence. However, the practices adopted in farms contribute to the occurrence of parasitic diseases, which constitute a major obstacle to this productive sector. The use of anthelmintics trade in animals, besides being costly, allows selection for resistance to bases anthelmintic. These waste products can still infect man, remaining in the meat and milk of sheep, or in the environment. The fungi are considered promising sources of secondary metabolites for therapeutic use. This study aimed to evaluate the efficacy anthelmintic basidiomycete and ascomycete fungi in vitro in control of *Haemonchus contortus* under different preparation methods. Tests were conducted inhibition hatchability (IH) and inhibition of larval development (ILD) to determine the efficacy of crude powder, aqueous and ethanolic extracts of *Agaricus brasiliensis*, and the filtrate and ethanolic extract of *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces sp.* *Trichoderma longibrachiatum*. The filtrate and the ethanol extract of *A. brasiliensis* showed 100% efficacy in IH *contortus* at all concentrations tested. The crude powder showed an efficacy of 98.39% in ILD. For the ascomycetes, it was found efficacies in IH greater than 96% for the ethanol extracts. However, the effective concentrations varied as a function of the genera of fungi. In ILD, the filtrate of *Trichoderma longibrachiatum* was effective at the concentration 0.79 mg / g, with an efficiency of 92.8%. It is concluded that fungi studied have promising potential alternative to the control of *Haemonchus contortus* in sheep.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*. *Aspergillus terreus*. *Paecilomyces sp.*. *Trichoderma longibrachiatum*. Alternative control.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Ovinocultura.....	12
2.2 Verminose e resistência anti-helmíntica.....	13
2.3 Fungos como agentes para o controle biológico.....	14
2.3.1 <i>Aspergillus</i> spp., <i>Paecilomyces</i> spp. e <i>Trichoderma</i> spp.....	19
2.3.2 <i>Agaricus brasiliensis</i>	21
3 OBJETIVO GERAL.....	24
CAPÍTULO 2 - COGUMELO DO SOL NA INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE E DO DESENVOLVIMENTO LARVAL DE <i>Haemonchus contortus</i>.....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	26
1 INTRODUÇÃO.....	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1 Obtenção do pó bruto, extratos aquoso e etanólico.....	29
2.2 Coleta de fezes e exames parasitológicos.....	29
2.3 Eficácia dos extratos aquoso e etanólico na inibição da eclodibilidade.....	30
2.4 Eficácia para a inibição do desenvolvimento larval em coproculturas quantitativas.....	31
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
3.1 Inibição da eclodibilidade.....	34
3.2 Inibição do desenvolvimento larval.....	37
4 CONCLUSÃO.....	42

CAPÍTULO 3 - FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE RUMINANTES NA INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE E DO DESENVOLVIMENTO LARVAL DE <i>Haemonchus contortus</i>.....		43
RESUMO.....		43
ABSTRACT.....		44
1 INTRODUÇÃO.....		45
2 MATERIAL E MÉTODOS.....		47
2.1 Isolados de fungos do trato digestório de ruminantes.....		47
2.2 Obtenção de filtrados e extratos etanólicos.....		47
2.3 Coleta de fezes e exames parasitológicos.....		48
2.4 Eficácia dos filtrados e extratos etanólicos na inibição da eclodibilidade.....		49
2.5 Eficácia dos filtrados sobre a inibição do desenvolvimento larval.....		50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....		53
3.1 <i>Aspergillus terreus</i>		53
3.2 <i>Paecilomyces</i> sp.....		57
3.3 <i>Trichoderma longibrachiatum</i>		62
4 CONCLUSÃO.....		69
REFERÊNCIAS.....		70
 ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.....		 83

CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura é uma atividade explorada em quase todos os continentes, em diferentes climas, relevos e vegetações. No entanto, somente em alguns países a atividade apresenta expressão econômica e é conduzida, na maioria dos casos, de forma empírica e extensiva, com baixos níveis de tecnologia (LEITE, 2000).

As verminoses são ocasionadas por nematódeos, que se alojam no trato gastrointestinal de ovinos e prejudicam o desempenho e a lucratividade. Esses helmintos ocasionam perda de peso, comprometem a conversão alimentar, desnutrição e menor crescimento e fertilidade, além ocasionar óbito em quadros grave (VIEIRA, 2005).

O tratamento frequente dos ovinos com anti-helmínticos tem sido a única medida de controle das helmintoses gastrintestinais adotada por criadores (CHARLES, 1995). Esses produtos são compostos químicos que apresentam diferentes mecanismos de ação contra os nematódeos. Em virtude do elevado custo desses produtos e do pouco esclarecimento técnico, produtores e tratadores utilizam sub ou superdosagens, com periodicidade inadequada, o que conseqüentemente favorece a seleção de parasitos resistentes e a contaminação dos animais e do ambiente com resíduos medicamentosos.

A resistência aos produtos anti-helmínticos é o principal problema para o tratamento da helmintose ovina e, juntamente com as perdas diretas e indiretas, pode comprometer ou até inviabilizar essa atividade. Atualmente, o controle desses parasitos somente com anti-helmínticos tem se mostrado ineficaz (GENNARI; AMARANTE, 2006). Considerando essas dificuldades, outras medidas vêm sendo pesquisadas com a finalidade de diminuir a infecção dos animais e, conseqüentemente, a contaminação dos produtos de origem animal, do meio ambiente e do homem com pesticidas.

O controle biológico foi desenvolvido para reduzir populações de parasitas por meio do uso de antagonistas naturais. Fungos são produtores de substâncias com ação anti-helmíntica, podendo ser pesquisados como novas alternativas para o controle. Apesar do desenvolvimento de formulações fúngicas comerciais representar desafio ao setor farmacêutico veterinário (CAMPOS, 2006), novas estratégias de controle das verminoses são imprescindíveis para a convivência com nematódeos gastrintestinais na ovinocultura. Nesse contexto, no presente capítulo buscou-se descrever as alternativas de controle biológico existentes para as helmintoses de ovinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura

Nos desertos da Ásia Central, ovinos e caprinos foram as primeiras espécies de animais de produção a serem domesticadas. Esses animais viviam em ambiente árido, desfavorável aos parasitas e apresentavam comportamento migratório, promovendo raramente pastejo no mesmo local. Essas características justificam porque a imunidade contra os nematódeos foi pouco desenvolvida com a evolução desses ruminantes. Quando os sistemas intensivos de criação foram desenvolvidos, os pequenos ruminantes passaram a se alimentar nos mesmos locais, com umidade e temperatura adequadas para os nematódeos, favorecendo o aumento da contaminação das pastagens e dos animais (SOTOMAIOR *et al.*, 2009).

A ovinocaprinocultura é amplamente praticada nos países tropicais e contribui para a produção sustentável de carne, leite e peles (NERY *et al.*, 2010). Segundo Vieira (2003), o interesse pela exploração tecnificada de ovinos e caprinos é crescente nos países desenvolvidos.

Apesar de possuir grande extensão territorial e clima favorável para a criação de pequenos ruminantes, o Brasil está começando a ganhar espaço no mercado de ovinos, por ser considerada atividade rentável e importante socioeconomicamente (REIS, 2011). Esses animais podem ser criados no manejo intensivo ou extensivo, permitem concentrar número de animais por área superior aos bovinos e a utilizam áreas com relevos impróprio para outros ruminantes (SEBRAE, 2004).

De acordo com Nogueira (2005), a expansão da ovinocultura nacional é acompanhada do aprimoramento da genética dos rebanhos, da tecnificação e do modelo empresarial, fatores fundamentais para o crescimento dessa atividade. A produção de carne e leite de qualidade poderá atender à crescente demanda interna e, em um futuro próximo, participar em mercados internacionais (SEBRAE, 2005).

No Brasil, o rebanho de ovinos compreende cerca de 17,6 milhões de cabeças. A região Nordeste concentra 57,24% dessa população e a Sul 28%. A região Sudeste possui 768,2 mil animais, sendo Minas Gerais o 15^o estado com maior rebanho efetivo, apresentando 221,4 mil indivíduos (IBGE, 2011).

As regiões Nordeste e Sul são responsáveis por mais de 85% do plantel efetivo brasileiro, porém verifica-se maior expansão da atividade no Sudeste, Centro-Oeste e Norte, com taxas de crescimento de 8,6%, 6,6% e 6,2% ao ano, respectivamente (EMATER, 2005).

Minas Gerais participa do desenvolvimento da ovinocultura no Sudeste e as regiões Norte, Triângulo Mineiro, Noroeste e Central do estado possuem rebanhos em evolução (SEBRAE, 2004). No Norte de Minas Gerais a ovinocultura é importante atividade e possui potencial de expansão, pois além de possuir áreas semiáridas e vegetação típica, constitui alternativa econômica viável para a região, fixando o homem no campo, por gerar emprego e renda para os produtores. Pode ainda viabilizar economicamente pequenas propriedades, com utilização de áreas com relevo impróprio para outras explorações, ou mesmo ser a atividade principal dentro de grandes empresas agropecuárias (SILVA, 2007).

A sustentabilidade dos pequenos produtores rurais no Norte e Nordeste de Minas Gerais tem sido questionada nos aspectos econômicos, ambientais e principalmente sociais (IDENE, 2011). Um dos principais entraves para o desenvolvimento da ovinocultura são as verminoses, que acometem ovinos em qualquer idade e sexo. Entretanto, as categorias de animais mais sensíveis a essa doença são os borregos e as fêmeas no periparto (SILVA, 2010).

2.2 Verminose e resistência anti-helmíntica

As helmintoses gastrintestinais representam os maiores desafios à produção de carne de cordeiro em países de clima tropical (MACEDO *et al.*, 2000; VIEIRA, 2008). Em trabalhos desenvolvidos no Norte de Minas Gerais, foi constatado que as práticas sanitárias adotadas são deficientes, influenciando o aumento dos índices de ocorrência de doenças infecciosas (ALMEIDA, 2010).

As infecções gastrointestinais provocam efeitos fisiopatológicos nos animais, com consequente diminuição no ganho de peso, comprometimento da condição corporal, redução da produção de leite e do desempenho reprodutivo dos animais. Frequentemente, eleva as taxas de mortalidade principalmente para animais jovens (GRAMINHA *et al.*, 2001)

Os nematódeos gastrintestinais mais frequentes na ovinocultura pertencem à família Trichostrongylidae e compreendem os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia* (FORTES, 1997).

No ciclo evolutivo de *Haemonchus contortus*, as fêmeas liberam ovos com as fezes do hospedeiro, que desenvolvem no ambiente e, em três dias, eclodem as larvas do primeiro estágio (L1), que após duas mudas passam à forma infectante, que serão ingeridas no pastejo (FORTES, 2004). Uma vez no organismo, as larvas infectantes atingem o estágio adulto no abomaso, reiniciando o ciclo (RUAS; BERNE, 2001).

Segundo Amarante e Sales (2007), *Haemonchus contortus* é o principal endoparasita de ovinos, em função do hábito hematófago, que promove quadros severos de anemia e morte, em altas infestações. *Trichostrongylus colubriformis* é o segundo em ordem de importância, provocando lesões na mucosa intestinal, com exsudação de proteínas séricas, quadros de anorexia, diarreia e edema submandibular.

Embora essas duas espécies sejam prevalentes nos rebanhos ovinos no Brasil, na maioria das vezes, as infecções são mistas, sendo comum o parasitismo dos ovinos por *Cooperia* sp., *Oesophagostomum* sp. e *Strongyloides papillosus*, além de *H. contortus* e *T. colubriformis* (AMARANTE; SALES, 2007).

O tratamento de verminose em ovinos é realizado quase exclusivamente com anti-helmínticos sintéticos, de forma pouco criteriosa, em intervalos curtos e sem orientação técnica. Essas práticas têm provocado rápida seleção de populações de helmintos resistentes, característica com alta herdabilidade (MELO, 2002; FURTADO, 2006).

Existem três grupos de anti-helmínticos de amplo espectro utilizados no controle de helmintos de ovinos, os benzimidazóis, os imidazotiazóis e as

avermectinas e dois grupos de pequeno espectro, as salicilanidas e substitutos fenólicos e os organofosforados, ambos com relatos de resistência em diversos países, especialmente na América Latina (WALLER, 1999; FAROUK, 2004).

No Ceará 88% das propriedades apresentavam nematódeos de ovinos resistentes ao oxfendazol, 41% ao levamisol e 59% à ivermectina (MELO *et al.*, 2003). O gênero *Haemonchus* foi o mais prevalente na população resistente aos anti-helmínticos testados. Foi também o mais frequente em populações de nematódeos resistentes em estudos realizados na América Latina, sul do Brasil e Ceará (WALLER *et al.*, 1996; FARIAS *et al.*, 1997; VIEIRA; CAVALCANTE, 1999). Essa elevada taxa de resistência anti-helmíntica, apresentada por esse gênero, está relacionada ao alto potencial biótico, grande variabilidade genética, elevado tamanho populacional efetivo e alta prevalência desse helminto (ECHEVARRIA; TRINDADE, 1989; BLACKHALL *et al.*, 1998; SANGSTER, 2001).

Segundo Cezar *et al.* (2008), os mecanismos de desenvolvimento da resistência parasitária aos anti-helmínticos são controversos. Entretanto, qualquer fármaco utilizado pode exercer pressão de seleção para genótipos resistentes, por isso os anti-helmínticos devem ser utilizados associados com outras estratégias de controle, para reduzir a frequência de uso de drogas e a seleção de helmintos resistentes.

As estratégias e métodos alternativos de controle dos nematódeos gastrintestinais em ovinos baseiam-se em conhecimentos epidemiológicos e na dinâmica populacional dos vermes no rebanho e na pastagem (VIEIRA, 2003). O controle estratégico, que consiste em tratar o rebanho quando as condições climáticas da região são desfavoráveis ao desenvolvimento e sobrevivência dos parasita em estágios de vida livre no ambiente, ou seja, no período seco (VIEIRA *et al.*, 2008). O método FAMACHA pode ser aplicável aos nematódeos hematófagos, no qual são tratados apenas animais com sintomas de anemia clínica, verificada por meio da coloração da conjuntiva ocular (VAN WYK *et al.*, 1997).

