

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE BIOLÓGICO COMO UMA NOVA
ESTRATÉGIA NO COMBATE A HELMINTOS DE PINGUINS DE
MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) COM FUNGOS
NEMATÓFAGOS**

THIAGO SENNA

VILA VELHA - ES
JUNHO/2015

UNIVERSIDADE VILA VELHA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE BIOLÓGICO COMO UMA NOVA
ESTRATÉGIA NO COMBATE A HELMINTOS DE PINGUINS DE
MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) COM FUNGOS
NEMATÓFAGOS**

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

THIAGO SENNA

VILA VELHA - ES
JUNHO/2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

S474a Senna, Thiago.

Avaliação do controle biológico como uma nova estratégia no combate a helmintos de pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) com fungos nematófagos / Thiago Senna.

– 2015.

42 f.: il.

Orientador: Fábio Ribeiro Braga.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal)
Universidade Vila Velha, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Epidemiologia Veterinária. 2. Pinguins 3. Helminto
4 - Controle biológico. I. Braga, Fábio Ribeiro. I. Universidade
Vila Velha. III. Título.

CDD 636.08944

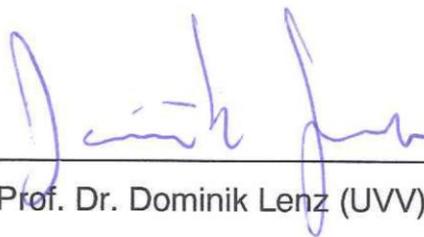
THIAGO SENNA

**AVALIAÇÃO DO CONTROLE BIOLÓGICO COMO UMA NOVA
ESTRATÉGIA NO COMBATE A HELMINTOS DE PINGUINS DE
MAGALHÃES (*Spheniscus magellanicus*) COM FUNGOS
NEMATÓFAGOS**

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

Aprovada em 29 de Junho de 2015,

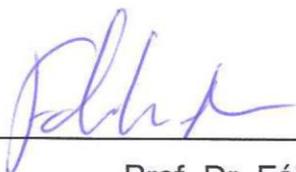
Banca examinadora:



Prof. Dr. Dominik Lenz (UVV)



Profa. Dra. Tatiana de Sousa Barbosa (UVV)



Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga (UVV)
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, minha família e a amiga, companheira e grande amor da minha vida, que me apoiou do início ao fim desse trabalho, agradeço pela paciência e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Minha mãe, Aridéia Senna pelo amor, pelo apoio e por todos os esforços que me trouxeram até aqui.

Agradeço a Isabela Cavatti por ter aparecido em minha vida, o que foi a melhor coisa que poderia ter acontecido. Pelo amor, pela companhia, por sempre me encorajar, acreditar e viver esse sonho comigo, por me ajudar, me compreender e apoiar as minhas decisões.

Aos meus familiares e amigos por me compreenderem nos muitos momentos de ausência.

Aos meus tios Aprígio, Penha e Cleunice por terem despertado em mim a vontade de me dedicar a esse mestrado, com seus inúmeros conselhos.

Ao meu Padrinho Fabio, Marlene e Caio por estarem sempre presentes, me apoiando e me incentivando.

Ao funcionário da secretaria de pós-graduação da UVV, Edson, pela paciência e disponibilidade em ajudar.

A funcionária do laboratório de Bioquímica, Emy, pelas dicas e conselhos. Aos meus colegas de Mestrado pela companhia.

Aos professores Bethânia, Bárbara, Clarisse, Tatiana, Douglas, Ary, João e Flaviana, pelas aulas, pelas palavras de incentivos, ajuda e pelas orientações.

Agradeço ao meu orientador Fábio Ribeiro Braga pelos ensinamentos, por me ajudar a superar muitos obstáculos, pela paciência e confiança depositada em mim para realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As percentagens de atividade ovicida para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 a 5 e 7 dias de interação de clamidiosporos do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) em diferentes concentrações (500, 1500, 2000 e 3000) sobre ovos de pelagicum *Contraecum* eo grupo controle. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,01$).

