

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* COM FUNGOS
NEMATÓFAGOS SOBRE ESTRONGILÍDEOS (*Strongilydae*) DE
LHAMAS (*Lama glama*) PROVENIENTES DO ZOOLOGICO DE
MARECHAL FLORIANO, ESPÍRITO SANTO**

MARIA GORETT RAMOS RODRIGUES

**VILA VELHA
MARÇO – 2016**

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* COM FUNGOS
NEMATÓFAGOS SOBRE ESTRONGILÍDEOS (*Strongilydae*) DE
LHAMAS (*Lama glama*) PROVENIENTES DO ZOOLOGICO DE
MARECHAL FLORIANO, ESPÍRITO SANTO**

Dissertação apresentada à
Universidade de Vila Velha,
como pré-requisito do Programa
de Pós-graduação em Ciência
Animal, para obtenção do grau
de Mestre em Ciência Animal.

MARIA GORETT RAMOS RODRIGUES

**VILA VELHA
MARÇO - 2016**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

R696c Rodrigues, Maria Gorett Ramos.
Controle biológico in vitro com fungos nematófagos sobre
estrongilídeos (strongilydae) de lhamas (lama glama)
provenientes do zoológico de Marechal Floriano, Espírito Santo /
Maria Gorett Ramos Rodrigues – 2016.
28 f.: il.
Orientador: Fabio Ribeiro Braga.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal)
Universidade Vila Velha, 2016.
Inclui bibliografias.

1. Fungos. 2. Fungos - Controle biológico. I. Braga, Fabio
Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 579.5

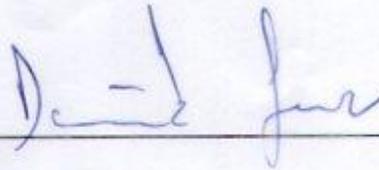
MARIA GORETT RAMOS RODRIGUES

**CONTROLE BIOLÓGICO *IN VITRO* COM FUNGOS
NEMATÓFAGOS SOBRE ESTRONGILÍDEOS (*Strongilydae*) DE
LHAMAS (*Lama glama*) PROVENIENTES DO ZOOLOGICO DE
MARECHAL FLORIANO-ES**

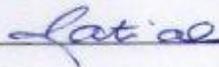
Dissertação apresentada à Universidade de Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para obtenção do grau de mestrado em Ciência Animal.

Aprovada em 23 de março de 2016,

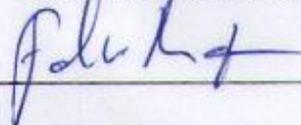
Banca Examinadora:



Prof. Pós Dsc. Dominik Lenz (UVV)



Dra. Tatiana de Sousa Barbosa (UVV)



Prof. Pos Dsc. Fabio Ribeiro Braga (UVV)

(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e pela oportunidade de poder obter conhecimento e de vivenciar este momento ímpar;

Aos meus pais, pelos valores ensinados, por terem me proporcionado condições de estudo, pelo amor incondicional;

Ao meu marido, pela paciência, pelos momentos que não pude estar presente, pelo apoio, pelo companheirismo e incentivo;

Aos professores João Rossi e Flaviana Lima por ter possibilitado o acesso a este Mestrado;

Ao meu orientador, professor Pos Dcs Fábio Ribeiro Braga, por ter acreditado em mim, por tornar possível este projeto, pela orientação, por compartilhar seu conhecimento, meu muito obrigada;

A Emy Hiura, pelo apoio, pelas horas dispensadas em laboratório para me orientar;

Ao Fábio Senna, pelas palavras de incentivo e disposição para repartir seu saber;

A minha amiga Sheila Moreira de Mendonça, pelos risos e descontração nos meus momentos de estresse;

A FAPES, pela concessão da bolsa, da qual foi possível a realização deste Mestrado;

A Universidade de Vila Velha, por oportunizar o estudo;

Ao Laboratório de Parasitologia da Universidade de Vila Velha, que proporcionou condições e materiais essenciais para análise das amostras coletadas;

Ao Zoológico Zoo Park da Montanha, em especial ao Sr. Romeu Vieira Nunes, por permitir que a pesquisa fosse realizada naquele ambiente;

A Cecília Aguiar e Noemi Schwambach, pela ajuda nas coletas de material;

A minha Elizete Colla, pelo “abrigo” durante o período do Mestrado;

E por fim, agradeço às minhas amadas lhamas, parte importante desse estudo.

“Comece fazendo o necessário, depois o que é possível e
de repente você estará fazendo o impossível”.

São Francisco de Assis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média e desvios padrão da contagem diária de larvas infectantes (L3) de Nematoides de Lhamas nas placas de petri dos grupos tratados com os fungos <i>Duddingtonia flagrans</i> (AC001 e CG768), <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34), <i>Monacrosporium sinense</i> (SF53), <i>Arthrobotrys robusta</i> (I31) e <i>Arthrobotrys conoides</i> (I40) e grupo controle, após sete dias de interação	16
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Armadilha produzida por fungos nematófagos; larva de terceiro estágio de nematoide parasito gastrintestinal de Lhamas e L3 de nematoide parasito gastrintestinal de Lhamas capturado pelo fungo 14
- Figura 2 Percentual médio da recuperação de (L3) nas placas de petri dos grupos tratados e do controle ao final de 7 dias 15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ágar-água

AC001 – Isolado fúngico *Duddingtonia flagrans*

BOD – Câmara incubadora

CG768– Isolado fúngico *Duddingtonia flagrans*

CMA – Corn-meal-ágar

I31 – Isolado fúngico *Arthrobotrys robusta*

I40 – Isolado fúngico *Arthrobotrys conoides*

L3 – Larvas infectantes em terceiro estágio

NF34 – Isolado fúngico *Monacrosporium sinense*

SF53 – Isolado fúngico *Monacrosporium thaumasium*

RESUMO

RODRIGUES, M. G. R.; M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, março de 2016.

Controle biológico *in vitro* com fungos nematófagos sobre estrongilídeos (Strongilydae) de lhamas (*Lama glama*) provenientes do zoológico de Marechal Floriano-ES. Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

As lhamas são mamíferos ruminantes pertencentes à família dos camélídeos, que sofrem também com as parasitoses gastrintestinais. Dessa forma, estudos *in vitro* em condições laboratoriais foram realizados para avaliar a atividade predatória de isolados fúngicos no controle biológico *in vitro* de nematoides parasitos gastrintestinais de Lhamas, provenientes do zoológico de Marechal Floriano, Espírito Santo, Brasil. Foram utilizadas as espécies *Duddingtonia flagrans* (AC001 e CG768); *Arthrobotrys conoides* (I40); *Arthrobotrys robusta* (I31); *Monacrosporium sinense* (SF53); e *Monacrosporium thaumasium* (NF34) no experimento crescidas em meio de cultura ágar-água 2% (AA2%) em placas de petri de 9,0 cm de diâmetro. Após sete dias de interação foi observado que todos os isolados fúngicos foram eficientes na captura e destruição das L3, contudo não diferindo sua atividade predatória entre si ($p>0,05$), mas diferindo do grupo controle. Ao final do experimento os seguintes percentuais de redução foram obtidos 87,56% (AC001); 90,45% (CG768); 93,07% (I40); 94,58% (I31); 90,28% (SF53); 92,30% (NF34) em relação ao grupo controle. Conclui-se que todos os isolados fúngicos foram eficientes no controle biológico *in vitro* de L3 de nematoides de Lhamas. Contudo, maiores estudos, principalmente a campo são necessários para se obter um controle mais efetivo das formas de vida livre destes parasitos em Lhamas criadas em zoológico de Marechal Floriano, ES.