As principais medidas alternativas para a prevenção e o controle dos nematódeos incluem o pastejo com alternância de categorias (COLES, 2002) ou espécies de hospedeiros (FERNANDES *et al.*, 2004), e a seleção de raças (AMARANTE *et al.*, 2004) ou indivíduos (NUNES *et al.*, 1999) mais resistentes. Estudos realizados em Botucatu, São Paulo, demonstraram maior resistência de cordeiros Santa Inês às infecções por nematódeos gastrintestinais, quando comparados a cordeiros Suffolk e Ile de France (AMARANTE *et al.*, 2004).

A administração de fórmulas homeopáticas (ARENALES; ROSSI, 2000), a utilização de plantas ou extratos vegetais com propriedades anti-helmínticas (WALLER *et al.*, 2001), além do controle biológico com antagonistas naturais dos parasitas, com destaque para os fungos nematófagos, tem representado alternativas para o controle das verminoses em ovinos (PADILHA, 1996)

2.3 Fungos como agentes para o controle biológico

Dentre os fungos utilizados no controle biológico de parasitos, destacam-se espécies dos gêneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Verticillium*, *Paecilomyces*, *Aschersonia*, *Aspergillus*, *Entomophthora*, *Hirsutella*, *Nomurea*, *Sporothrix* e *Trichoderma*. Esses fungos apresentam ampla gama de hospedeiros, embora exista considerável diversidade genética dentro das espécies, demonstrando alto grau de especificidade (MILNER, 2000; SHAH; PELL, 2003; RIBEIRO, 2006).

Fungos nematófagos podem capturar, parasitar ou paralisar nematódeos em diferentes estágios do ciclo de vida, constituindo método promissor no controle de nematódeos gastrintestinais (ARAÚJO *et al.*, 2004). Esses fungos são divididos em função do modo de ação como ectoparasitas ou predadores, endoparasitas, parasitas de ovos e fêmeas e produtores de metabólitos tóxicos (NUNES, 2008; JANSSON *et al.*, 1997).

A forma mais prática de utilização de fungos predadores é a administração oral de micélios e conídios. Após a passagem no trato gastrintestinal, ocorre a colonização do bolo fecal, predação e destruição das

larvas infectantes dos nematódeos (LARSEN *et al.*, 1992). Araújo e Ribeiro (2003) constataram a eficácia *in vivo* dos isolados de *Monacrosporium sinense* e *Monacrosporium appendiculatum*. Após a passagem pelo trato digestório dos ruminantes, esses fungos preservaram a capacidade de predação de larvas infectantes dos gêneros *Cooperia* e *Haemonchus*.

Entretanto, além de alguns isolados fúngicos não resistirem à passagem no trato gastrointestinal dos animais (CAMPOS, 2006; LARSEN *et al.*, 1992), fungos produzidos em substratos sólidos, como grãos de cereais, têm apresentado limitações quanto à produção em escala industrial, tornando-se inviáveis comercialmente. Nesses casos, ocorrem alterações bioquímicas e contaminação nos grãos ao longo do tempo (LARSEN *et al.* 1995, WALLER *et al.* 2001). Waller *et al.* (1994) sugeriram a produção de fungos predadores de nematódeos em meios líquidos com o intuito de facilitar a formulação e administração. Outros estudos também reportam a produção de massa fúngica em meios líquidos como a melhor forma de se obter micélio e conídios de organismos para o controle biológico (PAPAVIZAS *et al.*, 1984).

Os fungos endoparasitos infectam os nematódeos com os esporos, seja pela adesão do esporo na cutícula do nematódeo ou com a ingestão desse esporo por larvas desses parasitas. Esses esporos posteriormente germinam, crescem e absorvem o conteúdo do helminto (WALLER e LARSEN, 1993). Araújo e Santos (2001) avaliaram isolados de fungos endoparasitos dos gêneros *Catenaria*, *Haptoglossa* e *Harposporium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus placei* e não observaram infecção. Segundo esses autores, os gêneros desses fungos desenvolvem o parasitismo com a ingestão de conídios pela larva do nematódeo e as larvas infectantes de *Haemonchus contortus* não ingerem alimento, inviabilizando a utilização desses fungos.

Diferentes medicamentos utilizados e comercializados atualmente são derivados de metabólitos secundários produzidos por fungos ou por processos fermentativos desses microrganismos (ARNOLD *et al.*, 2000; TAN; ZOU, 2001; STROBEL, 2003; FERRARA, 2006). Fungos são fontes promissoras de substâncias bioativas naturais para uso terapêutico (STONE

et al., 2000). Entretanto, é necessário selecionar linhagens que tenham potencialidade para o biocontrole de cada parasito (GRAMINHA *et al.*, 2005). Algumas espécies de fungos podem produzir metabólitos com efeitos ovicidas (WALLER; FAEDO, 1993) e outras podem destruir nematódeos com a ação de toxinas (NORDBRING-HERTZ, 1988).

Assim, os microrganismos produtores de metabólitos secundários possuem potencial para serem usados na medicina, na agricultura e na indústria (STROBEL; DAISY, 2003; GUO *et al.*, 2008). Pesquisas reportam que os mecanismos de atuação de fungos em ovos de helmintos são baseados na decomposição enzimática e na biossíntese de toxinas antiparasitárias. Fungos nematófagos podem penetrar a quitina da cutícula das larvas de nematódeos, pois possuem diversas enzimas extracelulares, como proteases, quitinases e colagenases, envolvidas diretamente no processo de infecção do nematódeo (GRYNDLER *et al.*, 2003). De acordo com Fleuri (2009), em especial as quitinases apresentam potencial para aplicação no controle de fungos e formação de protoplastos, destruindo os ovos e larvas dos nematódeos.

A seleção de agentes que possam ser empregados comercialmente como controladores biológicos de parasitos gastrintestinais de ruminantes está baseada na capacidade de produção do antagonista em maior escala e com baixos custos, na competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais. Nesse desenvolvimento, as formulações precisam oferecer para os produtores, consumidores, animais tratados e ao meio ambiente, qualidade, eficácia e segurança no controle do organismo alvo (MOTA *et al.*, 2003).

Em estudo da composição das populações de fungos em fezes de ovinos criados em sistema extensivo no Norte de Minas Gerais, relatou o predomínio do gênero *Aspergillus* e a ocorrência do gênero *Trichoderma* entre os isolados de borregos, enquanto que, para as matrizes, os gêneros *Paecilomyces*, *Malbranchea* e *Aspergillus* foram os mais frequentes. Os isolados obtidos podem ser importantes para a pesquisa de novos metabólitos com eficácia anti-helmíntica (FREITAS, *et al.*, 2009).

2.3.1 *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum*

Dentro da divisão Ascomycota, os fungos *Aspergillus terreus* e *Paecilomyces* sp. pertencem à classe Eurotiomycetes, ordem Eurotiales e família Trichocomaceae. Diferente do *Trichoderma longibrachiatum* classificado em Sordariomycetes, Hypocreales e Hypocreaceae.

No gênero *Aspergillus* existem mais de 200 espécies e aproximadamente 20 delas têm sido relacionadas às doenças (RICHARDSON; WARNOCK, 2003). As espécies *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus deflexus* são as de maior importância na Medicina Veterinária como agentes de aspergilose (QUINN *et al.*, 1994; LACAZ *et al.*, 2002; CONCEIÇÃO *et al.*, 2005)

No entanto, aproximadamente 30% dos 6.500 metabólitos bioativos de fungos foram obtidos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, os quais devem ainda ser pesquisados como produtores de novos compostos bioativos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; SURYANARAUANAN *et al.*, 2009).

Fungos do gênero *Aspergillus* também são utilizados para a produção de proteínas recombinantes como a glicoamilase, quimosina bovina, lactoferrina humana, interleucina-6 humana e taumatina (WANG *et al.*, 2005, SHARMA *et al.*, 2009). *Aspergillus niger* é utilizado na indústria de alimentos, de detergente e no processamento de amido, por produzir ácido cítrico, quimosina, lipase, protease e α -amilase, considerados metabólitos primários (BENNETT, 1998; JIANG; NA, 2000; MEYER, 2008).

Apesar de muitas espécies de *Aspergillus* spp. serem patogênicas para seres humanos e animais, produtoras de metabólitos tóxicos e deterioradores de alimentos, esses microrganismos são essenciais na fermentação de alimentos e em aplicações biotecnológicas (SAMSON; VARGA, 2009).

Paecilomyces spp. é um fungo anamorfo encontrado em diferentes regiões do mundo e tem sido observado com maior frequência em locais quentes. A presença desse gênero tem sido detectada em vários hospedeiros e em solos cultivados ou não (FARIA; TIGANO, 1996; SOSA-GOMEZ, 2002).

Podem crescer rapidamente *in vitro* e a sobrevivência no substrato não depende da presença de nematódeos (CARNEIRO, 1992).

Segundo Ferreira *et al.* (2008) *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia chlamydosporia* são parasitas de ovos e de fêmeas adultas e apresentam maior relevância no controle de fitonematódeos. A espécie *P. lilacinus* é parasita facultativo de ovos de nematódeos, destruindo o embrião ao penetrar nos ovos (DUNN *et al.*, 1982) e apresenta efeito tóxico sobre os fitonematódeos adultos do gênero *Meloidiodyne* (DEVRAJAN; SEENIVASAN, 2002).

Braga (2008) constatou eficácia de *P. lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata* em condições laboratoriais ao final de dez dias. O efeito ovicida foi verificado por Araujo (1995) sobre ovos de *Toxocara canis*, sendo observado o efeito lítico em sete dias de incubação, com alteração morfológica do embrião e da casca. Ocorreu penetração de hifas e colonização interna para 16% dos ovos e efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo para 15% dos ovos (ARAUJO, 1995).

Os gêneros *Aspergillus*, *Pleurotus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Myrothecium* são produtores de metabólitos tóxicos. No entanto é preciso conhecer o efeito desses metabólitos sobre os nematódeos (PAPAVIZAS, 1985; ELAD *et al.*, 1993).

O gênero *Trichoderma* é distribuído em todo o mundo, em diferentes tipos de solo, especialmente nos que possuem alta 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 mestiços Santa Inês (FREITAS, 2012). A adaptação desse gênero, em diferentes substratos e a produção de enzimas, o torna de grande interesse biotecnológico (ESPOSITO; SILVA, 1998).

Trichoderma spp. são produtores de 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). Sendo que a 1,3- β glucanases apresenta atividade enzimática importante no biocontrole de microrganismos (DE MARCO *et al.*, 2000). Muitas exoenzimas desses fungos são utilizadas

em escala industrial e podem atuar em processos de biodegradação de compostos clorofenólicos e na biorremediação do solo (ESPOSITO; SILVA, 1998).

O gênero *Trichoderma* pode produzir metabólitos para o controle biológico de fungos fitopatogênicos (PAPAVIZAS, 1985; ELAD *et al.*, 1993) e para o controle de doenças de plantas (BETTIOL *et al.*, 2008), parasitando ovos de fitonematódeos (SPIEGEL; CHET, 1998; SHARON *et al.*, 2001; EAPEN *et al.*, 2005). No entanto poucas pesquisas foram realizadas sobre a ação específica no controle de nematódeos de vegetais (SPIEGEL; CHET, 1998; SHARON *et al.*, 2001).

2.3.2 *Agaricus brasiliensis*

Os cogumelos são utilizados com finalidades medicinais desde os tempos mais remotos. O fungo conhecido como cogumelo do sol pertence à divisão Basidiomycota, classe Agaricomycetes, Ordem Agaricales, família Agaricaceae, gênero *Agaricus*, subgênero *Flavoagaricus*, seção *Majores*, subseção *Flavescente* e espécie *Agaricus brasiliensis subrufescens*, sendo o considerado sinônimo de *Agaricus blazei* e *Agaricus silvaticus* (URBEN *et al.*, 2005).

Segundo Wong *et al.* (1994) a utilização de substâncias bioativas, extraídas de fungos basidiomicetos, possui interesse no meio científico. O *Agaricus brasiliensis* possui alto teor de proteína e fibra alimentar e baixo valor calórico (MONTEIRO *et al.*, 2005). Esse basidiomiceto, popularmente denominado de cogumelo de deus, cogumelo piedade ou cogumelo do sol, apresenta diferentes compostos biologicamente ativos de interesse terapêutico e nutricional (DIAS *et al.*, 2002). No entanto, o custo elevado e a pouca tradição tornam pequeno o consumo de cogumelos no Brasil, quando comparado a outros países (URBEN; OLIVEIRA, 1998).

As substâncias bioativas presentes nos cogumelos podem ser capazes de modular a carcinogênese nas fases de iniciação, promoção e progressão. Observaram-se benefícios aos portadores de diferentes tipos de câncer, por meio do estímulo ao sistema imunológico. Entretanto, os mecanismos de

ação ainda não foram elucidados (FORTES; NOVAIS, 2006). *Agaricus brasiliensis* demonstrou ser anticancerígeno mais efetivo quando comparado com *Lentinus enodes*, *Grifola frondos* e *Ganoderma lucidum* (WASSER *et al.*, 2002).

O tratamento por via oral, utilizando extrato aquoso de *A. Brasiliensis* em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* apresentou redução acentuada do número de parasitas, em diferentes órgãos, com ausência de efeitos colaterais e eficácia superior aos medicamentos convencionais, como a anfotericina B (VALADARES *et al.*, 2011).

O extrato aquoso de um isolado de *A. brasiliensis*, aplicado cinco dias antes da inoculação da bactéria *Xanthomonas vesicatoria*, em casa de vegetação, reduziu significativamente a severidade da mancha bacteriana em tomateiro, obtendo-se proteção média de 45%. Observou-se também aumento na atividade de β -1,3-glucanase, sugerindo assim a indução de resistência em tomateiro contra essa bactéria (DI PIERO E PASCHOLATI, 2004).