Figura 2 A-I. As hifas do fungo *Pochonia chlamydosporia*, (seta negra) e os ovos de *Contraecum pelagicum* destruído (seta branca) no final da experiência. Microscópio de luz. Ampliação: 10 x 40 x e objectiva. Bares: A - 156 μ m; B - 182 μ m; C - 182 μ m; D - 182 μ m; E - 124,8 μ m; M - 182 μ m; L - 119,6 μ m; H-104 μ m e I-182 μ m.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

cm: Centímetros

mm: milímetros

ml: Mililitro

Kg: quilograma

%: Porcentagem

g: grama

°C: grau Celsius

Hcl: ácido clorídrico

AA: ágar-água

CMA: corn-meal-ágar

L₂ : Larva do segundo estágio

L₃ : Larva do terceiro estágio

L₄ : Larva do quarto estágio

PI : pós infecção

DPI: Dias após a infecção

AC001: *D. flagrans*

VC4: *P. clamydosporia*

BOD: demanda química de oxigênio

SENNA, THIAGO, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Junho de 2015. **Avaliação Do Controle Biológico Como Uma Nova Estratégia No Combate A Helmintos De Pinguins De Magalhães (*Spheniscus Magellanicus*) Com Fungos Nematófagos.**
Orientador: **Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga.**

RESUMO

Contraecaecum gênero (Ascaridida: Anisakidae) é um parasita nematóide das aves Fisheating em todo o mundo. *C. pelagicum*, causa problemas gastrointestinais no pingüim de Magalhães. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um fungo ovicida (*Pochonia chlamydosporia*) em ovos de *C.pelagicum* sob diferentes concentrações (500, 1500, 2000 e 3000 por uma placa de Petri). O efeito ovicida foi avaliado de acordo com as alterações morfológicas visualizadas a partir da casca de ovo; tipo 1, efeito fisiológico sem prejuízo morfológico à casca de ovo, tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca do ovo e do embrião e do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica da casca dos ovos e embriões, além de penetração de hifas e colonização interna dos ovos. No final da experiência, houve diferença significativa ($P < 0,01$) na destruição de ovos (efeito de tipo 3) com os quatro concentrações testadas em comparação com o grupo de controle. Não foi observada diferença ($P > 0,01$) sobre a atividade ovicida entre as quatro concentrações utilizadas. Na concentração de 3000 clamidporos foi observada a destruição de *C. ovos pelagicum* foi de 46,2% após 7 dias.

Palavras-chaves: Fish, Magellanic penguin, *Contraecaecum pelagicum*, Biological control.

SENNA, THIAGO, M.Sc, Vila Velha University - ES, June 2015. **Biological Control Evaluation a New Strategy in Fighting Helmintos in Magellanic Penguins (*Spheniscus Magellanicus*) with Fungi Nematophagous.** Orientador: Dr. Fábio Ribeiro Braga.

ABSTRACT

Contraecaecum genus (Ascaridida: Anisakidae) is a nematode parasite of the fish-eating birds throughout the world. *C. pelagicum*, causes gastrointestinal problems in the Magellanic penguin. The objective of this work was evaluate the effect of an ovicidal fungus (*Pochonia chlamydosporia*) on eggs of *C. pelagicum* under different concentrations (500, 1500, 2000 and 3000 per Petri dish). The ovicidal effect was evaluated in accordance with morphological changes visualized from the eggshell; type 1, physiological effect without morphological damage to the eggshell, type 2, lytic effect with morphological alteration of the eggshell and embryo and type 3, lytic effect with morphological alteration of eggshell and embryo in addition to hyphal penetration and internal egg colonization. At the end of the experiment, there was significant difference ($P < 0.01$) in the destruction of eggs (effect of type 3) at the four tested concentrations compared to control group. No difference was observed ($P > 0.01$) on ovicidal activity between the four concentrations used. At the concentration of 3000 chlamydo spores was observed the destruction of *C. pelagicum* eggs was 46.2% after 7 days.

Key words: *Toxocara canis*; *Ancylostoma caninum*; extract

1 INTRODUÇÃO

Pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) são considerados sentinelas dos oceanos, assim o estudo dessas aves vem proporcionar um aumento do conhecimento da origem e também da intensidade dos impactos humanos sobre os habitats marinhos no hemisfério sul (Boersma *et al.*, 1990).

O Pinguim de Magalhães, *Spheniscus magellanicus* Foster, 1781 (Sphenisciformes: Spheniscidae) tem um hábito predatórios e pelágicos, migrando de suas colônias reprodutivas, através de correntes oceânicas, à margem continental brasileira para comer. (Ruoppolo *et al.*, 2004, Silva Filho & Ruoppolo 2007, Serafini *et al.* 2010). Neste percurso, alguns espécimes podem desviar-se do grupo, atingindo áreas mais distantes da costa brasileira, como o Estado Espírito Santo e outras praias, onde são resgatados. Doenças infecciosas ou não infecciosas, no entanto, estas aves ficam debilitadas e desnutridas, e muitas vezes têm que interferem no processo de reabilitação (Ruoppolo *et al.*, 2004).