Palavras-chave: fungos nematófagos, controle biológico, nematoides, fungos predadores de nematoides.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. G. R., M.Sc, University of Vila Velha – ES, march, 2016 **In vitro biological control of Strongyles (Strongylida) in Llamas (Lama glama) coming from a Zoo, in Marechal Floriano, Brazil.** Advisor: Fábio Ribeiro Braga

The llamas are mammals ruminants belonging to the family of camelids, which also suffer from gastrointestinal parasites. Thus, *in vitro* studies in laboratory conditions were conducted to evaluate the predatory activity of fungal isolates in biological control in vitro gastrointestinal nematode parasites of Llamas, from the Marechal Floriano Zoo, Espírito Santo, Brazil. Species *Duddingtonia flagrans* (AC001 and CG768); *Arthrobotrys conoides* (I40); *Arthrobotrys robust* (I31); *Monacrosporium sinense* (SF53); and *Monacrosporium thaumasium* (NF34) were used in the experiment grown on agar-water culture 2% (AW2%) in petri dishes 9.0 cm in diameter. After seven days of interaction was observed that all fungal isolates were efficient in the capture and destruction of L3. However the predatory activity between itself ($p > 0,05$), but differing from the control group. At the end of the experiment the following reduction percentages were obtained 87.56% (AC001); 90.45% (CG768); 93.07% (I40); 94.58% (I31); 90.28% (SF53); 92.30% (NF34) in the control group. It may be concluded that all fungal isolates were effective *in vitro* in biological control of nematodes L3 llamas. However, more studies are required to obtain a more effective control of free life forms of these parasites in Llamas created in Marechal Floriano Zoo, ES.

Keywords: nematophagous fungi, biological control, nematodes, fungi predators of nematodes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1	NEMATOIDES.....	05
2.2	Estrongilídeos em lhamas	06
2.3	Fungos nematófagos	07
2.4	Controle biológico de Nematoides parasitas em animais.....	08
2.4.1	Mecanismo de ação de fungos nematófagos	09
3	OBJETIVOS	11
3.1	Objetivo geral	11
3.2	Objetivos específicos	11
4	MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1	Fungos utilizados	11
4.2	Caracterização dos animais	11
4.3	Obtenção dos conídios	12
4.4	Obtenção de larvas de Nematoides parasitas gastrintestinais de lhamas	12
4.5	Ensaio	13
4.6	Análise estatística	13
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
6	CONCLUSÃO	21
7	REFERÊNCIAS	22
APENDICE	Aprovação do Comitê de ética da Universidade de Vila Velha para realização do experimento	
1		

1. INTRODUÇÃO

As lhamas, que pertencem à família dos camelídeos, são mamíferos ruminantes de fácil adaptação. Podem ser encontradas em diversas partes do mundo e são denominadas como animais domesticados. (TERRY, 2009). Seus ancestrais vieram da América do Norte há milhões de anos e migraram para América do Sul, em especial o Peru, onde vivem por um período de cerca de 20-30 anos, dependendo da forma como eles são atendidos (OKLAHOMA UNIVERSITY, 2007; MURRAY e FOWLER, 2013; BROMAGE, 2009).

As lhamas são animais que vivem em rebanhos intensamente orientados. Possuem estrutura social distinta, incluindo hierarquia de comando (ANDERSON et al, 2013).

Fowler e Cubas (2001) mencionam que *Lama glama* (LINNAEUS, 1758) pertencente à Família *Camelidae*, Ordem *Artiodactyla*, Sub-ordem *Tylopoda*, é um animal dócil, de fácil manejo e que pode ser encontrado em toda América do Norte, Europa e Austrália. São mamíferos herbívoros que possuem distribuição ampla, adaptando-se a diferentes regiões da América do Sul. Esta denominação engloba tanto espécies domésticas como a *Lama glama* quanto espécies silvestres.

As Lhamas consistem na vicunha (*Vicugna vicugna*, prev. *Lama vicugna*), guanaco (*Lama guanicoe*), alpaca (*Vicugna pacos*, prev. *Guanicoe Lama pacos*), e a lhama doméstica (*Lama glama guanicoe*). Guanacos e vicunhas vivem em estado selvagem, enquanto alpacas e lhamas são animais domesticados (PERRY, 1977).

Segundo Fowler (1986) e Pachaly (2001) os membros dessa família são denominados de pseudo-ruminantes, porque tem divisão do estômago em três câmaras, onde formam pregas, como bolsas glandulares, produtoras de bicarbonato, ao invés dos quatro habituais encontrados em bois, ovelhas e veados. Os dois primeiros compartimentos estomacais são responsáveis pela fermentação do alimento; o terceiro compartimento somente faz fermentação na parte proximal, a parte distal produz secreção gástrica de enzimas

proteolíticas e ácido clorídrico (BOILEAU e GIEDT, 2015). Também são portadoras de lábio leporino e um par de incisivos e grandes caninos superiores. Segundo Murray e Fowler (2013), os caninos são muitas vezes utilizados em embates entre machos, geralmente por uma fêmea em comum. Apoia-se em suas últimas falanges, que possuem almofadas plantares e palmares. Sua digestão, no entanto é semelhante a dos ruminantes, sendo mais eficiente na captação de proteínas e energia para sua sobrevivência, obtidas através de forragem de baixa qualidade (FOWLER e CUBAS, 2001). Possuem glândulas odoríferas em suas patas traseiras associadas à produção de ferormônios (WEAVER, 2009). As glândulas sudoríparas são geralmente encontradas amplamente distribuídas através da superfície da pele, mas são mais densas sobre o abdômen, que é escassamente coberto de pelos (MURRAY e FOWLER, 2013).

Murray e Fowler (2013) descrevem que todas as quatro espécies de camelídeos sul-americanos são animais que vivem sob uma estrutura social e que se utilizam de diversos mecanismos, tais como linguagem corporal, vocalização, tipos de decúbito e comportamentos, que são utilizados para demonstrar sinais de desconforto ou doenças.

Segundo Rickard e Bishop (1991), existe uma ampla variedade de alimentos comerciais baseados em produtos agrícolas para alimentação de lhamas. Ainda este autor afirma que também se alimentam de grama, em pastejo. Estes animais, assim como outros diversos, são infectados por parasitoses. Informações disponíveis indicam que este animal pode ser hospedeiro de uma variedade de parasitas internos e externos.

Ruminantes e pseudo-ruminantes, em especial lhamas são principalmente infectadas por nematoides da família *Strongylidae*, sendo relatados casos de infecção por este tipo de nematoide. Rickard e Bishop (1991) descreveram casos de infecção de lhamas por *Camelostrongylus* sp., *Trichostrongylus* sp. e *Paralaphostrongylus tenuis*. Arenas (2007) relata infecção de lhamas por *Trichostrongylus colubriformis*. Cebra (2014) descreve diversos parasitas em lhamas. Os descritos anteriormente e, ainda, outras espécies de nematoides, alguns trematoides, protozoários e parasitas externos.

A maioria dos parasitas gastrointestinais que infectam esses animais produz uma gastroenteropatia capaz de fazer depleção de proteínas, podendo causar hipoalbuminemia. A enterite produzida por estas parasitoses levam a perdas de nutrientes vitais, tais como absorção de cálcio e fósforo; que afetam o desenvolvimento do esqueleto, podendo até em casos mais graves, levar à morte do animal (FOWLER, 1996).

O tratamento de infecções parasitárias varia de acordo com o parasita, localização geográfica e as práticas de gestão do animal. O mais utilizado para controlar e tratar esses parasitas gastrointestinais é a utilização de medicamentos anti-helmínticos sintéticos, no entanto eles deixam resíduos de produtos no animal tratado, afetam organismos não-alvo, e selecionam cepas resistentes de parasitas (SILVA et al, 2015).

A resistência parasitária é definida como um fenômeno onde alguns organismos são capazes de sobreviver após constante utilização de um fármaco (MOLENTO, 2004). Melo (2009) relata um problema mundial no que diz respeito ao uso de anti-helmíntico. Este autor afirma a resistência deste tipo de medicamento no tratamento de parasitoses causadas por helmintos. E que esta resistência está relacionada à sub-dosagem e alta rotação do princípio ativo. Shalaby (2013) descreve que muitos helmintos de importância veterinária têm características genéticas que favorecem o desenvolvimento de resistência a estas drogas e que o uso frequente do mesmo grupo de anti-helmíntico; o uso em sub-doses, tratamento em massa profilático de animais e uso frequente e contínuo de uma única droga tem sido observada como fatores para esta resistência. O uso de anti-helmínticos no controle das parasitoses tem sido relatado como insuficiente, além de contaminar o meio-ambiente.

Braga e Araújo (2014) relatam que o uso de fungos nematófagos para o tratamento de parasitoses tem sido muito estudado, já sendo conhecido seu mecanismo de ação, que se demonstra eficiente e de baixo impacto ambiental, sendo esta uma alternativa viável para o controle biológico destas parasitoses.