O extrato aquoso de *A. brasiliensis* também apresentou efeito antiviral contra o Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) e Herpes Bovino tipo 1 (BoHV-1) em cultura de células HEp-2. O extrato apresentou atividade virucida mais efetiva do que terapêutica para ambos os vírus, sendo mais efetivo para HSV-1 (BRUGGEMANN *et al.*, 2006).

Vários produtos provenientes do cogumelo do sol são registrados no Ministério da Saúde do Brasil e na Agência Nacional de Vigilância Sanitária. São apresentados nas formulações de chá, pó, comprimidos, cápsulas, desidratado *in natura* ou adicionado à geleia real. A produção mundial de cogumelos comestíveis alcançou crescimento de 60% nos últimos dez anos, atingindo 3,35 milhões de toneladas anuais (FAO, 2008). Segundo o censo agropecuário do IBGE (2006), foram produzidas no Brasil 5.894 toneladas de cogumelos comestíveis, sendo a espécie mais cultivada o *Agaricus bisporus* (Champignon), seguido pelo *Agaricus brasiliensis* (Cogumelo do Sol) e *Lentinus enodes* (Shitake).

Os basidiomicetos *Amauroderma camerarium* e *Gymnopilus pampeanus* demonstraram atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, indicando a presença de moléculas potenciais com atividade antiparasitária produzidas em meio de cultivo com micélios desses basidiomiceto (DUARTE, 2011).

3 OBJETIVO GERAL

Por meio deste trabalho objetivou-se verificar a eficácia dos fungos *Agaricus brasiliensis*, *Apergillus* sp., *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum*, na inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* proveniente de ovinos.

CAPÍTULO 2 - COGUMELO DO SOL NA INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE E DO DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Haemonchus contortus*

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia anti-helmíntica *in vitro* do fungo *Agaricus brasiliensis* (cogumelo do sol) sobre o nematódeo *Haemonchus contortus*. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de ovinos monoinfectados com *Haemonchus contortus*. A inibição da eclodibilidade foi avaliada frente aos extratos aquoso e etanólico de *A. brasiliensis* em quatro concentrações, comparando-se com o controle negativo, contendo água destilada estéril e com o controle positivo, com fosfato de levamisol. Decorridas 72h de incubação, foram quantificados ovos blastomerados, ovos larvados e larvas infectantes de primeira fase (L1). No teste de inibição do desenvolvimento larval foram avaliadas quatro concentrações do pó bruto e do extrato aquoso, comparando-se com controle negativo, contendo água destilada estéril e com o controle positivo, ivermectina. Após sete dias de incubação das fezes, as L1 foram coletadas e quantificadas, obtendo-se o número de larvas desenvolvidas por gramas de fezes (LDGP). No teste de inibição da eclodibilidade as concentrações iguais e superiores a 3,62 e 8,02 mg/ml para os extratos aquoso e etanólico, respectivamente, apresentaram 100% de eficácia. Na de inibição do desenvolvimento larval verificou-se eficácia de 98,39%, para a concentração 166,67 mg/g de coprocultura do pó bruto do cogumelo. A concentração letal para inibir em 90% da produção de larvas infectantes foi estimada em 100,90 e 8,30 mg/g de coprocultura para o pó bruto e extrato aquoso do fungo, respectivamente. O cogumelo do sol apresentou atividade nematicida *in vitro* e futuros estudos para determinar as melhores estratégias para uso *in vivo* devem ser pesquisadas.

Palavras-chave: *Agaricus brasiliensis*. Controle alternativo. Ovinocultura. Helmintose.

CHAPTER 2 - SUN MUSHROOM IN THE INHIBITION OF THE HATCHABILITY AND OF THE LARVAL DEVELOPMENT OF *Haemonchus contortus*

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the efficacy anthelmintic in vitro of the fungi of *Agaricus brasiliensis* (sun mushrooms) on the nematode *Haemonchus contortus*. The feces were collected directly from the rectal ampulla of monoinfected sheep with *Haemonchus contortus*. The inhibition of hatchability was evaluated front of the aqueous and ethanolic extract of *A. brasiliensis* in four concentrations, compared with the negative control, containing sterile distilled water and with the positive control, levamisole phosphate. After 72 hours of incubation, eggs were quantified blastomeres, embryonated eggs and infective larvae of the first stage (L1). In the test of inhibition of larval development were evaluated four concentrations of crude powder and aqueous extracts, compared with negative control containing sterile distilled water and the positive control, ivermectin. After seven days of incubation of feces L1 were collected and quantified by obtaining the number of developed larvae per gram of feces (LDGP). In the test of inhibition of hatchability equal concentrations and higher than 3.62 and 8.02 mg / m l for the aqueous and ethanol extracts, respectively, showing 100% effectiveness. On the inhibition of larval development it was found efficacy of 98.39% for the concentration 166.67 mg / g of coproculture crude powder of mushroom. The lethal concentration to inhibit by 90% the production of infective larvae was estimated at 8.30 and 100.90 mg / g for the powder coproculture and crude aqueous extract of the fungus, respectively. The sun mushrooms showed nematicidal activity in vitro and further studies to determine the best strategies to use in vitro should be investigated.

Keywords: *Agaricus brasiliensis*. Alternative control. Sheep. Helminths.

1 INTRODUÇÃO

A ovinocultura é alternativa na pecuária geradora de emprego, renda familiar e fixadora do homem no campo. No Norte de Minas Gerais e em outras regiões semiáridas, pode viabilizar economicamente a exploração de pequenas propriedades, utilizando áreas com relevo impróprio para outras explorações, ou mesmo ser a atividade principal em empresas agropecuárias (ALMEIDA, 2010).

O desempenho e a lucratividade podem ser prejudicados pelas helmintoses, porque essas doenças podem comprometer a conversão alimentar, promover a desnutrição e a perda de peso, reduzir o crescimento, a produtividade, a fertilidade e ainda aumentar as taxas de mortalidade (VIEIRA, 2008). Segundo Amarante e Sales (2007), *Haemonchus contortus* é o principal helminto presente em ovinos, em função da hematofagia e por apresentar ciclo evolutivo direto e rápido, com fase de vida livre e parasitária.

O tratamento dessas enfermidades é realizado, na maioria das vezes, exclusivamente com anti-helmínticos sintéticos, de forma pouco criteriosa, em intervalos curtos e sem orientação técnica. Essas práticas promovem a rápida seleção de populações de helmintos resistentes, característica de alta herdabilidade (MELO, 2002).

A resistência anti-helmíntica representa obstáculo no controle dos nematódeos e somada às perdas diretas e indiretas, pode comprometer ou inviabilizar a atividade (DUARTE *et al.*, 2012). Por isso, outras medidas de controle para reduzir a contaminação ambiental e a infecção dos animais têm sido estudadas.

O controle biológico pode possibilitar a redução da frequência de tratamentos com quimioterápicos, diminuindo a pressão de seleção de parasitos resistentes. Contribui para evitar resíduos de medicamentos em produtos de origem animal ou no ambiente, sendo alternativa sustentável de controle às parasitoses (FONTENOT *et al.*, 2003).

Fungos nematófagos e produtores de metabólitos com ação anti-helmíntica são promissores na profilaxia das helmintoses gastrintestinais de ruminantes (GIROTTI, 2008).

Os cogumelos são utilizados por seres humanos na alimentação com fins nutricionais e ou terapêuticos há muitos anos. Em 22 espécies de basidiomicetos originários do Japão, Alemanha e Vietnã foram caracterizadas diferentes substâncias antimicrobianas, nematicidas e antivirais. Esses metabólitos promoveram inibição da produção de óxido nítrico e atividades antioxidantes, indicando o potencial de biomoléculas derivadas desses fungos (QUANG *et al.*, 2006).

Agaricus brasiliensis, popularmente conhecido como cogumelo do sol (CROCCIA, 2010) encontra-se entre as principais espécies pesquisadas. Esse basidiomiceto, originário do Brasil, pertence à ordem Agaricales e família Agaricaceae sendo amplamente produzido e comercializado (BRAGA *et al.*, 1999; WASSER *et al.*, 2002).

Pesquisas sobre compostos biologicamente ativos de interesse terapêutico do cogumelo do sol são promissoras (DIAS *et al.*, 2002). No entanto, propriedades anti-helmínticas desse basidiomiceto sobre ovos e larvas de nematódeos gastrintestinais de ovinos ainda não foram avaliadas. Nesse contexto, buscou-se avaliar o efeito *in vitro* de *Agaricus brasiliensis* na inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados entre abril a junho de 2012 nos laboratórios de Parasitologia e Microscopia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), localizados em Montes Claros, Norte de Minas Gerais, latitude 16°44'06" S e longitude 43°51'43" O.

2.1 Obtenção do pó bruto, extratos aquoso e etanólico

Adquiriram-se amostras de cogumelo do sol da Associação dos Produtores de Cogumelo do Norte de Minas e Vale do Jequitinhonha (APROCONOVA). Para a obtenção do pó seco, as massas de basidiocarpos foram desidratadas em estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 40°C \pm 5, por aproximadamente 72h. Posteriormente, foram trituradas em liquidificador e armazenadas em freezer a -4°C.

O extrato aquoso foi obtido por decoção, conforme o método descrito por Krychak-Furtado *et al.* (2006) e adaptado por Nery *et al.* (2010). O material seco e triturado foi misturado em água destilada estéril e incubado em banho-maria à temperatura de 60°C, durante 60 minutos. Em seguida, filtrou-se à quente em funil com gaze e algodão, obtendo-se o extrato aquoso bruto, utilizado imediatamente.

Para a obtenção do extrato etanólico foi utilizada a metodologia adaptada de Nery *et al.* (2010). Foram adicionados 100 ml de álcool etílico absoluto para cada 50 gramas de cogumelo seco e triturado. A mistura foi homogeneizada e transferida para béquer vedado com papel filme e 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* e desidratado em estufa com circulação forçada de ar a 40°C \pm 5, por três dias.

Determinou-se a matéria seca (MS) a 105°C conforme *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1990) do pó bruto e dos extratos aquoso e etanólico, para cálculo das concentrações testadas (CUNNIF, 1995).

2.2 Coleta de fezes e exames parasitológicos

Foram selecionados três ovinos machos, castrados e criados em baias da Fazenda Experimental do ICA - UFMG em Montes Claros, com mono-infecção de *Haemonchus contortus* com valores superior a 500 ovos por grama de fezes (OPG).

A infecção desses animais foi quantificada segundo Ueno e Gonçalves, (1998), pesando-se dois gramas de fezes coletadas diretamente da ampola do reto dos ovinos. Promoveu-se a flutuação com adição de solução hipersaturada de cloreto de sódio (NaCl). E a quantificação dos ovos foi realizada em câmara de *McMaster* com auxílio de microscópio óptico.

Para a recuperação das larvas de terceiro estágio, foi utilizada a técnica de coprocultura segundo Ueno e Gonçalves (1998), e as mesmas foram identificadas segundo chave de Keith (1953).

Todos os procedimentos foram realizados conforme os princípios éticos da experimentação animal, aprovados no protocolo 42/2008 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO A).

2.3 Eficácia dos extratos aquoso e etanólico na inibição da eclodibilidade

Para verificar a eficácia do cogumelo do sol sobre a eclodibilidade, foram avaliadas as concentrações finais de 3,62; 7,25; 10,87 e 14,50 mg/ml do extrato aquoso e 8,02; 16,04; 24,06 e 32,07 mg/ml do extrato etanólico. Foram realizados dois experimentos, comparando-se os tratamentos aos controles positivo e negativo, contendo 15 mg/ml de fosfato de levamisol (Protall VP ®, Vallée, Minas Gerais, Brasil) e água destilada estéril, respectivamente. Utilizaram-se quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado.

Os ovos do nematódeo foram recuperados conforme Bizimenyera *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, ressuspenderam-se os ovos 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 alíquotas de 50 µl da solução. Padronizou-se a concentração de 100

ovos em 100 µl de água destilada estéril.

Para avaliar a eficácia dos extratos de *A. brasiliensis*, no teste de inibição da eclodibilidade de ovos, foi utilizada a metodologia adaptada de Coles *et al.* (1992), descrita para a para detecção da resistência anti-helmíntica. Em placas de microdiluição do tipo elisa, adicionou-se 100 µl de solução com aproximadamente 100 ovos e incorporou-se igual volume das soluções dos extratos ou dos controles positivo ou negativo. As amostras foram homogeneizadas e cobertas com filme plástico com orifícios para aeração. Os cultivos foram mantidos em estufa BOD a 28°C por 72h. Após esse período acrescentou-se 100 µl de solução com formol a 10% (v/v) para inibir o desenvolvimento das larvas e o crescimento de contaminantes. Os materiais foram armazenados sob refrigeração a ± 4°C para posterior quantificação e diferenciação entre ovos blastomerados, 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 de ovos foram transformadas em valores relativo referentes ao número inicial de ovos. Os resultados foram analisados em análise de variância (ANOVA) e comparados pelos testes de *Tukey* e *Duncan* ($p \leq 0,05$) no pacote estatístico SAEG 9.1 (2007). Empregou-se a fórmula, para determinar a eficácia de redução da eclodibilidade (COLES *et al.*, 1992):

$$\% \text{Eficácia} = 100 \times (1 - \text{larvas L1} / \text{número inicial de ovos}).$$

2.4 Eficácia para a inibição do desenvolvimento larval em coproculturas quantitativas

Prodeceu-se o teste de inibição do desenvolvimento larval pelo método descrito por Nery *et al.* (2010) adaptado de Borges (2003). Avaliou-se a atividade anti-helmíntica do pó bruto e do extrato aquoso de *A. brasiliensis* nas concentrações finais de 41,67; 83,33; 125,00; 166,67 mg/g e 1,20; 2,42; 3,62; 4,83 mg/g de coprocultura, respectivamente. Como controle positivo adicionou-se solução de 16 mg/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 da ampola retal de ovinos foram transportadas imediatamente em caixas isotérmicas ao laboratório de Parasitologia Animal do ICA/UFMG. As amostras foram homogeneizadas e dois gramas foram distribuídos aleatoriamente em copos plásticos descartáveis. Posteriormente dois ml de cada concentração dos extratos e dos respectivos controles foram adicionados às fezes. Após homogeneização os cultivos foram mantidos em temperatura ambiente por uma hora. Para o extrato aquoso adicionou-se dois gramas de vermiculita industrial fragmentada, e para o pó bruto foi adicionada vermiculita na quantidade para completar dois gramas, somando-se ao peso do pó bruto. Adicionou-se dois ml de água destilada estéril em todos os cultivos seguindo-se a homogeneização dos materiais (NERY *et al.*, 2010).