Vários fatores desempenham um aumento nas taxas de enfraquecimento e de alta mortalidade de pinguins de Magalhães tudo isso durante a migração para o norte. Alguns desses fatores incluem doenças não infecciosas, contaminação do óleo, a captura por redes de pesca, trauma e ingestão de corpo estranho (Ellis & Filial 1994, Fonseca *et al.*, 2001, Mäder *et al.* 2010). As Parasitoses gastrointestinais tratam-se de um problema higiênico-sanitário comum em animais em cativeiro, sendo uma das doenças mais importantes que contribuem para o enfraquecimento destas aves (Fonseca *et al.*, 2001, Mäder *et al.* 2010).

De acordo com López-Serrano *et al.* (2000), parasitos da família Anisakidae têm relevante importância em saúde pública, com descrição de

infecções em pacientes humanos resultando em perfurações gastrintestinais, quadros obstrutivos e reações alérgicas. Por outro lado, apesar de não haver relato na literatura da infecção em humanos por *Contracecum* sp, experimentalmente mamíferos têm sido infectados, resultando em efeitos danosos ao organismo, indicando a sua importância (Barros et al., 2004). Contudo, este é o primeiro passo para a utilização de fungos nematófagos sobre ovos e ou larvas de *C. pelagicum* sendo o mesmo justificado pelo seu caráter inovador.

Em relação à utilização e produção de clamidósporos, estruturas resistentes, de fungos nematófagos, muito tem se estudado a respeito das diferenças percentuais para a sua atividade predatória (Braga et al. 2010; Araujo et al. 2012). Dessa forma, no presente projeto será utilizado um fungo ovicida da espécie *P. chlamydosporia* e um fungo predador da espécie *Dintonia flagrans*. Os fungos serão utilizados em distintas concentrações demonstrando a sua eficácia na destruição dos ovos e das larvas de *C. pelagicum* ao logo do experimento e, por ventura seu real papel de biocontrolador.

Em prévios trabalhos, a literatura tem demonstrado que o fungo *P. chlamydosporia* pode ser utilizado com sucesso no controle biológico de helmintos potencialmente zoonóticos (Araujo et al. 2012). A produção de clamidósporos é uma das principais características que direcionam possivelmente se um fungo poderia ser utilizado no controle ambiental de ovos de helmintos parasitas gastrintestinais (Campos et al., 2008). Estas estruturas permitem aos fungos nematófagos a capacidade de passar através do trato gastrointestinal de animais domésticos e bem como de serem prontamente dispersos no ambiente externo, agindo então como um dispersor natural (Araujo et al. 2004).

Além disso, em relação ao controle biológico de ovos de helmintos poucos trabalhos são delineados com a intenção de se comparar duas ou mais concentrações de clamidósporos, com o intuito final de se chegar a uma “dose” comparativamente proporcional a que deve ser encontrada naturalmente no ambiente (Terril et al., 2004). Outro aspecto importante observado na eficiência

da destruição de ovos de helmintos por *P. chlamydosporia* é o seu crescimento a partir de meios de cultura ditos “pobres”. Nessa questão a literatura menciona que esse fungo se comporta de maneiras distintas de acordo com o meio de cultura utilizado mantendo a sua capacidade ovicida a partir do contato com os ovos. Eren e Pramer (1965) mencionam que o fornecimento periódico de nematóides a fungos nematófagos em meio de cultura pobre em nutrientes reduziria seu crescimento saprófita aumentando sua atividade como antagonista natural. Partindo-se dessa premissa, em recente trabalho Braga *et al.* (2011b) propuseram que não apenas o meio de cultura mas também a quantidade de clamidósporos a ser utilizada no controle in vitro de ovos de helmintos seriam duas características importantíssimas do ponto de vista biológico. No presente trabalho, observou-se que as concentrações de 2000 e 3000 clamidósporos apresentaram os maiores percentuais ovicidas. Dessa forma, os resultados apresentados mais uma vez sugerem que a concentração de clamidósporos e o meio ágar-água 2%, mesmo sendo considerado um meio de cultura “pobre”, podem influenciar na predação dos ovos.