Para Pandit e Kunjadia (2014), o controle biológico pode ser realizado através do uso de antagonistas naturais, tais como os fungos

nematófitos, que ocorrem em grande número no solo e fazem uso de nematoides como alimento para sua nutrição. Devido a grande quantidade de espécies existentes e todas com potencial de predação de ovos e larvas, existe razão para o interesse contínuo na utilização desses fungos como agentes de biocontrole.

Através de análises bibliográficas verifica-se que são raros os trabalhos que abordam a ação patogênica destes parasitos em animais. Pesquisas que possam demonstrar novas abordagens de controle são bem vindas, em especial, o controle biológico com fungos nematófitos (BRAGA e ARAÚJO, 2014, PANDIT e KUNJADIA, 2014). A administração de fungos nematófitos aos animais é considerada uma promissora alternativa na prevenção das parasitoses, demonstrando ser um método que satisfaz o tratamento não só por sua eficácia, mas, pelo seu custo (MOTA et al, 2003).

Porém, Chandrawathani (2004) descreve que a utilização de fungos nematófitos requer doses muito elevadas ao animal e ainda, que após a administração oral, deve-se ter a garantia de sobrevivência dos fungos no trato gastrointestinal dos animais. Alguns fungos demonstraram relativa facilidade na obtenção de formulações capazes de produzir o efeito desejado, porém, este autor afirma que, por não terem efeito quimioterápico, devem ser utilizados como coadjuvantes no tratamento das parasitoses.

Desta forma, despertou-se o interesse por métodos de controle que não desenvolvessem resistência por parte dos parasitas, que tivesse custo reduzido e diminuição de resíduos químicos no meio ambiente, propondo-se então, um estudo que viabilizasse a utilização destes fungos no intuito de desenvolver medidas de controle biológico de nematoides. Assim, este estudo tem por objetivo apresentar a importância do uso de fungos nematófitos como uma alternativa do controle biológico dos estrogilídeos em lhamas no zoológico de Marechal Floriano, Espírito Santo, Brasil.

O presente estudo justifica-se pela sua ideia inovadora, uma vez que não existem relatos na literatura que abordem a ação patogênica de antagonistas naturais presentes no ambiente, em especial, de fungos

nematófagos contra estrongilídeos de Lhamas provenientes de zoológicos. Dessa forma, objetivou-se avaliar a atividade predatória *in vitro* de fungos nematófagos sobre estrongilídeos (*Strongilydae*) de Lhamas (*Lama glama*) provenientes do zoológico de Marechal Floriano, Espírito Santo.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Nematoides*

Os Nematoides são vermes cilíndricos, que possuem boca, corpo (pseudoceloma) e ânus. Possui simetria bilateral, sendo revestido de uma cutícula, que podem ser cutículas, espinhos ou asas (podem ser cefálicas, cervicais ou caudais) (FREITAS, 1992, MONTEIRO, 2010). Possuem sistema digestivo composto de boca, vestibulo oral, lábios, esôfago, faringe, intestino e ânus (URQUHART et al., 1998; MONTEIRO, 2010). Possuem dimorfismo sexual, as fêmeas são maiores que os machos (MONTEIRO, 2010). Seu corpo pode ser cilíndrico, subcilíndrico, capilar, fusiforme ou esférico. Crofton (1966) descreveu que os nematoides possuem pseudoceloma preenchida por um líquido sob pressão. A cutícula possui fibras rígidas arranjadas que o aumento da pressão interna provoca o aumento do comprimento. Bowman (2006) descreve este movimento, como método simples de enrijecimento do corpo que causa aumento da turgidez permitindo sua locomoção através da ondulação sinusóide.

O ciclo de vida dos nematoides compreende quatro estágios (L1 a L4), possuindo também o adulto imaturo, denominado L5. São conhecidos dois tipos de ciclo evolutivo: direto e indireto. No ciclo direto, as larvas possuem vida livre e a infecção se dá quando o animal ingere L3, que é a larva infectante. No ciclo indireto, há a presença do hospedeiro intermediário e a infecção ocorre por ingestão desse hospedeiro intermediário pelo hospedeiro definitivo.

Conhecidos hospedeiros intermediários são os roedores, como ratos, que infestam os habitats. Após a infecção ainda ocorrem mudas, chegando ao adulto, que após a cópula inicia um novo ciclo evolutivo (URQUHART et al., 1998; BOWMAN, 2006, MONTEIRO, 2010). Urquhart et al. (1998), ressaltam como os elementos mais importantes para o desenvolvimento das larvas a temperatura, que deve estar entre 18 a 26°C; e a umidade, para que ocorra o ciclo evolutivo completo das larvas.

2.2 *Estrongilídeos em lhamas*

O parasitismo de nematoides em animais é de importância mundial, uma vez que são capazes de causar danos, tanto em animais domésticos quanto em animais de importância econômica. Podem causar limitação de produção leiteira, redução do ganho de peso e comprometer o desempenho reprodutivo, além do comprometimento do sistema imunológico (SOUSA et al., 2008). Ruminantes também são suscetíveis a este tipo de parasitismo. Segundo Aro et al. (2006); Dias et al. (2007); Terry (2009); Vieira et al. (2010); Vieira (2012); o helminto *Haemonchus contortus* é um nematoide cujo controle apresenta importância econômica por ser prevalente em ruminantes, sendo os animais mais jovens os mais suscetíveis à doença devido à imunidade ainda não amadurecida e ainda, relacionada a outros fatores como clima, pastejo, infecções prévias e a fisiologia de cada animal. (WALLER, 2002; TERRY, 2009; COSTA et al., 2011).

Relatos descrevem que este parasitismo parece estar relacionado ao clima. Araújo et al. (2007) relatam que durante a estação chuvosa ocorre maior infecção, devido maior quantidade de larvas no pasto. No entanto, durante os períodos de seca, encontra-se maior número de larvas adultas infectando os animais (VIEIRA, 2012). Percebe-se uma relação inversa relacionada ao clima quanto à presença de helmintos. Honer (1991) afirmou que o bolo fecal dos animais funciona como reservatório de larvas. Castro

(2002) relata que estas larvas sofrem então um processo migratório horizontal e vertical chegando às pastagens que serão ingeridas pelo hospedeiro.

As espécies de nematoides mais encontrados em ruminantes são *Haemonchus contortus* (PUGH et al., 1998), o *Trichostrongylus* spp., espécies *Ostertagia*; *Cooperia*; espécies do gênero *Strongyloides*, e o *Oesophagostomum* (ROBERTS e JANOBY Jr., 2005; DIAS, 2007). Segundo Cebra et al. (2014) os parasitas mais comumente encontrados em lhamas são nematoides dos gêneros *Camelostrongylus*, *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia* e *Oesophagostomum*. Outros parasitas incluem trematóides, nematoides do gênero *Paralaphostrongylus tenuis*, *Nematodirus*, protozoários como *Giardia*, *Coccidia*, *Cryptosporidium*; além de piolhos, carrapatos e ácaros.

Estudo post mortem foi realizado por Rickard e Bishop (1991) em dezoito lhamas no intuito de conhecer quais helmintos se faziam presentes em seus intestinos. Foram encontradas dezesseis espécies de nematoides e espécie de trematóides, sendo os mais prevalentes os gêneros *Camelostrongylus* e *Trichostrongylus*. Outras espécies como *Nematodirus*, *Trichuris*, *Capillaria*, e *Cooperia* com menos frequência e *Haemonchus*, *Ostertagia*, e *Oesophagostomum*, mais raros.

2.3 Fungos Nematófagos

Segundo Araújo et al.(2004a), os fungos nematófagos são divididos em três grupos: endoparasitas, predadores e oportunistas.

Os fungos endoparasitas são aqueles que possuem forma de esporo, podendo algumas vezes, serem clamidósporos (esporos resistentes) (ARAUJO et al., 2004a). Eles não produzem grandes micélios, mas são capazes de infectar o nematoide com esporos, conídios e clamidósporos, que após ingestão desenvolvem hifas que digerem o conteúdo interno do parasita (MOTA et al., 2003; ARAUJO et al., 2004b).

Os fungos oportunistas são saprófitas. Possuem característica de parasitar ovo, cisto, fêmea de fitonematoide e helmintos. Suas hifas penetram no ovo através de poros da camada vitelínica, alterando a casca do ovo, causando sua expansão. Este fungo é capaz de colonizar ovo e larva (ARAÚJO et al., 2004b).