Cada recipiente foi coberto com plástico filme, com pequenos orifícios para aeração dos cultivos, os quais foram armazenados em cubas plásticas revestidas com toalha de papel umedecida diariamente. Os materiais foram incubados em estufa BOD à 28°C, durante sete dias. Quando necessário adicionou-se água para manter a umidade (NERY *et al.*, 2010).

Para a leitura, no sétimo dia de incubação, 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 foi virado bruscamente. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 20 ml de água destilada estéril à placa para permitir a migração das larvas infectantes para fora do copo. Após duas horas, as larvas foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaio contendo um ml de formol 10% (v/v) e mantidas sob refrigeração a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, 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):

$$\%Eficácia = 100 - [(LDGP \text{ do grupo tratado} / LDGP \text{ do grupo controle negativo}) \times 100].$$

Os valores de LDGP foram transformados em $\text{Log}_{10} (x + 10)$ e submetidos à ANOVA. As médias foram comparadas com o teste *Tukey* com 5% de significância, utilizando-se o pacote estatístico SAEG 9.1 (2007). Para determinar as concentrações letais (CL) capazes de inibir 50% (CL₅₀) e 90% (CL₉₀) o desenvolvimento larval do nematódeo, empregou-se a análise de regressão *probit* nesse mesmo programa estatístico

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Inibição da eclodibilidade

Verificou-se eficácia de 100% para os extratos aquoso e etanólico de *A. brasiliensis* em todas as concentrações avaliadas. Ocorreu maior inibição na embriogênese inicial, pois as médias de ovos blastomerados tratados com esses extratos foram superiores ($p \leq 0,05$) ao controle positivo e negativo (TAB. 1). Considera-se atraso no desenvolvimento normal dos ovos de nematódeos corresponde a ação farmacológica do produto testado. As ações mais eficazes são observadas quando o tratamento interrompe o processo de formação da larva dentro do ovo ou quando impede a eclosão e liberação das larvas (KRYCHAK-FURTADO *et al.*, 2005).

A estimativa de CL₉₀ e CL₅₀, para os extratos avaliados, não foi possível porque ocorreu eficácia de 100% em todos os tratamentos com *A. brasiliensis*, conforme TAB. 1 e 2. Foi observado desenvolvimento larval normal no controle negativo. Entretanto, nos tratamentos com ambos os extratos do cogumelo do sol ocorreram deformidades estruturais como contração, ruptura e descontinuidade da membrana do ovo, embrião condensado e mal definido, que poderiam ter sido ocasionados por metabólitos de *A. brasiliensis* (FIG. 1).

Fungos podem destruir nematódeos com a ação de toxinas e metabólitos ovicidas (GRAMINHA *et al.*, 2005). Braga *et al.* (2011) avaliaram o extrato bruto enzimático de *Pochonia chlamydosporia* em ovos de *Ancylostoma* sp. e observaram menor percentual de eclosão dos ovos desse parasita. As enzimas e toxinas do filtrado de *P. chlamydosporia* podem fragilizar e dissolver a cutícula de fitonematódeos juvenis de *Meloidogyne javanica* (MUKHTAR; PERVAZ, 2003). Assim, sugere-se também a presença de metabólitos ou enzimas que atuem sobre os ovos e as larvas de *Haemonchus contortus*, visto que o modelo *in vitro* deste estudo demonstrou efeito anti-helmíntico do cogumelo do sol sobre essas estruturas parasitárias.

TABELA 1

Eficácia de extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* sobre a eclodibilidade de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas	Eficácia (%)
3,62	43,50 ^a	2,50 ^C	0,00 ^a	100,00
7,25	56,25 ^a	5,75 ^C	0,00 ^a	100,00
10,87	68,50 ^a	4,25 ^C	0,00 ^a	100,00
14,50	77,50 ^a	6,25 ^C	0,00 ^a	100,00
Levamisol	28,50 ^b	39,25 ^A	0,00 ^a	100,00
Água estéril	5,75 ^c	16,50 ^B	53,75 ^b	-
C.V.	7,86	36,29	21,53	

Nota: Médias seguidas por letras minúsculas iguais na coluna são similares estatisticamente no teste de *Tukey* ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na coluna são similares estatisticamente no teste de *Duncan* ($p \leq 0,05$). C.V.: Coeficiente de variação (%).

Fonte: Da autora.

TABELA 2

Eficácia de extrato etanólico de *Agaricus brasiliensis* sobre a eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas	Eficácia (%)
8,02	47,25 ^c	36,00 ^a	0,00 ^a	100,00
16,04	43,75 ^{bc}	28,00 ^{ab}	0,00 ^a	100,00
24,06	52,25 ^b	19,75 ^b	0,00 ^a	100,00
32,07	52,00 ^a	6,00 ^c	0,00 ^a	100,00
Levamisol	55,00 ^c	46,75 ^a	0,00 ^a	100,00
Água estéril	2,00 ^d	1,25 ^c	62,00 ^b	-
C.V.	12,15	24,06	10,97	-

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

Fonte: Da autora.

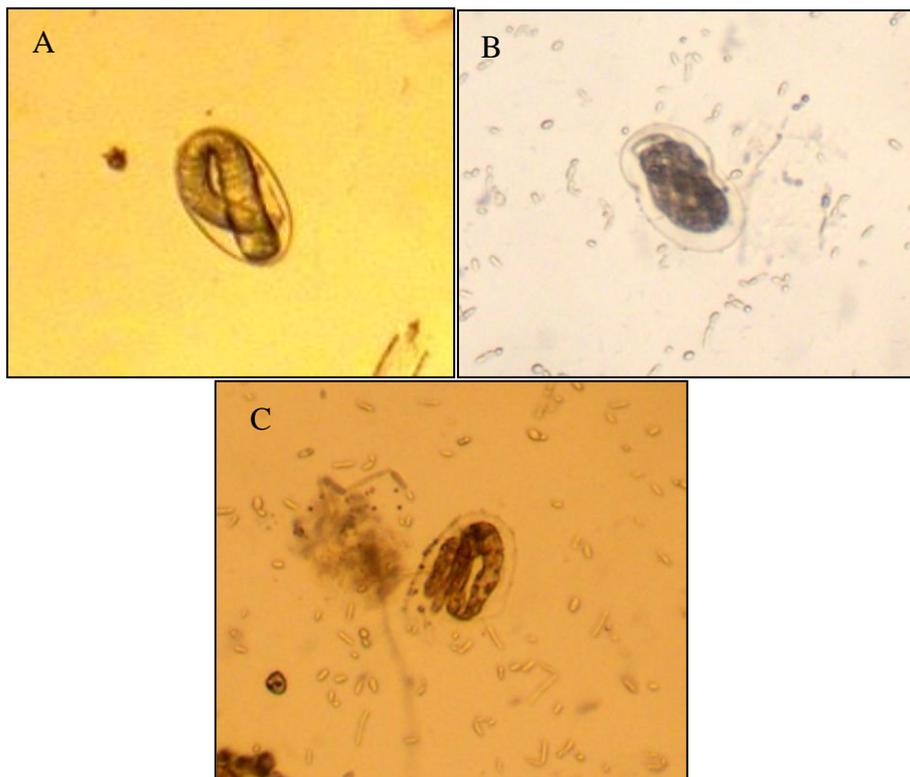


Figura 1 - Ovo larvado de *Haemonchus contortus* A: Ovo com aspecto normal de desenvolvimento, proveniente do controle negativo com água estéril; B e C: Ovos com alteração morfológica da casca e do embrião, oriundos do tratamento com extrato etanólico de *Agaricus brasiliensis* (Objetiva de 10x).

Fonte: Da autora.

3.2 Inibição do desenvolvimento larval

Nesta pesquisa as médias de larvas infectantes verificadas para todas as concentrações do pó bruto de *A. brasiliensis* foram significativamente menores quando comparadas àquelas observadas para o controle negativo. Para a concentração 166,67 mg/g de coprocultura obteve-se a eficácia de 98,7%, que foi significativamente semelhante àquela verificada para o controle positivo contendo ivermectina (TAB. 3). A CL_{50} e

CL₉₀ para esse extrato foram estimadas em 19,83 e 100,93 mg/g de coprocultura respectivamente (GRAF. 2A).

As médias de larvas infectantes recuperadas para as concentrações 3,62 e 4,83 mg/g de coprocultura foram significativamente inferiores àquela observada para o controle negativo do extrato aquoso do fungo (TAB. 3). A CL₅₀ foi estimada em 3,73 mg/g de coprocultura e CL₉₀ em 8,30 mg/g de coprocultura (GRAF. 2B).

TABELA 3

Eficácia de pó bruto de *Agaricus brasiliensis* sobre o desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus*

Tratamento (mg/g de coprocultura)	LDGP	Eficácia (%)
41,67	98 ^b	74,7
83,33	65 ^b	83,2
125,00	38 ^b	90,2
166,67	5 ^a	98,7
Ivermectina	0 ^a	100
Água estéril	388 ^c	-
C.V.	13,71	

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. Coeficiente de variação (%).

Fonte: Da autora.

TABELA 4

Eficácia do extrato aquoso de *Agaricus brasiliensis* sobre o desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/g de coprocultura)	LDGP	Eficácia (%)
1,20	466 ^c	2,1
2,42	438 ^c	7,9
3,62	195 ^b	59
4,83	164 ^b	65,5
Ivermectina	0 ^a	100
Água estéril	476 ^c	-
C.V.	13,71	

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: Da autora.

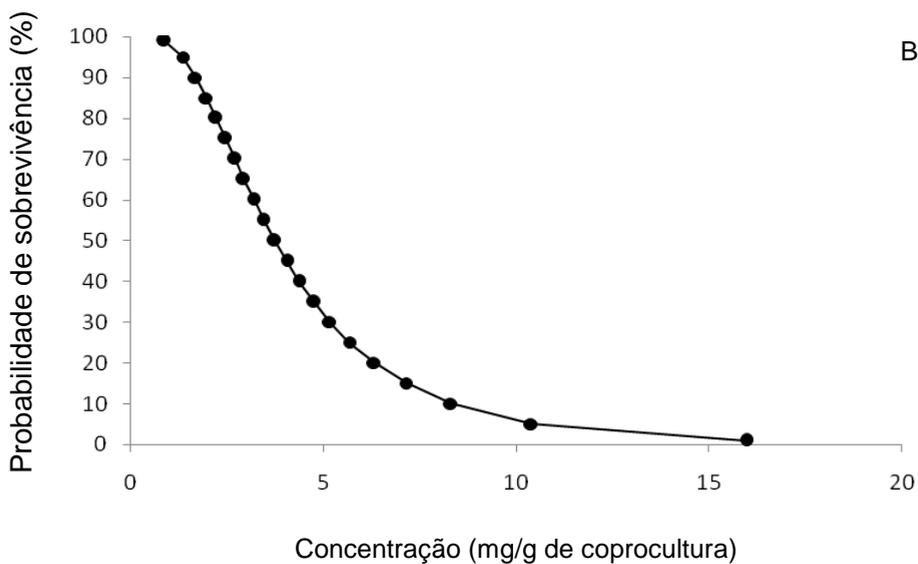
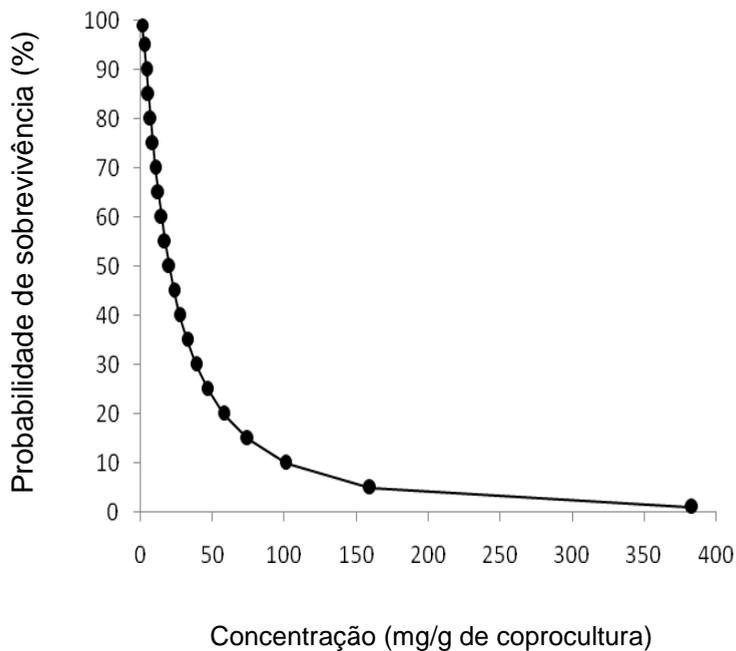


GRAFICO 1 – Probabilidade de sobrevivência de larvas infectantes de *Haemonchus contortus*, em coproculturas, em função das concentrações do pó bruto (A) e do extrato aquoso (B) de *Agaricus brasiliensis*.

Fonte: Da autora.

Segundo a classificação do índice de eficácia anti-helmíntica proposta pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, o produto é altamente efetivo se apresenta mais de 90% de eficácia antiparasitária, moderadamente eficaz quando atua entre 80 a 90%, pouco eficiente entre 60 e 80% e ineficaz em níveis abaixo de 60% (POWERS *et al.*, 1982). Assim, o cogumelo do sol apresentou eficácia de 98,7% para o pó bruto no teste de desenvolvimento larval, e 100% para os extratos avaliados na inibição da eclodibilidade, correspondendo a um produto altamente efetivo.