Por outro lado, o gênero *Duddingtonia* é caracterizado por produzir vários conídios na extremidade dos conidióforos. A presença do helminto induz à produção de armadilhas. Durante o processo de envelhecimento aumenta sua produção de clamidósporos. Estes conídios apresentam formato que variar de elíptico a ovóide com septo mediano (Mota *et al.*, 2003). *D. flagrans* é a espécie de fungo mais promissora empregada no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos, realiza predação de helmintos por meio de hifas adesivas simples, e produz conídios com 25-50 µm de comprimento por 10-15 µm de largura. Seus esporos podem ser de dois tipos: conídios com paredes delgadas em conidióforos eretos em número limitado, ou esporos de paredes grossas mais resistentes - clamidósporos. Faedo *et al.* (2000) mencionam que *D. flagrans* afeta predominantemente helmintos cujos ovos possuem estágio de desenvolvimento curto, mas podem sobreviver ocasionalmente por longos períodos afetando também nematóides cujos ovos eclodem após 12-16 semanas, pois enquanto a larva reside no ovo, esse fungo é incapaz de capturá-las. Contudo a atividade sobre ovos de helmintos tem sido demonstrada in vitro (Braga *et al.*, 2007). Sobre larvas de

helmintos potencialmente zoonóticos este fungo tem sido utilizado em condições naturais e laboratoriais com sucesso (Carvalho *et al.*, 2011). Partindo-se então dessa premissa, deve ser ressaltado que a colonização ambiental e por ventura a captura e destruição de L3 de nematoides pode vir a ser uma ferramenta a mais na diminuição das recidivas por infecções helmínticas.

Em relação à produção de proteases extracelulares, acredita-se que as mesmas estejam diretamente envolvidas em diversas etapas da infecção, como liberação de nutrientes para o crescimento do microrganismo, penetração da cutícula através de degradação protéica e digestão do tecido hospedeiro (Tian *et al.*, 2007). Nesse contexto, Braga *et al.* (2009) demonstraram que fungos nematófagos crescidos em meio de cultura sólido foram eficientes na captura e destruição de larvas de nematóides. Contudo, a literatura não registra nenhum relato da aplicação de enzimas proteolíticas produzidas por fungos nematófagos e utilizadas no controle de ovos de ascarídeos.

Todavia, a grande diversidade de gêneros de helmintos sugere a utilização de “agentes biocontroladores” em vários estudos que apresentem condições laboratoriais e nesse contexto, a literatura relata que as espécies *P. chlamydosporia* e *D. flagrans* tem demonstrado sua atividade ovicida e ou proteolítica sobre uma ampla variedade de ovos de nematóides potencialmente zoonóticos (Braga *et al.*, 2007; Araujo *et al.* 2012) de trematóides (Braga *et al.*, 2008a, b) e cestóides (Araujo *et al.*, 2009, 2012). Em relação a utilização de fungos nematófagos em trabalhos envolvendo parasitos gastrintestinais de animais silvestres a literatura tem mencionado algumas incursões de sucesso, dentre elas destacam-se os relatos de Braga *et al.*, (2013) sobre larvas de *Libyotrionglylus douglassii* de avestruzes e ovos de *Austroxyuris finlaysony*, um oxiurídeo de gambás (Braga *et al.*, 2010).

Contudo, o presente projeto será o primeiro relato da infecção de clamidósporos sobre ovos e ou lavas de *C. pelagicum* sugerindo uma nova abordagem “experimental” para a utilização desse fungo em futuros trabalhos, partindo do ponto de vista de que o Estado do Espírito Santo é carente em

relação às pesquisas envolvendo o controle integrado de verminoses de humanos, animais domésticos e silvestres, uma vez que o ciclo da maioria desses “parasitos” se completa no ambiente externo que serve como potencial fonte de infecção.

2 JUSTIFICATIVA

O pingüim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) é endêmico da América do Sul, com populações distribuídas ao longo da costa Patagônica (Argentina e Chile) e Ilhas Malvinas, apresentando a maior abundância entre os pingüins de áreas temperadas. Contudo, nos últimos anos, com a crescente interferência humana no meio ambiente, o número de pinguins que chegam aqui tem aumentado de forma alarmante. Sua ocorrência no estado do Espírito Santo (ES) é comum, no entanto, dados sobre o conhecimento da sua helmintofauna são escassos e isso deve ser melhor investigado.