Fungos predadores, são saprófitas e parasitas, produzem armadilhas com formato de redes adesivas, as chamadas hifas, que capturam então a sua presa. (MOTA et al., 2003). Para Braga e Araújo (2014) a principal característica destes tipos de fungos é a produção de armadilhas, que se diferenciam em seis tipos diferentes: hifas adesivas não diferenciadas; ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando rede adesiva tridimensional; ramificações adesivas, que podem se unir formando um adesivo bidimensional e redes simples; nódulos adesivos; anéis de constrição; e anéis que não realizam constrição. Estes tipos de fungos são os mais utilizados em experimentos, e a espécie *Duddingtonia flagrans* é a que mais se destaca nessas pesquisas (Braga et al., 2007; Braga et al., 2009a). São mais estudados devido a sua capacidade de promover o controle biológico em animais, com eficácia na redução de parasitas, tanto em laboratório quanto em campo. São também estudados pela facilidade de isolamento e cultivo em laboratório (GRONVOLD, et al., 1996).

Os fungos predadores produzem diversas armadilhas e se diferem por seu desenvolvimento. Os de desenvolvimento rápido produzem armadilhas tridimensionais; os de crescimento intermediário formam armadilhas do tipo inóculo e o de crescimento lento formam anéis constritores (MOTA et al., 2003). Araújo et al., 1999) e Braga et al., (2009a) afirmam que os predadores mais estudados e utilizadas para controle biológicos são os do gênero *Monacrosporium*, *Duddingtonia* e *Arthrobotrys*.

Os gêneros *Duddingtonia* sp., *Monacrosporium* sp. e *Arthrobotrys* sp. são conhecidos predadores formadores de armadilhas tridimensionais. A captura é realizada pelo desenvolvimento de hifas e de estruturas de captura que se dispõem ao longo do fungo. As hifas podem ser desenvolvidas para captura através de diferentes estímulos, tais como a própria presença do

nematoide, sua motilidade, estresse fisiológico e outros fatores biológicos como a presença de luminosidade, de água e o estado nutricional (ARAUJO et al., 2004a; BRAGA et al., 2008).

2.4 Controle Biológico de Nematoides parasitas em animais

As pesquisas com fungos nematófagos como controladores de parasitas nematoides iniciaram na França, na década de 30 (SANTOS, 2005). Os primeiros experimentos “in vitro” estudaram a atividade de quatro fungos predadores em larvas de diferentes espécies de nematoides de animais. No Brasil, pesquisas com fungos nematófagos foram pioneiras com Araújo et al. (1992). Foi demonstrado que *Monacrosporium ellipso sporum* e *Arthrobotrys* spp. foram eficazes no controle de larvas de *Haemonchus placei* em condições laboratoriais, e que havia variações na capacidade predatória de diferentes isolados dentro da mesma espécie de *Arthrobotrys* (ARAUJO et al., 1992, 1993).

Segundo Melo (2003), as pesquisas sobre controle de biológico de nematoides através do uso de antagonistas naturais se iniciou com o aparecimento de resistência anti-helmíntica.

Nematoides parasitam diversos tipos de animais, incluindo as lhamas. Waler e Larsen (1993), afirmam que durante o desenvolvimento no meio ambiente, os ovos e larvas de nematoides são submetidos a diversos fatores nas quais para sobrevivência necessitam de superar. Fatores como umidade, temperatura e tensão de oxigênio, fauna e flora coprófila são de importância para sobrevivência larvar.

O uso destes antagonistas naturais, fungos nematófagos vem sendo largamente estudada, porém ainda não existem formulações comerciais seguras para utilização. No entanto Braga e Araújo (2014) afirmam que barreiras culturais para o uso de fungos devem ser quebradas.

A utilização de fungos nematófagos que agem sobre ovos e larvas como alternativa de controle biológico vem sendo analisada nos últimos anos. (GIROTTTO et al., 2008). Estudos têm sido realizados para maior eficiência no

controle biológico de nematoides, tanto em animais quanto no solo para se conhecer os fungos mais eficazes e a melhor maneira de administrá-los.

Em relação ao controle biológico de nematoides de lhamas não existem trabalhos na literatura que possam elucidar o real mecanismo e a possível interação de fungos nematófagos com estes nematoides, sendo este o primeiro relato.

2.4.1 *Mecanismo de ação de fungos nematófagos*

A maioria dos fungos nematófagos apresenta esporos secos denominados conídios, que emergem de estruturas de frutificação denominadas conidióforos. Estes são essenciais na dispersão aérea dos conídios. Os conidióforos crescem verticalmente, em direção perpendicular ao substrato, sendo que algumas espécies produzem conidióforos com apenas um conídio na extremidade e outras formam estruturas em formato de cachos em toda estrutura do conidióforo. Além do conídio, algumas espécies podem produzir a partir da hifa, um tipo de esporo de parede espessa e tamanho variado, conhecido como clamidósporo (SANTOS, 2005).

Araújo et al. (2004c) afirmam que os fungos predadores produzem anéis que realizam a constrição da larva, também podem produzir anéis não constritores e possuem redes adesivas ao longo de seu micélio que aprisionam a larva, seguido pela penetração das hifas, que crescem e digerem o conteúdo do nematoide. Este autor ainda afirma que o processo de captura dos nematoides pelos fungos, inicia-se com a atração dos nematoides pelas armadilhas, que lesionam a cutícula do nematoide, causando sua destruição. A formação de armadilhas acontece na presença do nematoide, podendo também ocorrer induzida por condições de estresse e na falta de alimento e água (DIAS, 2007).

Quanto maior a motilidade dos nematoides, maior o estímulo ao fungo para a produção de armadilhas (ARAÚJO et al, 2004c). Nordbring-Hertz

e Jansson (1984) afirmam que os nematoides ativam o desenvolvimento das estruturas capazes de capturar os nematoides. Gray (1988) descreve que este processo de captura depende de processos fisiológicos e bioquímicos.

3 OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

- Avaliar a atividade predatória *in vitro* de fungos nematófagos sobre estrongilídeos (*Strongilydae*) de Lhamas (*Lama glama*) provenientes do zoológico de Marechal Floriano, Espírito Santo.

3.2 *Objetivos específicos*

- a) Avaliar a eficiência de distintos isolados fúngicos no controle *in vitro* de nematoides gastrintestinais de Lhamas;
- b) Avaliar qual o melhor fungo a ser utilizado no controle biológico de estrongilídeos de Lhamas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Fungos utilizados*

Foram utilizados os fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001 e CG768), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *Monacrosporium sinense* (SF53), *Arthrobotrys robusta* (I31) e *Arthrobotrys conoides* (I40). Estes isolados são provenientes do laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

4.2 *Caracterização dos animais*

As Lhamas são provenientes do Zoológico Zoo Park das Montanhas, no município de Marechal Floriano/ES. Foram realizados em 100% dos animais exames parasitológicos, que constatou que todos os animais estavam infestados por parasitas nematoides. Foram estudados 08 animais, sendo 03

machos e 05 fêmeas. Os animais recebem ração industrializada, específica para ruminantes, além de feno e; possuem peso variando entre 140 e 180 Kg. Vivem em habitats criados pelo zoológico para convivência dos mesmos. A utilização dos animais como fonte de pesquisa foi autorizado pelo zoológico, bem como aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Vila Velha.

4.3 *Obtenção dos conídios*

Discos de cultura de 4 mm de diâmetro foram extraídos dos isolados fúngicos mantidos em tubos de ensaio contendo corn-meal-ágar 2% (CMA 2%) e transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 20mL de batata-dextrose-ágar 2% mantidos a 25° C no escuro durante 10 dias. Após o crescimento dos isolados, novos discos de cultura de 4 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9,0 cm diâmetro contendo 20 mL de ágar-água 2 % (AA 2%) onde foram acrescidos de 1mL de água destilada contendo 1.000 larvas de *Panagrellus* sp., diariamente durante um período de 21 dias para indução de formação de conídios fúngicos. Quando se observou o completo desenvolvimento fúngico, 5 ml de água destilada foram adicionados à cada placa de Petri, sendo que os conídios e fragmentos miceliais foram removidos segundo a técnica descrita por Araújo et al. (1993).