Embora os mecanismos de ação das substâncias bioativas de cogumelos ainda não estejam completamente esclarecidos, estudos demonstram que *A. brasiliensis* produz quitinase, fenilalanina amônia-liase, polifenoloxidase e ácido linoleico (OOI; LIU, 1999; SILVA, *et al.*, 2008). Sendo assim, sugere-se a atividade de biomoléculas nos extratos e pó bruto dessa espécie fúngica, capazes de inibir e deformar os ovos e larvas de *Haemonchus contortus*.

Mota *et al.*, (2000) constataram a eficácia predatória *in vitro* dos fungos nematófagos *Artrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *H. contortus* de caprinos. Duarte (2011) para a verificação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis*, os fungos *Amauroderma camerarium* e *Gymnopilus pampeanus* demonstraram atividade contra o protozoário, indicando a presença de moléculas potenciais com atividade antiparasitária produzidas em meio de cultivo com micélios desses basidiomicetos.

Os extratos aquoso e etanólico, bem como o pó bruto de cogumelo do sol foram ovicidas e larvicidas *in vitro* para *Haemonchus contortus*, indicando a necessidade de estudos sobre os mecanismos de ação, toxicidade e eficácia *in vivo* para permitir a indicação futura desse fungo com o anti-helmíntico alternativo às poucas bases químicas existentes no mercado.

4 CONCLUSÃO

O cogumelo do sol (*Agaricus brasiliensis*) representa alternativa promissora para o controle de *Haemonchus contortus*, uma vez que os extratos aquoso e etanólico em concentrações iguais ou superiores a 3,62 e 8,02 mg/ml, respectivamente, inibem completamente a eclodibilidade. Na inibição do desenvolvimento larval do nematódeo, o pó bruto e o extrato aquoso apresentaram eficácia de 98,7 e 67,5% para as concentrações de 166,67 e 4,83 mg/g de coprocultura, respectivamente.

CAPÍTULO 3 – FUNGOS DO TRATO DIGESTÓRIO DE RUMINANTES NA INIBIÇÃO DA ECLODIBILIDADE E DO DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *HAEMONCHUS CONTORTUS*

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia *in vitro* dos filtrados e extratos etanólicos de isolados de *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum* na inibição da eclodibilidade (IE) e do desenvolvimento larval (IDL) de *Haemonchus contortus*. Para a avaliação da IE, após 72 horas de incubação com diferentes concentrações dos filtrados e extratos etanólicos, foram quantificados ovos blastomerados, 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). Utilizou-se 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%. Verificou-se 100% de eficácia para todas as concentrações do filtrado de *Paecilomyces* sp., e para o extrato etanólico observou-se eficácias superiores a 99% em concentrações iguais ou superiores a 16,80 mg/ml. O extrato etanólico de *Trichoderma longibrachiatum* mostrou-se altamente efetivo em concentrações iguais ou superiores a 1,90 mg/ml. Na IDL, o filtrado de *Trichoderma longibrachiatum* foi eficiente na concentração de 0,79 mg/ml, com eficácia de 92,78%. Conclui-se que os filtrados e extratos etanólicos dos fungos avaliados neste trabalho apresentam potencial para o controle alternativo de *Haemonchus contortus*.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*. *Paecilomyces* sp.. *Trichoderma longibrachiatum*. Controle alternativo. Ovinocultura.

CHAPTER 3 - FUNGI OF DIGESTIVE TRACT OF RUMINANT IN THE INHIBITION OF HATCHING AND LARVAL DEVELOPMENT OF *Haemonchus contortus*.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the in vitro efficacy of filtered and ethanol extracts of isolates of *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces sp.* and *Trichoderma longibrachiatum* in the inhibition of hatchability (IH) and of the larval development (ILD) of *Haemonchus contortus*. To evaluate the IH, after 72 hours of incubation with different concentrations of the filtrate and ethanolic extracts were quantified blastomeres eggs, embryonated and infective larvae of first stage (L1). It was used sterile distilled water as negative control and 15 mg / m l of levamisole phosphate as positive control. For ILD was adapted from the method used of quantitative of coproculture. After seven days of incubation with different concentrations of the feces filtrates of fungi, infective larvae were collected and quantified, yielding developed the number of larvae per gram of feces (LDGP). It was used as controls 15 mg / m l of ivermectin or distilled water. In IH, the ethanol extract of *Aspergillus terreus* at a concentration of 69.25 mg / m l, showed 100% efficiency. It has been found 100% effective at all concentrations of filtrate from *Paecilomyces sp.* and to the ethanol extract was noted efficiencies higher than 99% at concentrations equal to or greater than 16.80 mg / m l. The ethanol extract of *Trichoderma longibrachiatum* was highly effective at concentrations greater than or equal to 1.90 mg / m l. In ILD, *Trichoderma longibrachiatum* the filtrate of was effective at a concentration of 0.79 mg / m l, with 92.78% efficiency. We conclude that the filtered and ethanol extracts of fungi evaluated in this study have potential for alternative control of *Haemonchus contortus*.

Keywords: *Aspergillus terreus*. *Paecilomyces sp.*. *Trichoderma longibrachiatum*. Alternative Control. Sheep.

1 INTRODUÇÃO

A ovinocaprinocultura é uma atividade amplamente praticada em países tropicais e subtropicais, contribuindo para a produção sustentável de carne, leite e peles. Além de gerar renda para a agropecuária familiar, fornece produtos com proteínas de alto valor nutricional para populações de países em desenvolvimento. Em países desenvolvidos, é significativo o uso de tecnologias para aumentar a produção. A expansão desse setor no Brasil tem sido acompanhada pelo aprimoramento da qualidade genética dos rebanhos e pela tecnificação e visão empresarial da atividade. O interesse pela exploração de ovinos e caprinos é crescente por promover rápido retorno do capital investido (VIEIRA, 2003; NOGUEIRA; NOGUEIRA JUNIOR, 2005; CAMURÇA-VASCONCELOS, 2006; MOREIRA *et al.*, 2006)

Práticas sanitárias deficientes aumentam a ocorrência de infecção por nematódeos pertencentes à superfamília Trichostrongylidae. Esses parasitos prejudicam o desempenho e a lucratividade da ovinocultura, por acometer em animais de qualquer faixa etária ou sexo, por reduzirem o ganho de peso, a produção de leite e o desempenho reprodutivo dos animais e por aumentarem as taxas de mortalidade (GRAMINHA *et al.* 2001; BELATO *et al.*, 2006; BIZIMENYERA *et al.*, 2006; ALMEIDA, 2010). *Haemonchus contortus* é a principal espécie de helminto presente em ovinos, em função da hematofagia e por apresentar ciclo evolutivo direto e rápido, com fase de vida livre e parasitária, com elevada capacidade reprodutiva (Amarante; Sales, 2007).

O tratamento frequente com anti-helmínticos sintéticos é a principal medida de controle adotada pelos criadores. Essa estratégia é frequentemente empregada de forma pouco criteriosa, em intervalos curtos e sem orientação técnica, e têm promovido a rápida seleção de populações de helmintos resistentes (CHARLES, 1995; MELO, 2002; AMARANTE; AMARANTE, 2003). Tem se observado, nos últimos 20 anos, resistência dos parasitos às principais classes de anti-helmínticos nas criações de ovinos de muitos países, inviabilizando a criação dos animais (TAYLOR *et al.*, 2009). Dessa forma, a busca por outras medidas vêm sendo estudada com a

finalidade de diminuir a infecção dos animais e, conseqüentemente, a contaminação de seus produtos, do meio ambiente e do homem com resíduos químicos de anti-helmínticos

O conhecimento da epidemiologia das helmintoses é essencial para adoção de métodos de controle efetivo (ARAÚJO *et al.*, 2006). O controle biológico é uma alternativa para reduzir populações de parasitas com a utilização de antagonistas naturais (GRØNVOLD *et al.*, 1996). Estudos utilizando fungos como controle biológico, têm demonstrado que essa alternativa constitui método promissor no controle de nematódeos gastrointestinais (ARAUJO *et al.*, 2004). Porém, o desenvolvimento de formulações fúngicas economicamente viáveis e de fácil aplicação é um desafio na implementação da espécie fúngica em programas de controle biológico (CAMPOS, 2006).

Objetivou-se determinar *in vitro* a eficácia do filtrado e do extrato etanólico dos fungos *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum* na inibição da eclodibilidade e do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* provenientes de ovinos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados entre abril a junho de 2012 nos laboratórios de Parasitologia e Microscopia do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA/UFMG), localizados em Montes Claros, Norte de Minas Gerais, latitude 16°44'06``S e longitude 43°51'43``O.

2.1 Isolados de fungos do trato digestório de ruminantes

Os fungos *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum* foram isolados, respectivamente, da ampola retal de vaca, matriz ovina e borrego, criados em pastagens (FREITAS, 2012) e sequenciados no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Selecionou-se um isolado de cada gênero e para a preservação das culturas dos microrganismos foi utilizada a metodologia de Castellani (1939).

2.2 Obtenção de filtrados e extratos etanólicos

Para a obtenção dos filtrados e extratos etanólicos dos isolados 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), foram transferidos para Erlenmeyers contendo Sabouraud líquido, sem extrato de leveduras. Posteriormente foram incubados em *termo shaker* a 30° C e 150 rpm, durante sete dias. Após esse período, os cultivos foram filtrados duas vezes em papel *Whatman* n° 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 e a massa fúngica obtida foi congelada a -4 °C. Para os testes de inibição do desenvolvimento larval os cultivos foram triturados antes de serem filtrados

Para a obtenção dos extratos etanólicos utilizou-se a metodologia adaptada de Nery *et al.* (2010). Foram adicionados 100 mℓ de álcool etílico P.A. (99,5° GL.) para cada 50 gramas de massa fúngica. 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* n°1. 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, 1995).

2.3 Coleta de fezes e exames parasitológicos

Foram selecionados três ovinos machos, castrados e criados em baias da Fazenda Experimental do ICA/UFMG em Montes Claros, com monoinfecção de *Haemonchus contortus* e com valores superiores a 500 ovos por grama de fezes (OPG).

A infecção desses animais foi quantificada sendo Ueno e Gonçalves, (1998), pesando-se dois gramas de fezes coletadas diretamente da ampola do reto dos ovinos. 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 mesmas foram identificadas segundo chave de Keith (1953).

Os procedimentos foram realizados conforme os princípios éticos da experimentação animal, aprovados no protocolo 42/2008 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (ANEXO A).

2.4 Eficácia dos filtrados e extratos etanólicos na 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 descritas nas TAB. 1. Para o controle positivo, utilizou-se 15 mg/ml de fosfato de levamisol (Protall VP ®, Vallée, Minas Gerais, Brasil) e água destilada estéril como controle negativo. Nos experimentos foram empregados quatro repetições em delineamento inteiramente casualizado.

TABELA 1

Concentrações (mg/ml) do filtrado e extrato etanólico dos fungos *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum* na inibição da eclodibilidade.

<i>Aspergillus terreus</i>		<i>Paecilomyces</i> sp.		<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	
Filtrado	Extrato etanólico	Filtrado	Extrato etanólico	Filtrado	Extrato etanólico
1,00	17,31	1,96	8,40	0,59	1,90
2,00	34,62	3,92	16,80	1,17	3,81
3,01	51,93	5,89	25,19	1,76	5,71
4,02	69,25	7,85	33,59	2,35	7,62

Fonte: Da autora.

Os ovos do nematódeo foram recuperados conforme Bizimenyera *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, ressuspenderam-se os ovos 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, adicionou-se 100 µl de solução com aproximadamente 100 ovos e incorporou-se igual volume das soluções dos filtrados e extratos etanólicos, bem como os controles positivo ou negativo. 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 \pm 4°C para posterior quantificação e diferenciação de ovos blastomerados, 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:

$$\% \text{Eficácia} = 100 \times (1 - \text{larvas L1} / \text{número inicial de ovos}).$$

2.5 Eficácia dos filtrados sobre a inibição do desenvolvimento larval

O teste de inibição do desenvolvimento larval foi realizado segundo Nery *et al.* (2010) adaptado de Borges (2003). Os filtrados de *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma* spp foram utilizadas nas concentrações finais descritas na TAB. 2. Como controle positivo, usou-se 16 µg/ml de ivermectina (Ranger LA®, Vallée, MG, Brasil) e água destilada estéril como controle negativo. Foram realizados três experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

TABELA 2

Concentrações (mg/g de coprocultura) do filtrado dos fungos *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum* na inibição do desenvolvimento larval.

<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Paecilomyces</i> sp.	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
0,33	0,28	0,20
0,67	0,56	0,39
1,00	0,84	0,59
1,34	1,13	0,79

Fonte: Da autora.

Fezes frescas coletadas diretamente da ampola retal de ovinos foram transportadas imediatamente em caixas isotérmicas ao laboratório de Parasitologia Animal do ICA/UFMG. As amostras foram homogeneizadas e dois gramas foram distribuídos aleatoriamente em copos plásticos descartáveis.

Posteriormente, dois 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 adicionou-se 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, à 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 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, as larvas infectantes foram coletadas e armazenadas em tubos de ensaio contendo 1ml 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 = $100 - [(LDPG \text{ do grupo tratado} / LDPG \text{ do grupo controle negativo}) \times 100]$.

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 determinar as concentrações letais (CL) capazes de inibir 50% (CL_{50}) e 90% (CL_{90}) do desenvolvimento larval do nematódeo, empregou-se a análise de regressão *probit*, nesse mesmo programa estatístico.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 *Aspergillus terreus*

Para o filtrado do isolado de *Aspergillus terreus*, verificou-se 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%, que foi significativamente semelhante àquela verificada para o controle positivo contendo levamisol (TAB. 3). Para o extrato etanólico desse fungo, concentrações iguais ou superiores a 34,62 mg/mL promoveram eficácias superiores a 80,49%, similares estatisticamente ao controle positivo com o anti-helmíntico convencional (TAB. 4).