De acordo com Mayorga et al. (2011), alguns fatores têm sido apontados no enfraquecimento e mortalidade dos pinguins-de-Magalhães durante a migração, entre eles destacam-se: (1) a contaminação dos oceanos com petróleo e derivados; (2) os acidentes com redes de pesca; (3) a ingestão de detritos antropogênicos e (4) parasitoses gastrointestinais. Contudo, especificamente, em relação às parasitoses gastrintestinais, geralmente existe uma variada helmintofauna, principalmente de nematóides da ordem Ascaridia, família Anisakidae com grande potencial zoonótico (Wharton et al., 1999; Martins et al., 2005; Carvalho et al., 2012). Os anisakideos estão associados a organismos aquáticos (peixes e mamíferos marinhos) e aves piscívoras e nesse contexto inclui-se o gênero *Contracaecum*. Dessa forma, pesquisas que contemplem o controle destes parasitos são bem vindas.

No Brasil, são realizados vários estudos em bacias hidrográficas mencionando a ocorrência de helmintos de interesse higiênico-sanitário que ocorrem em peixes piscívoros e em aves aquáticas como o pingüim de Magalhães (Santos et al. 1984; Garbin et al., 2007; Ederli et al., 2009). Dessa forma, estes animais tornam-se importantes instrumentos de educação

ambiental e científica, informando direta e indiretamente o público visitante sobre o papel da fauna nos ecossistemas e a necessidade de sua preservação (IPRAM).

Em pingüins de Magalhães as alterações observadas por *C. pelagicum* estão relacionadas a processos inflamatórios e obstrução, podendo levar a morte nesses animais. Sendo assim, a presente proposta pode ser uma ferramenta alternativa ao controle de parasitos gastrintestinais nesses animais, principalmente aqueles em recuperação nos centros de reabilitação em território nacional, especificamente, chamando-se a atenção para o Instituto de Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM) no ES.

Por outro lado, o conceito da utilização de organismos vivos, e nesse caso de fungos, contra helmintoses de uma forma geral é uma abordagem que tem sido bem estudada e empregada. Contudo, devem-se conhecer alguns fatores que são importantes para a utilização destes organismos e dentre eles destacam-se: (1) a observação da interação destes organismos sobre uma grande diversidade de parasitos gastrintestinais, partindo-se do princípio que existem diferenças entre os vários gêneros de helmintos gastrintestinais; (2) testar a sua atividade predatória e ovicida em Em relação à observação da interação destes organismos sobre uma grande diversidade de parasitos gastrintestinais, vários pesquisadores têm demonstrado que a utilização de fungos nematófagos pode vir a ser uma ferramenta complementar ao controle químico, partindo-se da simples premissa de que existem as fases de vida livre e parasitária das quais os helmintos parasitos dispõem em seu ciclo biológico (Braga et al., 2009, 2010).

Em relação aos testes de viabilidade, *in vitro* e *in vivo*, estes são importantes do ponto de vista biológico, uma vez que se pretende mimetizar a atuação destes fungos a nível ambiental e, nesse contexto os trabalhos têm convergido para a utilização de gêneros de fungos com capacidade de suportarem situações de “stress” extremo, como por exemplo a passagem pelo aparelho gastrintestinal de animais domésticos e após isso de germinarem nas fezes (Araújo et al., 2004).

E por fim, a preocupação de se determinar qual a condição ideal para a sua utilização, onde cada vez mais pesquisas são requeridas com essa finalidade.

De acordo, Mota et al. (2003), à utilização de fungos com comprovada atividade sobre ovos e ou larvas de nematóides, estes podem ser úteis como uma ferramenta complementar, mesmo em condições experimentais. Além disso, são inofensivos para a saúde do homem, do meio ambiente e para os animais. Estes organismos podem vir a serem utilizados no controle de ovos e ou larvas de helmintos de interesse para a saúde pública, em especial aqui, sobre os ovos e ou larvas de *C. pelagicum* potencialmente zoonótico.

Neste contexto, os estudos sobre a interação de fungos ovicidas é justificada pela sua importância na saúde pública, saúde animal e biodiversidade, atendo-se junstamente para a alta capacidade de resistência que ovos de geohelmintos têm quando presentes no ambiente externo, atuando diretamente ou indiretamente como uma fonte de contaminação para o humano.

Por outro lado, o uso de fungos nematófagos presentes no ambiente como controle é viável principalmente pela viabilidade de dispersão ambiental das estruturas resistentes que estes organismos possuem, clamidosporos e ou conídios, que colonizam o ambiente externo contaminado (Lysek et al. 1976, 1982; Araujo et al., 2011; Braga et al., 2012b). Nesse sentido, fungos predadores podem ser importantes na destruição de larvas infectantes de helmintos parasitos gastrintestais potencialmente zoonóticos (Braga et al., 2011a, Araujo et al., 2009).