4.4 *Obtenção de larvas de Nematoides parasitos gastrintestinais de lhamas*

Fezes frescas foram coletadas diretamente do reto de lhamas provenientes do zoológico Parque da Montanha localizado no município de Marechal Floriano, Espírito Santo, Brasil. A seguir, destas amostras fecais foi retirado cerca de 2g para a realização dos exames parasitológicos de fezes (Contagem de Ovos por grama de fezes) para se aferir o grau de infecção. Após isso, foram confeccionadas coproculturas com aproximadamente 20 g de fezes e que foram incubadas em câmara de incubação BOD por um intervalo de 10 dias (GORDON E WITHLOCK, 1939). Após esse período por meio da técnica de Baermann foram extraídas 3.500 larvas e identificadas de acordo

com Keith (1989). As análises foram realizadas no laboratório da Universidade de Vila Velha, no período de 25 a 31 de julho de 2014.

4.5 *Ensaio*

Sete grupos foram formados em placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo 20 ml de AA2%, seis grupos tratados e um grupo controle, sendo feitas 6 repetições para cada grupo. As placas de Petri foram previamente marcadas em campos de 4 mm de diâmetro. Nos grupos tratados cada placa de Petri continha 500 L3 de *estrongilídeos* e 500 conídios dos isolados fúngicos AC001, CG768, NF34, SF53, I31 e I40 em AA2%, e o grupo controle (sem fungos) continha apenas 500 L3 nas placas com AA2% (MOTA et al., 2002).

Durante sete dias, a cada 24 horas, 10 campos aleatórios de 4 mm de diâmetro em cada placa dos grupos tratados e controle foram observados em microscópio de luz em objetiva de 10x, contando-se o número de L3 não predadas em cada um. Ao final de sete dias, foram recuperadas as L3 não predadas do conteúdo das placas de Petri através do aparelho de Baermann com água a 42 ° C (BRAGA et al., 2010).

4.6 *Análise estatística*

A média de L3 de *estrongilídeos* foi calculada. Os dados foram interpretados estatisticamente pela análise de variância em níveis de significância de 1 e 5% de probabilidade (Ayres et al., 2003). A eficiência de predação de L3 em relação ao controle foi avaliada pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A média, o desvio padrão e o teste de Tukey foram calculados através do software Biostat 3.0. Posteriormente, o percentual de redução da média de L3 foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{Redução} = \frac{\text{Média de L3 recuperadas do controle} - \text{Médias de L3 recuperadas do tratamento}}{\text{Média de L3 recuperadas do controle}} \times 100$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após sete dias de interação entre as larvas e os isolados fúngicos, diferença significativa ($p < 0,05$) no número médio de larvas recuperadas por placa foi observada em todos os tratamentos.

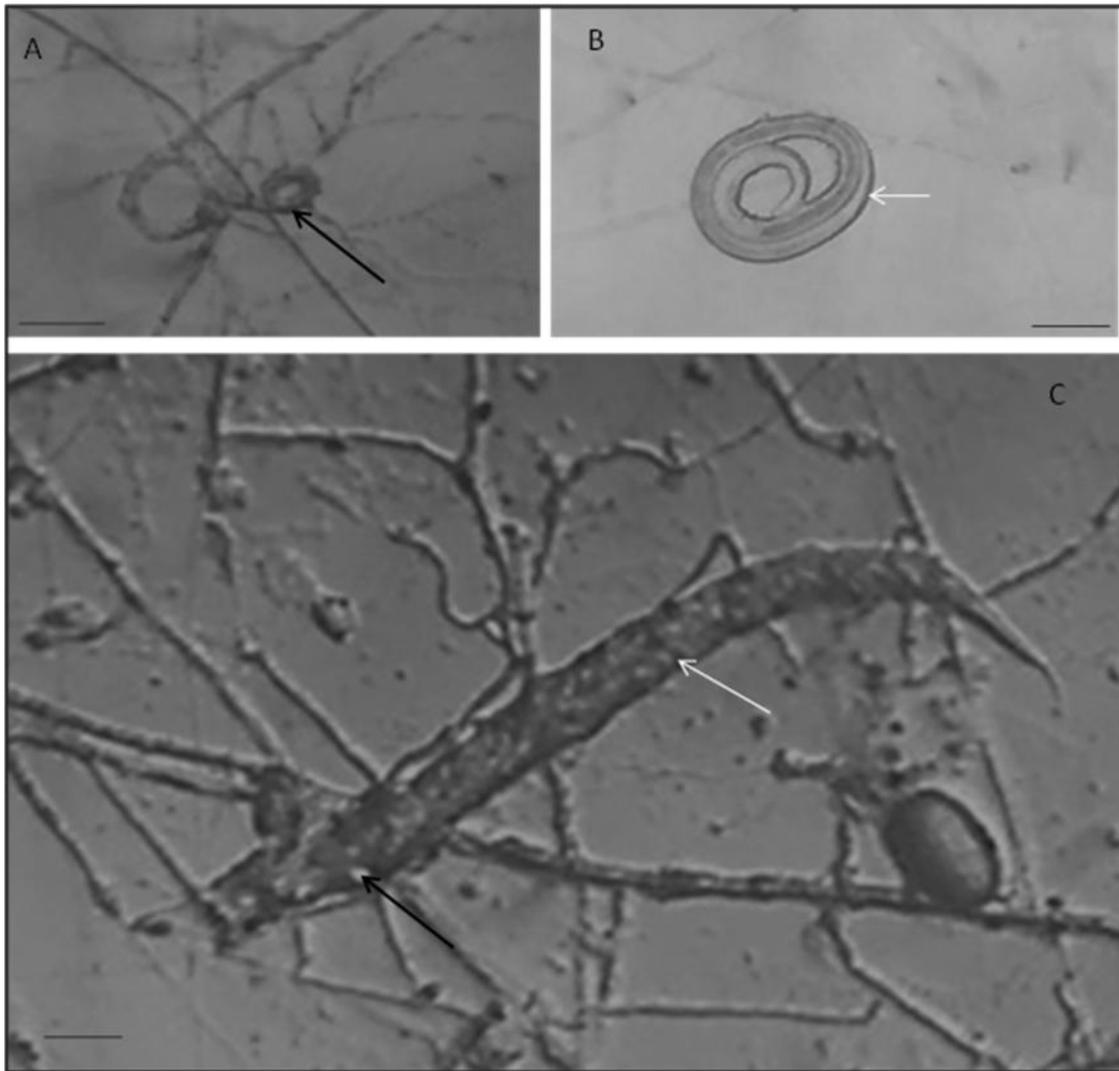


Figura 1 – A - armadilha produzida por fungos nematófagos; B - larva de terceiro estágio de nematoide parasito gastrintestinal de Lhamas (seta branca) e C - L3 de nematoide parasito gastrintestinal de Lhamas capturado pelo fungo (seta preta).

Após analisar cada isolado e sua interação com as L3 de estrongilídeos de Lhamas, no presente trabalho, pôde-se observar que todos os isolados fúngicos foram eficientes na redução de L3, (Tabela 1) e ao final do experimento os seguintes percentuais médios foram de redução foram registrados: AC001 (87,56%); I31 (94,38%); I40 (93,07%); CG768 (90,45%); SF53 (90,28%); NF34 (92,30%), Figura 2.