Fungos do gênero *Aspergillus* produzem diferentes metabólitos bioativos (TAKAHASHI; LUCAS, 2008; SURYANARAUANAN *et al.*, 2009). De acordo com Zuckerman *et al.* (1994), o filtrado de um isolado de *Aspergillus niger*, contendo ácido cítrico, ácido oxálico e moléculas indeterminadas maiores que 800MW como componentes nematocidas, apresentou eficácia na redução de populações do fitonematódeo *Rotylenchulus renjbrmis*, em estufa. Em outro estudo, as espécies *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans* apresentaram eficácia contra nematódeos juvenis de *Meloidogyne javanica*, no entanto a atividade nematocida foi aumentada quando filtrados de *A. niger* foram aplicados em conjunto com inoculantes de *Pseudomonas fluorescens* (SIDDIQUI *et al.*, 2004).

TABELA 3

Eficácia do filtrado de *Aspergillus terreus* sobre a eclodibilidade de ovos de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	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
Levamisol	28,75	43,75	0,00 ^a	100,00
Água estéril	0,25	0,00	74,75 ^c	-
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: Da autora.

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_{50} e CL_{90} 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 (GRAF. 1 e 2).

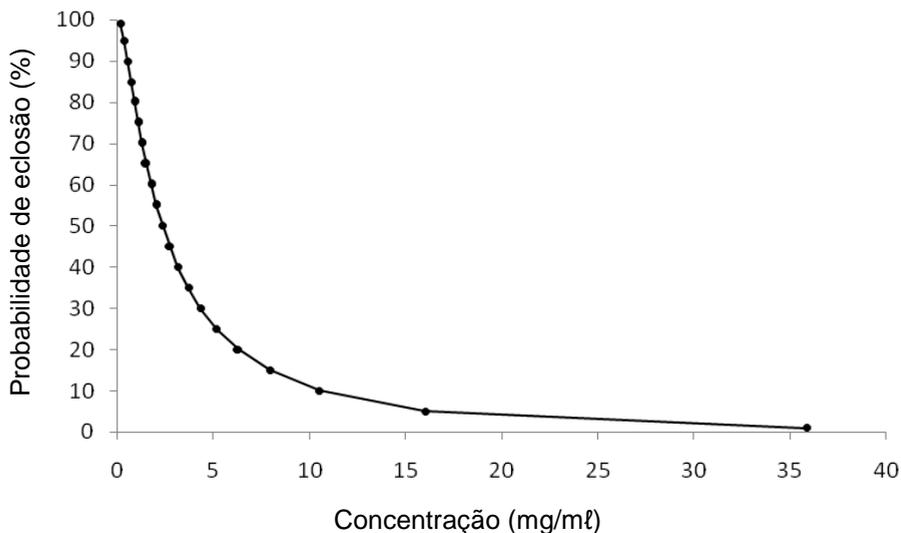


GRÁFICO 1 - Probabilidade de eclosão de larvas de *Haemonchus contortus* em função das concentrações do filtrado de *Aspergillus terreus*

Fonte: Da autora.

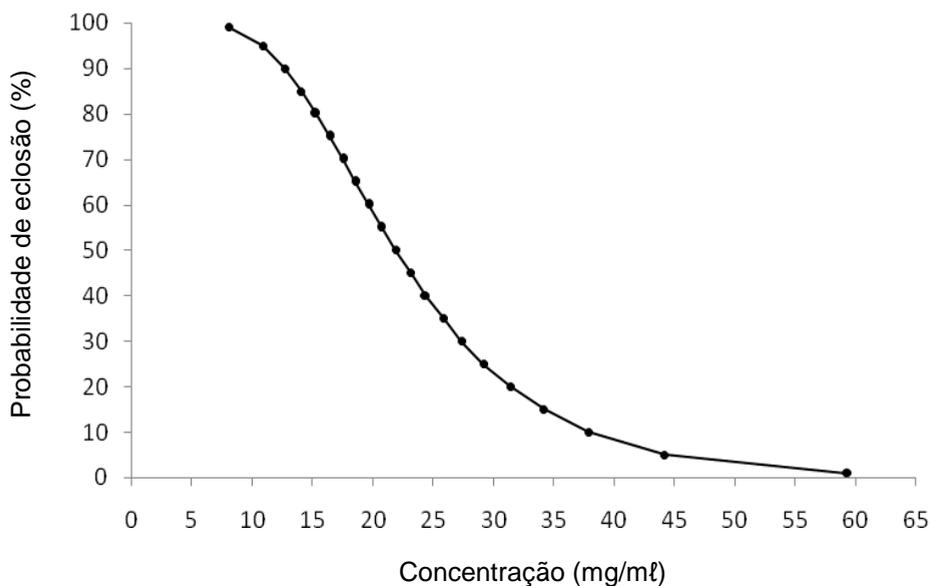


GRÁFICO 2 - Probabilidade de eclosão de larvas de *Haemonchus contortus* em função das concentrações do extrato etanólico de *Aspergillus terreus*

Fonte: Da autora.

TABELA 4

Eficácia de diferentes concentrações do extrato etanólico de *Aspergillus terreus* sobre a eclodibilidade de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	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	109,50	0,00 ^a	100,00
Levamisol	42,25	112,50	0,00 ^a	100,00
Água estéril	3,25	1,25	169,50 ^c	-
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: Da autora.

Nas coproculturas quantitativas, 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% (TAB. 5), demonstrando atividade sobre ovos e larvas do nematódeo, mesmo em material fecal.

TABELA 5

Eficácia do filtrado de *Aspergillus terreus* sobre o desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* 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	100,00
Água estéril	99,00 ^c	-
C.V.	5,65	

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: Da autora.

3.2 *Paecilomyces* sp.

Verificou-se eficácia de 100% para o filtrado de *Paecilomyces* sp. em todas as concentrações avaliadas no teste de inibição da eclodibilidade (TAB. 6). Concentrações iguais ou superiores a 1,96 mg/ml, foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo com Levamisol.

Para o extrato etanólico desse fungo, concentrações igual ou superiores a 16,80 mg/ml foram semelhantes ao controle positivo ($p < 0,05$), com eficácias de inibição da eclodibilidade superiores a 99% (TAB. 7).

TABELA 6

Eficácia do filtrado de *Paecilomyces* sp. sobre a eclodibilidade de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas (L1)	Eficácia (%)
1,96	142,00	8,50	0,00 ^a	100,00
3,92	130,00	4,25	0,00 ^a	100,00
5,89	126,25	4,25	0,00 ^a	100,00
7,85	116,75	6,50	0,00 ^a	100,00
Levamisol	97,50	39,50	0,00 ^a	100,00
Água estéril	12,75	18,00	86,00 ^b	-
C.V.			47,221	

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: Da autora.

TABELA 7

Eficácia do extrato etanólico de *Paecilomyces* sp.sobre a eclodibilidade de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas	Eficácia (%)
8,40	18,50	65,25	21,00 ^b	82,06
16,80	3,00	139,25	0,75 ^a	99,08
25,19	2,50	153,75	0,75 ^a	99,50
33,59	4,25	76,25	0,50 ^a	99,56
Levamisol	19,50	45,00	0,00 ^a	100,00
Água estéril	0,25	0,50	110,25 ^c	-
C.V.			27,27	

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

Fonte: Da autora.

As CL_{50} e CL_{90} obtidas na inibição da eclodibilidade utilizando extrato etanólico de *Paecilomyces* sp. foram 4,77 e 10,31 mg/mL, respectivamente (GRAF. 3).

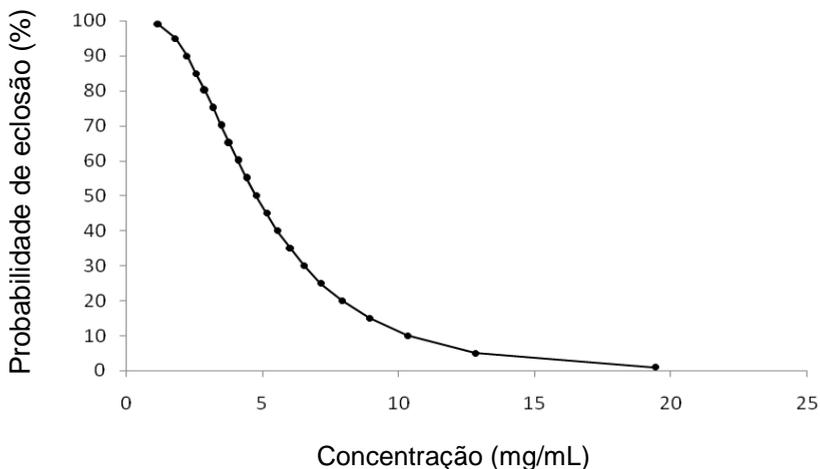


GRÁFICO 3 - Probabilidade de eclosão de larvas de *Haemonchus contortus* em função da concentração do extrato etanólico de *Paecilomyces* sp.

Fonte: Da autora.

Em coproculturas quantitativas, as médias de larvas infectantes verificadas para os tratamentos com o filtrado, nas concentrações avaliadas, foram estatisticamente semelhantes ao controle negativo (TAB. 8). As concentrações utilizadas nos tratamentos das coproculturas quantitativas foram menores que aquelas utilizadas no teste de inibição da eclodibilidade. Por isso, é necessária a realização de outros experimentos em concentrações maiores para verificação da eficácia no desenvolvimento larval.

Segundo Ferreira *et. al.* (2008) a espécie *P. lilacinus* é parasita de ovos e de fêmeas adultas de nematódeos e apresenta grande relevância no controle de fitonematódeos. Devrajan e Seenivrsan, (2002) observaram que *P. lilacinus* apresentou efeito tóxico aos fitonematódeos adultos do gênero *Meloidiayne*. Essa espécie fúngica também apresentou eficácia sobre ovos

de *Taenia saginata* em condições laboratoriais ao final de dez dias (BRAGA, 2008) e sobre ovos de *Toxocara canis*, após sete dias de tratamento (ARAÚJO, 1995). Dessa forma, sugere-se que fungos do gênero *Paecilomyces* possam ter efeito na inibição do desenvolvimento embrionário dos ovos (TAB. 6) e na inibição da eclodibilidade (TAB. 7).

TABELA 8

Eficácia do filtrado de *Paecilomyces* sp. sobre o desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* em coproculturas quantitativas.

Tratamentos (mg/g de coprocultura)	LDGP	Eficácia (%)
0,28	108,00 ^b	22,46
0,56	93,00 ^b	32,83
0,84	94,00 ^b	32,04
1,13	92,00 ^b	34,05
Levamisol	0,00 ^a	100,00
Água estéril	139,00 ^b	-
C.V.	5,47	

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: Da autora.

3.3 *Trichoderma longibrachiatum*

No teste de inibição da eclodibilidade o filtrado do isolado de *Trichoderma longibrachiatum* apresentou redução significativa na média de larvas L1 somente para a concentração 0,59 mg/ml, que foi significativamente inferior àquela verificada para o controle negativo (TAB. 9). Para o extrato etanólico, as eficácias de inibição da eclodibilidade, em todas as concentrações testadas, foram similares estatisticamente àsquelas verificadas para o controle positivo (TAB. 10).

TABELA 9

Eficácia do filtrado de *Trichoderma longibrachiatum* sobre a eclodibilidade de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas (L1)	Eficácia (%)
0,59	128,50	121,25	34,5 ^{bc}	87,86
1,17	9,50	16,75	93,25 ^{ab}	21,97
1,76	6,75	10,25	98,00 ^a	14,78
2,35	3,00	9,25	46,00 ^{ab}	21,03
Levamisol	262,00	4,50	0,00 ^c	100,00
Água estéril	2,00	0,75	332,75 ^a	-
C.V.			45,70	

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: Da autora.

Verificou-se redução ($p < 0,05$) das estruturas parasitárias (ovos e L1) no teste de inibição eclodibilidade para o filtrado de *Trichoderma longibrachiatum* com o aumento da concentração, o que pode ter influenciado no resultado do teste de eficácia. Sugere-se assim, que enzimas ou metabólitos do fungo poderiam ter ocasionado degradação nessas estruturas, destruindo-as completamente e inviabilizando a visualização microscópica.

TABELA 10

Eficácia do extrato etanólico de *Trichoderma longibrachiatum* sobre a eclodibilidade de *Haemonchus contortus*

Tratamentos (mg/ml)	Ovos Blastomerados	Ovos Larvados	Larvas (L1)	Eficácia (%)
1,90	23,25	12,75	0,00 ^a	100,00
3,81	9,50	3,50	0,00 ^a	100,00
5,71	16,25	11,00	0,25 ^a	99,22
7,62	30,5	21,25	2,25 ^a	96,33
Levamisol	50,75	10,25	0,00 ^a	100,00
Água estéril	0,75	0,00	48,75 ^b	-
C.V.			14,15	

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

Fonte: Da autora.

Nas coproculturas quantitativas, o filtrado de *Trichoderma longibrachiatum* promoveu redução ($p < 0,05$) da média de larvas infectantes para a concentração de 0,79 mg/g, com eficácia de 92,78%, diferindo estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos valores encontrados nos controles positivo e negativo (TAB. 11), demonstrando, mesmo em material fecal, atividade enzimática sobre ovos e larvas. Não foi possível estimar as CL_{50} e CL_{90} dos

experimentos com filtrado e extrato do fungo *Trichoderma longibrachiatum* pois não foi observada resposta dose-dependente.

TABELA 11

Eficácia do filtrado de *Trichoderma longibrachiatum* sobre o desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus* em coproculturas quantitativas.

Tratamentos (mg/g de coprocultura)	LDGP	Eficácia (%)
0,20	346,00 ^c	2,40
0,39	358,00 ^c	0,00
0,59	332,00 ^c	6,43
0,79	26,00 ^b	92,78
Levamisol	0,00 ^a	100,00
Água estéril	354,00 ^c	-
C.V.	3,66	

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. Coeficiente de variação (%).

Fonte: Da autora.

Para todos os experimentos com filtrado e extrato etanólico de *Aspergillus terreus*, *Paecilomyces* sp. e *Trichoderma longibrachiatum*, verificou-se indicativo da ação dos metabólitos fúngicos sobre os ovos, embriões e larvas de *Haemonchus contortus*. Os controles apresentaram desenvolvimento larval normal, e para todos os tratamentos analisados foram observadas ovos e larvas L1 com deformidades estruturais, como as evidenciadas nas FIG. 1 e 2.