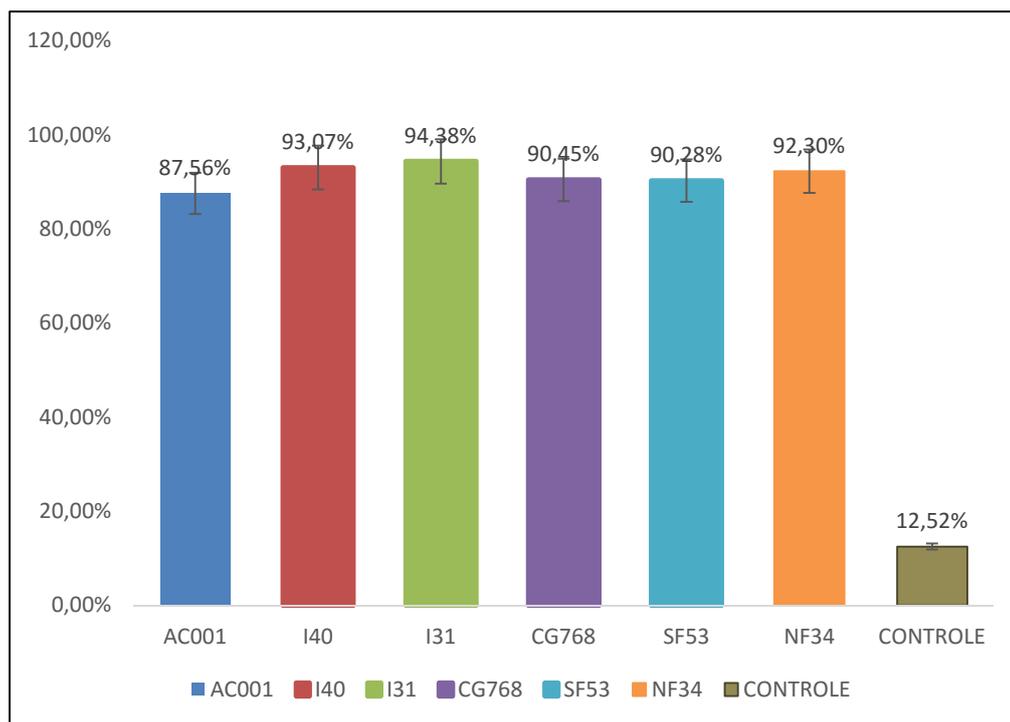


Figura 2: Percentual médio da recuperação de (L3) nas placas de petri dos grupos tratados com os fungos nematófagos no controle ao final de 7 dias.

Tabela 1 - Média e desvios padrão da contagem diária de larvas infectantes (L3) de nematoides de Lhamas nas placas de petri dos grupos tratados com os fungos *Duddingtonia flagrans* (AC001 e CG768), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), *Monacrosporium sinense* (SF53), *Arthrobotrys robusta* (I31) e *Arthrobotrys conoides* (I40) e grupo controle, após sete dias de interação.

Isolados fúngicos	Dias de interação (1 a sete dias)						
	1	2	3	4	5	6	7
AC001	1,6±0,9 ^a	1,2±0,7 ^a	1,3±1,4 ^a	1,07±0,9 ^a	0,73±0,4 ^a	0,16±0,4 ^a	0,1±0,3 ^a
I40	0,87±0,6 ^a	0,73±0,6 ^a	0,67±0,7 ^a	0,13±0,3 ^a	0,63±0,6 ^a	0,67±0,2 ^a	0,03±0,1 ^a
I31	0,8±0,6 ^a	0,70±0,6 ^a	0,88±0,6 ^a	0,23±0,4 ^a	0,33±0,5 ^a	0,10±0,3 ^a	0,06±0,2 ^a
CG768	0,90±1,0 ^a	1±0,7 ^a	0,83±0,6 ^a	0,92±0,7 ^a	1±2,7 ^a	0,12±0,3 ^a	0,1±0 ^a
SF53	0,52±0,7 ^a	0,70±0,7 ^a	1,05±0,8 ^a	0,88±0,7 ^a	0,72 ^A ±0,6 ^a	0,15±0,3 ^a	0,66±0,2 ^a
NF34	1,03±0,9 ^a	0,98±0,8 ^a	0,72±0,8 ^a	0,35±0,6 ^a	0,65±0,5 ^a	0,12±0,3 ^a	0,07±0,2 ^a
Controle	8,12±4,1 ^b	7,01±3,6 ^a	7,7 ^A ±4,5 ^b	7,05±3,7 ^b	6,73±3,8 ^b	7,43±4,3 ^b	7,18±4,1 ^b

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferem estatisticamente ($p>0,05$) – Teste de Tukey.

O fungo *D. flagrans* (AC001), demonstrou eficácia sobre larvas (L3) de nematoides estromgilídeos em lhamas. As médias das contagens de larvas do grupo controle foram maiores que os do grupo AC001 (grupo tratado), sendo observada diferença ($p<0,05$). O percentual de redução da média de L3 foi de 87,56%. Estes dados corroboram com outros estudos que analisaram a atividade predatória desse isolado sobre estromgilídeos. Nesse sentido, Campos (2006) descreveu a ação predatória de AC001 demonstrando diferença ($p<0,05$) em relação ao grupo controle.

Braga et al (2009b) apresentaram um ensaio onde se formaram quatro grupos: *D. flagrans*, *M. thaumasium*, *A. robusta* e o grupo-controle para avaliar a capacidade predatória destes fungos. Ao final, o isolado *D. flagrans* demonstrou melhor desempenho em relação aos demais isolados utilizados e o grupo-controle, observando-se uma redução significativa de 97,5% no número

médio das L3 recuperadas. Houve diferença ($p < 0,05$) no número de L3 recuperadas dos isolados fúngicos em relação ao grupo-controle. No presente trabalho, foi observada uma redução de 87,56% em relação ao grupo controle.

Foi observado desde o dia 1 a diferença entre as médias e desvio padrão de $1,06 \pm 0,95$ no grupo tratado e de $8,12 \pm 4,11$ no grupo controle. Comparando ao dia 7, foi observado uma média e desvio de $0,1 \pm 0,3$ no grupo tratado e $7,18 \pm 4,1$ no grupo controle. Analisando tais dados observa-se que há diminuição das médias do grupo tratado e uma diminuição, ainda que menor no grupo controle. Braga et al. (2010) afirmaram que a partir do sétimo dia de análise, há um decréscimo de umidade nas placas e então as larvas utilizam de sua motilidade para migrar para a periferia buscando maior umidade, o que dificulta a visualização e contagem destas larvas, justificando esta diminuição de larvas no grupo controle.

Em relação ao fungo *A. conoides* (I40) utilizado neste ensaio, a percentual de redução foi de 93,07%, sendo este resultado considerado satisfatório quanto sua ação predatória. Pode-se afirmar que a predação foi muito eficiente na utilização deste fungo. É possível observar que as médias do grupo controle são muito maiores que o do grupo tratado (I40), demonstrando uma grande ação predatória do fungo *A. conoides* sobre as larvas L3.

Andaló et al (2008), que comprovaram a eficácia de predação de *A. conoides* sobre L3 de parasitos gastrintestinais de ruminantes. No entanto esta pesquisa fora realizada no intuito de avaliar a suscetibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* aos fungos predadores *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides* e *D. flagrans*, avaliando-se a capacidade predatória sobre diferentes substratos. O resultado obtido foi que quando mantidos em placas com ágar, os fungos *A. conoides* e *D. flagrans* formaram armadilhas e capturaram os nematoides 48h após a adição dos nematoides. Este ensaio também observou a formação de armadilhas e captura de nematoides.

Estudos demonstram que, outras subespécies de *Arthrobotrys* têm sido utilizadas com bastante eficácia no controle biológico de larvas infectantes de nematoides. Araújo (2012) e Larsen (2000) afirmaram que no grupo dos

predadores os gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* se destacam pelo controle de larvas nematoides no ambiente.

Braga et al (2007); Larsen (1999); Araújo (1999, 2000b) afirmaram que o controle biológico de nematoides realizado por fungos nematófagos é alternativa promissora e que tem tido resultados satisfatórios.

Foi observada a ação dos fungos *A. robusta* (I31) quanto a sua predação sobre larvas (L3) infectantes. Os resultados da porcentagem de redução de larvas (L3) foram muito satisfatórios e demonstram a eficácia da predação do *A. robusta* sobre as L3. O percentual da média de redução de larvas foi de 94,58%, demonstrando sua eficácia na predação de nematoides gastrintestinais de lhamas.

Araújo et al (2006) descreveram ensaio realizado com seis isolados dos fungos nematófagos *M. thaumasium* (isolado NF34), *M. sinense* (isolado SF470), *M. appendiculatum* (isolado CGI), *A. robusta* (isolado I31), *A. cladodes* (isolado CG719) e *D. flagrans* (isolado CG768) que foram avaliados em laboratório quanto à capacidade de predação de larvas infectantes de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. Não houve diferença ($P > 0,05$) entre as associações e os diversos isolados fúngicos usados para predação de *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. Além disso, não houve variação da proporção inicialmente colocada em cada placa de 58,0% de *Cooperia* sp. e de 42,0% de *Oesophagostomum* sp., indicando que os fungos não foram seletivos para um determinado gênero de nematoide.

Foi observada diferença ($p < 0,05$) na ação predatória do fungo *A. robusta*, reforçando sua ação predatória sobre as larvas infectantes.

Braga et al. (2009b), demonstraram eficácia de predação de I31 sobre L3 de nematoides gastrintestinais de equinos. Os resultados demonstraram que todos os isolados fúngicos utilizados (*D. flagrans*, *M. thaumasium* e *A. robusta*) podem ser utilizados no controle biológico. A média de larvas infectantes (L3) não predadas de ciastomíneos, I31 apresentou as maiores médias de predação nos cinco dias de ensaio, ficando menor em apenas um dia, tendo um percentual de redução de 85%.

Pode-se observar que este estudo também apresentou médias significativas de L3 recuperadas durante o ensaio, tendo seu menor percentual de predação de 88,57% no terceiro dia. Outro ensaio *in vitro* realizado por Braga et al (2011) comparou a capacidade predatória dos fungos *D. flagrans* (AC001), *A. robusta* (I31) e *M. sinense* (SF53) sobre larvas infectantes (L3) de *Strongyloides venezuelensis* em condições laboratoriais. O percentual de redução obtido neste experimento foi de: 93% (AC001); 77,2% (I31) e 65,2% (SF53). Os fungos nematófagos foram capazes de capturar e destruir *in vitro* as L3. Comparando a este estudo, observamos um percentual de redução das médias de I31 de 94,58%, percentual maior que o do estudo de Braga et al (2011), demonstrando a eficácia deste fungo na captura e destruição de larvas (L3) *in vitro* em parasitas de lhamas.

Araújo et al (2004a) avaliaram em condições laboratoriais isolados fúngicos de *M. thaumasium*, *M. sinense*, *A. robusta* e *D. flagrans* quanto à capacidade de predação de larvas L3 infectantes de *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. Ao final do estudo, comprovou-se a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) entre todos os isolados fúngicos e os do grupo controle. Sendo todos eficientes na predação das larvas infectantes. Este estudo pode comprovar diferença estatisticamente significativa no uso do isolado fúngico em relação ao controle.

O fungo *D. flagrans* (CG768) é identificado como predador e tem sido estudado como agente de controle biológico de parasitas nematoides (BRAGA et al., 2009a; CARVALHO et al., 2009; LARSEN, 1999, 2000). Observou-se a ação dos fungos *D. flagrans* (CG768) na predação de larvas infectantes de estrongilídeos. Os resultados obtidos na redução da média de L3 predada foram satisfatórios, sendo observado um percentual de 90,45% de redução em relação ao grupo controle.

A capacidade predatória do fungo nematófago *M. sinense* (SF53) sobre larvas infectantes (L3) de estrongilídeos também foi analisada em condições laboratoriais nesse ensaio. Ao final, observou-se que houve redução das médias de L3 de 90,28%. Braga et al (2011) também observaram a capacidade predatória deste fungo em ensaio laboratorial, porém obtendo

62,50% de redução sobre as L3. As médias diárias se mantiveram sempre inferiores com relação ao grupo controle ($p < 0,05$) para este ensaio.

Outros experimentos podem corroborar com este estudo, como por exemplo, o experimento realizado por Campos (2006), que estudou a utilização de fungo *M. sinense* no controle de nematoides de bovinos. O percentual de redução de larvas infectantes *in vitro* variou entre 90,6 e 100%. Comparando ao experimento realizado percebe-se que esta variação também se manteve, porém entre 83,36 e 97,98%, podendo então afirmar que a redução de larvas foi satisfatória na utilização do fungo *M. sinense* para controle biológico de nematoides encontradas nas fezes de lhamas.

M. thaumasium foi utilizado para avaliar sua eficácia na predação de strongilídeos encontrados em fezes de lhamas neste ensaio. Após sete dias de observação e análise, obteve-se uma redução percentual de larvas infectantes de 92,30%. Resultados similares foram encontrados em outros ensaios. Silva et al. (2013) realizou experimento, avaliando o efeito de diversos fungos nematófagos no controle de larvas infectantes (L3) de nematoides após o trânsito gastrointestinal em bovinos. Ao final deste estudo *M. thaumasium* mostrou maior atividade predatória que os demais, tendo um percentual de redução de 98,3%. Este resultado está de acordo com o presente estudo, demonstrando alta eficácia deste fungo no controle biológico de strongilídeos quando infectam lhamas. O menor percentual de redução obtido nos sete dias de ensaio foi de 86,20%. O uso deste isolado como controlador biológico de strongilídeos em lhamas pode ser bastante significativo no tratamento destas parasitoses em lhamas.

Fungos do gênero *Monacrosporium* sp. foram avaliados por vários autores, e, os mesmos relatam sua eficácia no biológico controle de parasitas gastrintestinais. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram diferença ($p < 0,05$) na contagem diária de L3 em relação ao grupo controle.

6 CONCLUSÃO

-) Os fungos analisados foram capazes de predação as larvas de nematoides podendo ser utilizados no controle de nematoides gastrintestinais de lhamas.
-) *Arthrobotrys robusta* teve maior eficácia de predação, obtendo um percentual de redução de 94,58%, demonstrando melhor desempenho em relação aos demais isolados fúngicos e o grupo controle.
-) É preciso que mais estudos, principalmente a campo sejam realizados, no intuito de conseguir viabilizar estes isolados em escalas industriais a fim de controlar as parasitoses causadas por estes nematoides.

7 REFERÊNCIAS

- ANDALÓ, V.; MOREIRA, G. F.; MAXIMINIANO, C.; MOINO, A.; CAMPOS, V. P. Suscetibilidade de *Heterorhabditis amazonensis* (*Rhabditida: Heterorhabditidae*) a Fungos Predadores de Nematoides. Universidade Federal de Lavras. **Nematologia Brasileira**, v. 32(3), 2008.
- ANDERSON, D. E.; JONES, M. L.; MIESNER, M. D. **Veterinary Techniques for Llamas and Alpacas**. Oxford: Willey-Blackwell, 2013.
- ARAÚJO J. V.; SANTOS M. A.; FERRAZ S.; MAIA A. S.; MAGALHÃES A. C. M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 44, p. 521-526, 1992.
- ARAÚJO, J. V.; SANTOS, M. A., FERRAZ, S. & MAIA, A. S. Antagonistic effect of predacious *Arthrobotrys* fungi on infective *Haemonchus placei* larvae. **Journal Helminthology**, v. 67 p.136-138, 1993.
- ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A.; SAMPAIO, W. M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. **Veterinarski Arhiv Journal**, v. 2, p.6978, 1999.
- ARAÚJO, J. V.; STEPHANO, M. A.; SAMPAIO, W. M. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*, a nematode-trapping fungus. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 55-59, 2000b.
- ARAUJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A.; Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium* sobre nematoides *Trichostrongilídeos* (*Nematoda:Trichostrongylidae*) Parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, 2, 65-71. 2004a.
- ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; ALVES, P. H.; CAMPOS, A. K., GANDRA, J. R. Controle biológico de trichostrongilídeos (*Nematoda: Trichostrongyloidea*) gastrintestinais de bovinos pelo fungo *Monacrosporium sinense*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, 467-471. 2004b.
- ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A.K. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 165-170, 2004c.

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

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

ARAUJO, J. M. **Avaliação de fungos nematófagos sobre larvas infectantes de *Strongyloides westeri* e ovos de *Toxocara cani***. (Tese) Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2012.

ARENAS, R.E.Z. **Estudio de la fauna parasitaria del tracto gastrointestinal de la liebre europea (*Lepus Europaeus*, Pallas 1778), proveniente de Estancias de las provincias de Última Esperanza y Magallanes, XIIª Región, Chile**. Universidad Austral del Chile (tese), 2007.

ARO, D. T.; POLIZER, K. A.; BELUTE, D. S.; ALMEIDA, C. R. de; AMARAL, L. C. do; NEVES, M. F.; RODRIGUES, R. Verminose Ovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. III, n.07, jun, 2006.

BOILEAU, M.; GIEDT, E. J. General information for the potential camelid owner. Oklahoma Cooperative Extension Service. **Oklahoma University Press**, abril, 2015.

BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L.; ALCARAZ, A. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8 ed. Barueri, SP: Editora Manole, 2006.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; MACIEL, A. S. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40 (3):356-358, mai-jun, 2007.