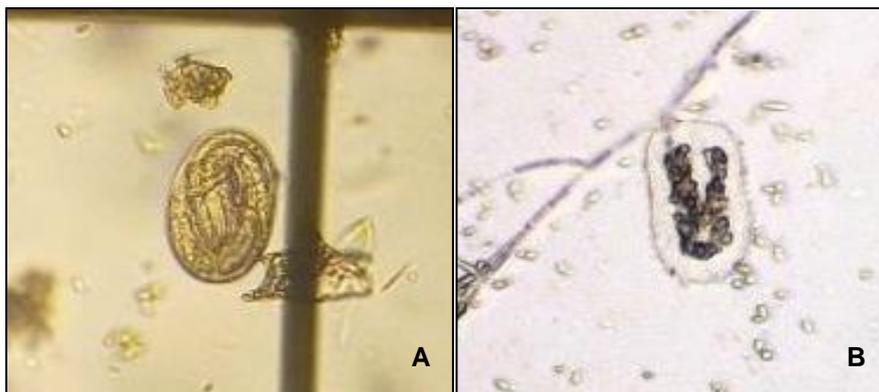


FIGURA 1: Ovo larvado de *Haemonchus contortus* A: Ovo com aspecto normal de desenvolvimento, proveniente do controle negativo com água estéril; B: Ovo com alteração morfológica da casca e do embrião, proveniente do tratamento com filtrado de *Paecilomyces* sp. (Objetiva de 10x).

Fonte: Da autora.



FIGURA 2: A: Larva de primeiro estágio de *Haemonchus contortus* A: L1 com aspecto normal de desenvolvimento, proveniente do controle negativo com água estéril; B: L1 com alteração morfológica, proveniente do tratamento com filtrado de *Aspergillus terreus*; C: L1 com alteração morfológica, proveniente do tratamento com o extrato etanólico de *Paecilomyces* sp.; D: L1 com alteração morfológica, proveniente do tratamento com o filtrado de *Trichoderma longibrachiatum* (Objetiva de 10x).

Fonte: Da autora.

Algumas espécies de fungos podem destruir nematódeos com a ação de toxinas (NORDBRING-HERTZ, 1988) e outras podem produzir metabólitos com efeitos ovicidas (WALLER; FAEDO, 1993). Fungos nematófagos podem penetrar a quitina da cutícula das larvas de nematódeos, pois possuem diversas enzimas extracelulares, como proteases, quitinases e colagenases, envolvidas diretamente no processo de infecção do nematódeo (GRYNDLER *et al.*, 2003). Segundo Braga *et al.* (2011), o fungo *Pochonia clamydosporia* produz uma protease que destrói os ovos de fitonematoides e de *Ancylostoma* sp.

Esses metabólitos e enzimas com ação ovicida e larvicida também já foram identificados em fungos do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma*. A espécie *Aspergillus niger* produz ácido cítrico, quimiosina, lipase, protease e α -amilase (BENNETT *et al.*, 1998; JIANG; NA, 2000; MEYER, 2008). Segundo De Marco *et al.* (2000), fungos do gênero *Trichoderma*, são produtores de proteases, hidrolases, quitinases, exoglucanases e endoglucanases do tipo β - glucanases (β -1,3 e β -1,6), e celulases (β -1,4- D-glucosidases), substâncias que apresentam importante atividade enzimática no biocontrole.

A relação de bioprodutos comercializados para o controle de agentes patogênicos causadores de doenças em plantas da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2012), encontram-se três bioprodutos à base de *Aspergillus flavus* para o controle de fungos, 11 a base de *Paecilomyces* sp. para o controle de nematódeos e 55 a base de *Trichoderma longibrachiatum* para o controle de fungos e bactérias (EMBRAPA, 2012).

Segundo a classificação do índice de eficácia anti-helmíntica proposta pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, o produto é altamente efetivo se apresenta mais de 90% de eficácia antiparasitária, moderadamente eficaz quando atua entre 80 a 90%, pouco eficiente entre 60 e 80% e ineficaz em níveis abaixo de 60% (POWERS *et al.*, 1982). Assim, na inibição da eclodibilidade, o *Aspergillus terreus* apresentou elevada eficácia em concentrações iguais ou superiores a 34,32 mg/ml, do extrato etanólico. Já o isolado de *Paecilomyces* sp. apresentou-se altamente eficaz para todas as concentrações do filtrado, e nas concentrações iguais ou superiores a 16,80 mg/ml do extrato etanólico. O *Trichoderma longibrachiatum* mostrou-se altamente eficaz nas concentrações iguais ou superiores a 1,90 mg/ml do extrato etanólico para a inibição da eclodibilidade, e a concentração 0,79 mg/ml do filtrado foi efetiva para a inibição do desenvolvimento larval.

Os resultados demonstram que mesmo em baixas concentrações, os fungos testados foram eficazes, sugerindo a presença de enzimas e metabólitos nos filtrados e extratos etanólico dos três fungos avaliados, que poderiam dissolver e enfraquecer a cutícula de nematódeos. Entretanto,

futuras pesquisas são necessárias para selecionar linhagens com maiores potencialidades para o biocontrole de parasitos (GRAMINHA *et al.*, 2005) e para caracterizar as substâncias bioativas presentes (STONE *et al.*, 2000). Torna-se necessário também a realização de testes de toxicidade e de eficácia *in vivo*, para indicar a melhor forma de utilização desses fungos no controle alternativo das verminoses.

4 CONCLUSÃO

O isolado de *Aspergillus terreus*, nas concentrações iguais ou superiores a 34,32 mg/ml do extrato etanólico, o isolado de *Paecilomyces* sp. em todas as concentrações do filtrado e em concentrações iguais ou superiores a 16,8 mg/ml do extrato etanólico e o isolado de *Trichoderma longibrachiatum* nas concentrações iguais ou superiores a 1,90 mg/ml do extrato etanólico apresentam eficácia na inibição da eclodibilidade iguais ou superiores a 90%. Na inibição do desenvolvimento larval de *Haemonchus contortus*, o isolado de *Trichoderma longibrachiatum* apresentou 92,78% de eficácia na concentração 0,79 mg/ml do filtrado. Conclui-se assim que os fungos testados apresentam grande potencial como alternativas de controle do nematódeo, representando novas alternativas e perspectiva para o controle e tratamento da haemoncose ovina.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C., TEIXEIRA, L. M., DUARTE, E. R., MORAIS, G. de, SILVA, B. C. M., GERASEEV, L. C. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no Norte de Minas Gerais. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 161-166, 2010.
- AMARANTE, A. F. T.; AMARANTE, M. R. V. Breeding sheep for resistance to 68 nematode infections. **Journal Animal Veterinary Advances**, v. 2, n. 1, p. 147-161, 2003.
- AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A.; ROCHA, R. A.; GENNARI, S. M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 91-106, 2004.
- 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.
- AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 15. ed. Washington: AOAC, 1990.
- ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A. Evaluation of the efficacy of endoparasitic fungi isolates on infective larvae of *Haemonchus placei*. **Ciência Animal**, v. 11, n. 2, p. 131-132, 2001.
- ARAÚJO, J. V.; RIBEIRO, R. R. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 2, p. 76-81, 2003.
- 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, 2004.
- ARNOLD, A. E.; MAYANARD, Z.; GILBERT, G. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Aretropical fungal endophytes hyperdiverse? **Ecology Letters**, v. 3, n. 1, p. 267-274, 2000.
- ARENALES, M. C.; ROSSI, F. **Sistema orgânico de criação de cabras**. Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 2000. 122 p

BELLATO, V.; SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; SILVA, A. V. D. B.; HENSCHER, G. S. Cultivo de larvas de nematoides gastrintestinais de ovinos em substratos de serragem de *Pinus taeda*, *P. elliottii* e *Araucaria angustifolia*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 4, p. 199-202, 2006.

BENNET, J. W. Mycotechnology: the role off ungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 101-107, 1998.

BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B.; PINTO, Z. V.; PAULA JUNIOR, T. J. de; CORREA, E. B.; MOURA, A. B.; LUCON, C. M. M.; COSTA, J. de C. do B.; BEZERRA, J. L. Bioprotetores comerciais para o controle de doenças de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 17, n. 1, p. 111-147, 2009.

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.

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) **Parasitologia Latino-americana**, v. 58, n. 3/4, p. 142-147, 2003.

BRAGA, G. C. **Productivity *Agaricus blazei* Murril in relation to the cultivation environment, the substratmass and the casing layer**. 1999. 73f. Tese (Doutorado Faculdade de Ciências Agrônômicas). UNESP. Botucatu. 1999.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, 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, n. 6, p. 686-688, 2008.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R. E.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SOARES, E. F.; QUEIROZ, J. H.; GÊNIER, H. J. 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, n. 1, p. 116-118, 2011.

BRUGGEMANN, R.; ORLANDI, J. M.; BENATI, F. J.; FACCIN, L. C. ; MANTOVANI, M. S.; NOZAWA, C. LINHARES, R. E. C. Antiviral activity of *Agaricus blazei* Murrill ss. Heine extract against human and bovine herpesviruses in cell culture. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 561-565, 2006.

BIZIMENYERA, E. S.; GITHIORI, J. B.; ELOFF, J. N.; SWAN, G. E. *In vitro* activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 1, p. 336-343, 2006.

CAMPOS, A. K. **Fungos nematófagos no controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes**. 2006. 138f. Tese (Doutorado em Ciências: Área de Concentração Helmintologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Croton zehntneri* sobre nematoides gastrintestinais de ovinos**. 2006. 83 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2006.

CARNEIRO, R. M. D. G. Princípios e tendências do controle biológico de nematoides com fungos nematófagos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n.1, p. 113-121, 1992.

CASTELLANI, A. A Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 1, p. 181-184, 1967.

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

CHARLES, T. P. Disponibilidade de larvas infectantes de nematódeos gastrointestinais parasitas de ovinos deslançados no semiárido pernambucano. **Ciência Rural**, v. 25, n. 1, p. 437-442, 1995.

COLES, G.C. Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? **Veterinary Research**, v. 33, n. 1, p. 481- 489, 2002.

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; TAYLOR, M. A.; VERCRUYSSSE, J. The detection of anthelmintic resistente in nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 167-185, 2006.

CONCEIÇÃO, L.F.; VIEIRA, P.M.; KOSHIYAMA, M.H.; OLIVEIRA, N.G.; LOURENÇO, M.L.G.; TORRES, M.L.M. Tratamento da aspergilose nasal com o uso não invasivo de clotrimazol tópico associado a itraconazol sistêmico em cão. **Anais... In: do 5º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais**. São Paulo, SP, p.117, 2005.

CROCCIA, C. **Efeito da dieta à base de biomassa de cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murrill) no parênquima pulmonar de ratos wistar submetidos a estímulo carcinogênico pela nitrosamina 4-**

metilnitrosamina-1-3pyridil-1butanona (NNK). 2010. 112f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas). UERJ, Rio de Janeiro, 2010.

CUNNIFF, P. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16. ed. Washington: AOAC, 1995. 2000 p.

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 pernicioso*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 383-386, 2000.

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

DIAS, E. S.; LABORY, C. R. G.; SILVA, R. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. Lavras: FAEPE-UFLA, 2002. 50 p.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeitos dos cogumelos *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* na interação entre plantas de tomate e *Xanthomonas vesicatoria*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 30, n. 1, p. 57-62, 2004.

DUARTE, M. **Atividade anti-Trichomonas vaginalis de moléculas produzidas por basidiomicetos**. 2011. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UFRGS, Porto Alegre, 2011.

DUARTE, E. R.; SILVA, R. B.; VASCONCELOS, V. O. NOGUEIRA, F. A. OLIVEIRA, J. F. Diagnóstico do controle e perfil de sensibilidade de nematódeos de ovinos ao alendazol e ao levamisol no norte de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 147-152, 2012.

DUNN, M. T.; SAYRE, R. M.; CARRELL, A.; WERGIN, W. P. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. **Scanning Electron Microscopy**, v. 3, n. 1, p. 1351-1357, 1982.

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, n. 1, p. 218-225, 2005.

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

ELAD, Y.; KIRSHNER, B. Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and populations of the plant pathogen *Botrytis cinerea* as modified by abiotic conditions. **Phytoparasitica**, v. 21, n. 1, p. 303-313, 1993.

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. 2011.

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

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Top production – Hongos y trufas – 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 16 set. 2010.

FARIA, M. R.; TIGANO, M. S. **Coleção de fungos entomopatogênicos do Cenargen**. Brasília, DF: Embrapa, Serviço de Produção e Informação, 1996. 76 p.

FARIAS, M. T.; BORDIN, E. L.; FORBES, A. B.; NEWCOMB, K. A survey on resistance to anthelmintic in sheep stud farms of southern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 209-214, 1997.

FAROUK, Z. Parasitismo em pequenos ruminantes. **Bahia Agrícola**, v. 6, n. 3, p. 17-19, 2004.

FERNANDES, L. H.; SENO, M. C. Z.; AMARANTE, A. F. T.; SOUZA, H.; BELLUZO, C. E. C. Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 6, p. 733-740, 2004.

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, n. 13, p. 15-21, 2008.

FERRARA, M. A. Fungos Endofíticos: Potencial para a Produção de Substâncias Bioativas. **Revista Fitos**, v. 2, n. 1, p.73-79, 2006.

FLEURI, L. F.; KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Production, purification and application of extracellular chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 623-630, 2009.

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.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone.,1997. 686 p.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. São Paulo: Ícone, 2004. 282-296 p.

FORTES, R. C.; NOVAEZ, M. R. C. G. Effects of dietary supplementation with Agaricales mushrooms and other medicinal fungus on therapy against the câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 363-371, 2006.

FREITAS, C. E. S, ABRÃO, F. O., SILVA, K. L. da, ALMEIDA, P. N. M. de, DUARTE, E. R. Fungos aeróbios no intestino grosso de borregos e de ovelhas criados em pastagens tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 225-227, 2012.