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

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; CAMPOS, A. K. Avaliação *in vitro* do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos

(*Nematoda: Cyathostominae*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, supl. 1, p. 83-85, dez. 2009a.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; CAMPOS, A. K. Controle *in vitro* de larvas infectantes de ciastomíneos (*Nematoda: Cyathostominae*) de equinos utilizando os fungos predadores *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 887-892, jul./set. 2009b.

BRAGA F. R.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; GUIMARÃES, P. H. G.; FUJIWARA, R. T.; ARAUJO, J. V.; FRASSY, L. N. *In vitro* predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Ancylostoma ceylanicum* third-stage larvae. **Veterinary Microbiology**, v.146. 183–186. 2010.

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

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98 (1): 71-82, jan, 2014.

BROMAGE, G. **Llamas and Alpacas. A guide to management**. Wiltshire: Crowood Press, 2009.

CAMPOS, A. K. **Fungos nematófagos no controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes**. (Tese). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.

CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. Predatory activity of nematophagous fungi on *Ancylostoma* spp. infective larvae: evaluation *in vitro* and after passing through gastrointestinal tract of dogs. **Journal of Helminthology**; v.83:231-236, 2009.

CASTRO, A. A.; ALMEIDA, L. R.; GUEDES JÚNIOR, D.S.; FARIA, M. F. R.; FONSECA, A. H. Migração vertical de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de ruminantes em pastagens, durante a estação chuvosa, no município de Seropédica, RJ, Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (anais)**, v.12., 2002.

CEBRA, C; ANDERSON, D. E.; TIBARY, A.; VAN SAUN, R. J.; JONHSON, L. W. **Llama and Alpaca care: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health**, 1st edition, Canada: Elsevier, 2014.

CHANDRAWATHANI, P. **Problems in the Control of Nematode Parasites of Small Ruminants in Malaysia: Resistance to Anthelmintics and the Biological Control Alternative**. Doctoral thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, 2004.

COSTA, V. M. M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 65-71, 2011.

CROFTON, H. D. **Nematodes**. London: Hutchinson University Library. 160p. 1966.

DIAS, A. S., ARAÚJO, J. V., CAMPOS, A. K., BRAGA, F. R., FONSECA, T. A. Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23: 1245–1252, 2007.

FOWLER, M. E. **Camelids**. Consejo Nacional de Camélidos Sudamericanos. Zoo & Wild Animals Medicine. 2nd edition, Philadelphia, W. B. Saunders, 1986.

FOWLER, M. E. Husbandry and diseases of camelids. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**. 15 (1), 155-169, 1996.

FOWLER, M. E.; CUBAS, Z. S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa: Iowa University Press, 2001.

FREITAS, M. G. **Helmintologia Veterinária**. 6ª ed. Belo Horizonte: Precisa Editora Gráfica LTDA, 396 p. 1992.

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. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.100, Ano VI, jan, 2008.

GORDON, H. McL; WHITLOCK, A.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep feces. **Journal Council Scientific Industry Research Australia**, v. 12: 50-52, 1939.

GRAY, N. F. **Fungi attacking vermiform nematodes**. Diseases of nematodes. Boca Raton: CRC Press, p. 3-38, 1988.

GRONVOLD, J. et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v.70, n.4, p.291-297, 1996.

HONER, M. R. Relatório do I Reunião sobre epidemiologia de nematoides de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.1: 5-7, 1991.

LARSEN, M. Biological Control of Helminths. **International Journal of Parasitology**, v.29, p.139-146, 1999.

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

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. Resistência aos anti-helmínticos Benzimidazóis em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes do semiárido nordestino brasileiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p.294-300, jan-mar, 2009.

MELO, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ARAÚJO, J. V.; MELO, A. C. F. M. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematoide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.1, jan-fev, p.169-171, 2003.

MOLENTO, M. B. Resistência de helmintos em ovinos e caprinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004.

MONTEIRO, C. M.; PRATA, M. C.; FURLONG, J.; FAZA, A. P.; MENDES, A. S.; ANDALÓ, V.; MOINO-JUNIOR, A. *Heterorhabditis amazonensis* (*Rhabditidae: Heterorhabditidae*), strain RSC-5, for biological control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*Acari: Ixodidae*). **Parasitology Research**. v.106: 821-826, 2010.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Evaluation of the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* submitted to different preservation methods against gastrointestinal parasitic nematodes of bovines. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.1, p.13-17, 2002.

_____. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, 2003.

MURRAY, E.; FOWLER, M. E. Alpaca and Llama and Behavior. And this implications for illness detection. **Camelid Symposium**. University of California, 2013.

NORDBRING-HERTZ, B.; JANSSON, H. B. Fungal development, predacity, and recognition of prey in nematode destroying fungi. Current perspectives in microbial ecology. **Washington: American Society of Microbiology**, p.327-333, 1984.

OKLAHOMA STATE UNIVERSITY. **Llama**. 2007. Disponível em <http://www.oupres.com> Acesso em 10/08/13.

PACHALY, J. R. Zoologia de los Camélidos Sudamericanos. **Arquivo Ciências Veterinárias**, v.4 (1): p.81-83, 2001.

PANDIT, R.; KUNJADIA, A. Nematophagous-fungi – A potential bio-control agente for plant and animal parasitic nematodes. **Quest**. Vol 2, n. 2, mai, 2014.

PERRY, R. **Parasitologia**. Dodd, Mead & Company, p.7. 1977.

PUGH, D. G., MOBINI, S. M., HILTON, C.D. Control programs for gastrointestinal nematodes in sheep and goats. **Compendium Continous Educational Practice Veterinary**, v. 20: S112, 1998.

RICKARD, L. G.; BISHOP, J. K. Helminth parasites of Llamas (*Lama glama*) in the Pacific Northwest. **Journal of Helminthology**, v.58(1 pp. 110-115, 1991.

ROBERTS, L. S. AND JANOVY, J. **Gerald Schmidt & Larry Robert's Foundations of Parasitology**. 7 th ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2005.

SANTOS, C. V. Fungos Nematófagos. **Simpósio sobre Controle de Parasitas em Pequenos Ruminantes**. Avanços e Alternativas. São Paulo/SP, 2005.

SILVA. M. E.; ARAUJO, J. V.; BRAGA, F. R.; SOARES, F. E. F.; RODRIGUES, D. S. Controle de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de novilhas por diferentes isolados dos fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 78-83, jan-mar, 2013.

SILVA, M. E.; BRAGA, F. R.; GIVES, P. M.; MILLÁN-OROZCO, J.; URIOSTEGUI, M. A. M.; MARCELINO, L. A.; SOARES, F. E. F.; ARAUJO, A. L.; VARGAS, T. S.; AGUIAR, A. R.; SENNA, T.; RODRIGUES, M. G.; FROES, F. F. V.; ARAUJO, J. V. Fungal antagonism assessment of predatory species and producers metabolites and their effectiveness on *Haemonchus contortus* infective larvae. **BioMed Research International**, V. 2015, 2015.

SHALABY, H. A. Anthelmintics Resistance; How to overcome it? **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, n 1, p. 18-32, jan-mar, 2013.

SOUSA, A. P.; RAMOS C. I.; BELLATO, V.; SARTOR, A. P.; SCHELBAUER, C. A. Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. **Ciência Rural**, v. 38. n. 5, p. 1363-1367, 2008.

TERRY, J. A. **The use of *Duddingtonia flagrans* for gastrointestinal parasitic nematode control in feces of exotic *Artiodactylids* at Disney's Animal Kingdom**. Louisiana State University. (Master Science). Louisiana, MA, 2009.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

VIEIRA, L.S.; BENVENUTI, C.L.; NEVES, M.R.M. Resistência parasitária e método Famacha como alternativa de controle de *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes no nordeste brasileiro. **EMBRAPA Caprinos e Ovinos**, 27p. 2010.

VIEIRA, J. N. **Suscetibilidade de fungos nematófagos a fármacos antiparasitários**. (Dissertação). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2012.

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

WALLER, P. J. **Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control**. In: FAO. Animal Production and Health Division. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Asia. Final proceedings. Rome, Italy: FAO, 104p., 2002.

WEAVER, S. **Llamas and Alpacas: small-scale camelid herding for pleasure and profit**. California: Bow Tie Press, 2009.