FURTADO, S. K. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 125 f. Tese (Doutorado em Agronomia, Produção Vegetal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GENNARI, S. M.; AMARANTE, A. F. T. Helminhos de ovinos e caprinos. **O Biológico**, v. 67, n. 1/2, p. 13-17, 2006.

GIROTTI, M. J.; AQUINO, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M. F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematoides parasitas: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 1, n. 10, 2008. Disponível em: <<http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL64.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2011.

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, E. B. N.; MONTEIRO, A. C.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J.; Controle de nematódeos parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 9, p. 927-933, 2005.

GRYNDLER, M.; JANSÁ, J.; HRSELOVÁ, H.; CHVÁTALOVÁ, L.; VOSÁTKA, M. Chitin stimulates development and sporulation of arbuscular mycorrhizal fungi. **Applied Soil Ecology**, v. 22, n. 1, p. 283-287, 2003.

GRØNVOLD, 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, p. 47-64, 1996.

GUO, B., WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 136-142, 2008.

IDENE – Instituto de Desenvolvimento do Norte e Nordeste de Minas Gerais. Projeto Ovinos Gerais. 2011. Disponível em: <<http://minassistemas.com.br/idene/site.php?id=646>>. Acesso em: 02 maio 2012.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Pesquisa Pecuária Municipal 2011. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf>. Acesso em: 10 nov. de 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/horti/default.asp?t=2&z=t&o=19&u1=1&u2=1&u3=1>>. Acesso em: 17 set. 2012.

JANSSON, H. B.; TUNLID, A.; NORDBRING-HERTZ, B. **Biological control: Nematodes**. (Ed) In: ANKE, T. Ed. Fungal Biotechnology. Weinheim: Chapman and Hall, p. 38-50, 1997.

JIANG, Z. D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches, **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, n. 1, p. 245-72, 2000.

KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, v. 1, n. 2, p. 223-235, 1953.

KRYCHAK-FURTADO, S.; NEGRELLE, R. B.; MIGUEL, O. G.; ZANIOLO, S. R.; KAPRONEZAI, J.; RAMOS, S. J.; SOTELLO, A. Efeito de *Carica papaya L.* (caricaceae) e *Musa paradisiaca* linn. (musaceae) sobre o desenvolvimento de ovos de Nematódeos gastrintestinais de ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 2, p. 191-97, 2005.

KRYCHAK-FURTADO, S. **Alternativas fitoterápicas para o controle da verminose ovina no estado do Paraná: testes *in vitro* e *in vivo***. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Departamento de fitotecnia e fitossanitarismo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LACAZ, C.S.; PORTO, E., MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI E.; MELO, N. T. **Tratado de micologia médica**. 9. ed. Ed. Sarvier, São Paulo, 2002.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S. A.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasite nematodes. **Journal of Helminthology**, London, v. 66, n. 1, p. 137-141, 1992.

LARSEN, T.; YUEN, D.; MALEVSKY, A. Dynamical consequences on fast subducting slabs from a self-regulating mechanism due to viscous heating in variable viscosity convection. **Geophysical Research Letters**, v. 22, n. 10, p. 1277-1280, 1995.

LEITE, E. Ovinocaprinocultura no Nordeste: organização e crescimento. 2000. Disponível em: <<http://www23.sede.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf/b1bbbc852ee1057183256800005ca0ab/dde186b38a693506832569030061ee63?OpenDocument>>. Acesso em: 11 de março de 2011.

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.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L. Resistência anti-helmíntica em nematoides de pequenos ruminantes: uma revisão. **Ciência Animal**, v. 12, n. 1, p. 35-45, 2002.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, F. A. M.; MELO, L. M. Nematoides resistentes a anti-helmínticos em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 339-344, 2003.

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends, **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 177-85, 2008.

MILNER, R.J. Current status of *Metarhizium* a mycoinsecticide in Australia. **Biocontrol News and Information**, v. 21, n.1, 47-50, 2000.

MONTEIRO, C. S.; KALLUF, V.; PENTEADO, P. T. O. S.; WASZCZYNSKYJ, N.; FREITAS, R. J. S.; STERTZ, S. C. Caracterização química do cogumelo *Agaricus blazei* murril. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 1, p. 7-13, 2005.

MOTA, M. A.; BEVILAQUA, C. M. L.; ARAÚJO, J. V. Atividade predatória de fungos *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* de caprinos. **Ciência Animal**, v. 10, n.1, p. 37-41, 2000.

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.

MOREIRA, P. R. R.; SOUZA, W. M.; SOUZA, N. T. M.; CÔRREA, C. N. Estudo anatômico das valvas semilunares, aórtica e pulmonar no ovino (*Ovis aries* – Linnaeus, 1758). **ARS Veterinária**, v. 22, n. 2, P. 80-85, 2006.

MUKHTAR, T.; PERVAZ, I. *In vitro* evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamydosporium* against *Meloidogyne javanica*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 5, n.1, p.

576-579, 2003.

NERY, P. S.; NOGEIRA, F. A.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R. Effects of *Anacardium humile* leaf extracts on the development of gastrointestinal nematode larvae of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 171, n. 3/4, p. 361-364, 2010.

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

NORDBRING-HERTZ, B. Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. **Microbiological sciences**, v. 5, n. 4, p. 108-16, 1988.

NUNES, A. P.; BERNE, M. E. A.; OLIVEIRA, A. C.; BORBA, M. F. S.; VAZ, C. M. S. L. Avaliação da resistência a endoparasitos em cordeiros da raça crioula lanada. **Anais...** In: Seminário Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 11., 1999, Salvador.

NUNES, H. T. **Agentes microbianos no controle de nematoides e fungos fitopatogênicos de soja e sua compatibilidade com agroquímicos**. 2008. 77f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista. São Paulo. Jaboticabal. 2008.

PADILHA, T. Atividade de fungos nematófagos nos estágios pré-parasitários de nematódeos trichostrongilídeos. **Ciência Rural**, v. 26, n. 2, p. 333-341, 1996.

PAPAVIZAS, G. C.; DUNN, M. T.; LWIS, L. A.; BEAGLE-RISLAINO, J. Liquid Fermentation technology for experimental production of bio-control fungi. **Phytopathology**, v. 74, n. 1, p. 1171-1175, 1984.

PAPAVIZAS, G. C. Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, v. 23, n. 1, p. 23-54, 1985.

POWERS, K. G.; WOOD, I. B.; ECKERT, J.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 1, p. 265-284, 1982.

QUANG, D. N.; HASHIMOTO, T.; ASAKAWA, Y. inedible mushrooms: a good source of biologically active substances. **The Chemical Record**, v. 6, p. 79-99, 2006.

Quinn, P. J.; Carter, M.E.; Markey, B.K.; Carter, G.R. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe Publishing; 1994.

REIS, F. A. **Atualidades na criação de ovinos no Brasil Central**. 2011. Disponível em: <<http://www.sheepembryo.com.br/files/artigos/171.pdf>> Acesso em: 24 maio 2011.

RIBEIRO, T. S. **Análise comparativa da secreção de proteases e quitinases do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* na presença de diferentes cutículas de artrópodes**. 2006. 71f. Tese (Biologia Celular e Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

RICHARDSON, M. D.; D. W. WARNOCK. **Fungal Infection Diagnosis and Management**, 3. ed. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd. 2003.

RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. Parasitoses por nematódeos gastrintestinais em bovinos. In: RIET-CORREA, F. (Org.); SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Livraria Varela, v. 2, cap. 1, p. 89-105, 2001.

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

SAMSON, R.A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? **Medical Mycology**, v. 47, n. 1, p. 13-20, 2009.

SANGSTER, N. C. Managing parasiticide resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 89-109, 2001.

SEBRAE, FAEMG, EMATER. Análise da Ovinocaprinocultura no Norte e Nordeste de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2004. Disponível em: <http://www.sebraemg.com.br/arquivos/Coopere_para_crescer/geor/diagnostico/ovino-caprinocultura.pdf> Acesso em: 06 abr. 2011.

SEBRAE. Informações de mercado sobre caprinos e ovinos relatório completo - Análise Mercadológica – Ovinocaprinocultura. 2005. Disponível em: <http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/mercado_cap_ov_sebrae.pdf> Acesso em: 06 abr. 2011.

SHAH, P. A.; PELL, J. K. Entomopathogenic fungi as biological control agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 1, p. 413-423, 2003.

SHARMA. K.; BARI, S.S.; SINGH, H.P. Biotransformation of tea catechins into theaflavins with immobilized polyphenol oxidase. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 56, n. 4, p. 253-258, 2009.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A. A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 91, n. 1, p. 687-693, 2001.

SIDDIQUI, I. A.; SHAUKAT, S. S.; KHAN, A. Differential impact of some *Aspergillus* species on *Meloidogyne javanica* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. **Letters in Applied Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 74-83, 2004.

SILVA, P N. **Eficácia anti-helmíntica de extratos vegetais para o controle da helmintose ovina no Norte de Minas Gerais**. 2007. Dissertação (Mestrado em Agroecologia, Produção Animal), UFMG, Montes Claros, 2007.

SILVA, R. B. **Eficácia anti-helmíntica do levamisol e albendazol em ovinos criados no Norte de Minas Gerais**. 2010. Monografia (Zootecnia), UFMG, Montes Claros, 2010.

SPIEGEL, Y.; CHET, L. Evaluation of *Trichoderma longibrachiatum* as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant-parasitic nematodes in Israel. **Integrated Pest Management Reviews**, v.3, n. 1, p. 169-175, 1998.

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

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

STONE, J. K.; BACON, C. W.; WHITE, J. F. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: C.W. BACON; J.F. WHITE (Ed.) **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, p. 3-30, 2000.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 1, p. 535-544, 2003.

STROBEL, G. A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 1, p. 491-502, 2003.

SURYNARAYANAN, T. S; THIRUNAVUKKARASU, N; GOVINDARAJULO, M. B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURRALI, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 9-19, 2009.

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

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **The Royal Society of Chemistry**, v. 18, n.1, p. 448-459, 2001.

TAYLOR, M. A.; LEARMOUNT, J.; LUNN, E.; MORGAN, C.; CRAIG, B. H. Multiple resistance to anthelmintics in sheep nematodes and comparison of

methods used for their detection. **Small Ruminant Research**, v. 86, n. 1, p. 67–70, 2009.

UENO, H. **Cultivo quantitativo de larvas de nematódeos gastrintestinais de ruminantes com tentativa para pré-diagnóstico**. Salvador: Japan International Cooperation Agency, 1995. 138 p.

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

URBEN, A. F.; OLIVEIRA, C. Cogumelos comestíveis: utilização e fontes energéticas. **Anais...** In: REVISÃO ANUAL DE PATOLOGIA DE PLANTAS, 1998, Passo Fundo. Passo Fundo: v. 6, [s.n.], p. 173-196, 1998.

URBEN, A. F. Morphological and physiological characterization of both *Agaricus blazei* Murril and *Agaricus sylvaticus* Schaeffer accessions. **Anais...** In: THE 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON JUNCAO INDUSTRY DEVELOPMENT & THE 6TH CHINA JUNCAO TECHNOLOGY POVERTY ALLEVIATION SYMPOSIUM. Proceedings...Yinchuan- China, 2005.

VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; OLIVEIRA, J. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; LETE, J. P. V.; SANTORO, M. M.; RÉGIS, W. C. B.; TAVARES, C. A. P.; COELHO, E. A. F. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2011.

Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Bath, G.F. Rampant Anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? **Anais...** In: Van Wyk, J.A., Van Schalkwyk, P.C. (eds.). Managing Anthelmintic Resistance in Endoparasites. Workshop, 16th International Conference of the WAAVP, Sun City, South Africa, p. 51–63, 1997.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos no Estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 99-103, 1999.

VIEIRA, L. S. **Alternativas de controle da verminose gastrintestinal dos pequenos ruminantes**. Sobral: Embrapa CNPC, 2003.

VIEIRA, L. S. **Endoparasitoses gastrintestinais em caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa CNPC, 2005.

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

WALLER, P. J., ECHEVARRIA, F., EDDI, C., MACIEL, S., NARI, A., HANSEN, J. W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode

parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. **Veterinary Parasitology**, v. 62, n. 1, p. 181- 187, 1996.

WALLER, P.J.; LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 23, n. 1, p. 539-546, 1993.

WALLER, P. J. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 155-164, 1999.

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, P. J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: screening studies. **Veterinary Parasitology**, v. 49, n.1, p. 285-297, 1993.

WALLER, P. J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENESSY, D. R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: "in vitro" and "in vivo" studies. **Veterinary Parasitology**, v. 51, n.1, p. 289-299, 1994.

WANG, S.L.; CHEN, Y.S.; WANG, C.L.; YEN, Y.H.; CHERN, M.K. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n.1, p. 660-665, 2005.

WONG, C. K.; LEUNG, K. N.; FUNG, K. P. Immunomodulatory and anti-tumor polysaccharides from medicinal plants. **Journal of International Medicinal Research**, v. 22, n. 6, p. 299-312, 1994.

WASSER, S. P.; DIDUKH, M. Y.; AMAZONAS, M. A. L. de; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun agaricus (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 4, n. 1, p. 267-290, 2002.

ZUCKERMAN, B. M.; MATHENY, M.; ACOST, N. Control of plant-parasitic nematodes by a nematocidal strain of *Aspergillus niger*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 1, p. 33-43, 1994.

**ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 42/2008**, relativo ao projeto intitulado "***Epidemiologia e controle alternativo da helmintose ovina no norte mineiro com extratos de plantas e de fungos: experimentos (in vivo)***", que tem como responsável(is) **Eduardo Robson Duarte**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/09/2008**.

Este certificado expira-se em **10/09/2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 42/2008**, related to the project entitled "***Epidemiology and alternative control of ovine helminthosis in the north of Minas Gerais with extracts of plants and fungi***", under the supervisors of **Eduardo Robson Duarte**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 10, 2008**.

This certificate expires in **September 10, 2013**.

Belo Horizonte, 15 de Setembro de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br