Todavia, sugerem-se mais estudos sobre a ação larvicida das proteases purificadas e do extrato bruto, para melhor entender o mecanismo molecular do processo de infecção dos nematóides por fungos nematófagos, visando embasar o desenvolvimento de formulações fúngicas para uso no controle biológico e sua produção comercial (Soares et al., 2012).

Rezende (2009) menciona que a comunidade parasitária de uma espécie pode revelar informações importantes a respeito de sua biologia e ecologia e estudos parasitológicos em pingüins, assim como em outros animais migratórios, podem indicar mudanças sazonais na dieta e relações tróficas temporárias durante a migração, tornando-se uma ferramenta útil na aquisição de informações dificilmente obtidas por outros meios. Dessa forma, o presente projeto justifica-se pelo seu caráter inovador na utilização do controle biológico sobre ovos e larvas de nematóides parasitos gastrintestinais de pingüins de Magalhães. Além disso, os autores sugerem fortemente que esse é o primeiro passo para a realização de mais estudos em parceria com outras organizações que contemplem a conservação de espécies da vida marinha e seu habitat.

Além disso, o Estado do Espírito Santo é carente em relação às pesquisas envolvendo o controle de parasitoses gastrintestinais em animais domésticos e silvestres, sendo essa uma promissora linha de pesquisa biosustentável.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 NEMATÓIDE GASTRINTESTINAL DE PINGUINS DE MAGALHÃES VERSUS FUNGOS NEMATÓFAGOS

Contracaecum pelagicum é um nematoide pertencente à família Anisakidae. É hospedeiro intermediário e paratênico de invertebrados aquáticos e peixes, respectivamente. Contudo, os hospedeiros definitivos das espécies do gênero *Contracaecum* são aves e mamíferos piscívoros (Anderson, 2000). No Brasil, foram realizados vários estudos em bacias hidrográficas mencionando a ocorrência de helmintos de interesse higiênico-sanitário que ocorrem em peixes piscívoros e em aves aquáticas e dentre essas o pinguim de Magalhães (Santos *et al.* 1984; Garbin *et al.* 2007; Ederli *et al.* 2009). Nestas aves as alterações observadas por *C. pelagicum* estão relacionadas a processos inflamatórios e obstrução e morte.

Atualmente, pesquisadores de todo mundo buscam medidas alternativas para o controle destas e de outras endoparasitoses de animais domésticos e silvestres, visando à diminuição do emprego de quimioterápicos e, conseqüentemente, a redução dos níveis de poluentes no ambiente e nos produtos de origem animal (Mota *et al.*, 2003). Dentre as diversas propostas que têm sido trabalhadas com o intuito de melhorar esse controle, sugere-se o controle biológico, como uma alternativa viável e promissora que reduz as infecções causadas por helmintos parasitos gastrintestinais, e cuja ação se dá por meio de organismos vivos que atuam como antagonistas naturais no ambiente (Araújo *et al.*, 2004). Entre esses antagonistas estão os fungos nematófagos que possuem a capacidade predatória sobre os helmintos parasitos gastrintestinais de animais domésticos, destacando-se os fungos ovicida do gênero *Pochonia*, já comprovados como agentes em potencial para o controle biológico (Frassy *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2008a; 2011a)

Os fungos nematófagos têm atraído a atenção de pesquisadores desde que sua função como predador de nematóides foi reconhecida no final do século XIX por Zopf, em 1888 (Morton *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2007).

Uma grande abundância de antagonistas naturais dos helmintos, entre eles protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos já são descritos como controladores biológicos. Os fungos nematófagos se apresentam como inimigos naturais de helmintos parasitos gastrintestinais, podendo ser encontrados nos ambientes mais distintos e, atualmente têm demonstrando bons resultados como agentes de biocontrole (Larsen, 1999; Kerry, 2000).

Fungos nematófagos compreendem diferentes tipos de fungos, são cosmopolitas, ocorrendo em solos naturais, solos agricultáveis e em todos os tipos de matéria orgânica em decomposição. No ambiente esses fungos são biologicamente muito importantes, desempenhando um papel na reciclagem de carbono, nitrogênio e outros elementos que são originados a partir da degradação do nematóide (Braga *et al.*, 2012b).

Segundo Larsen (1999), um fungo nematófago pode coexistir no ambiente sob duas formas: como um agente saprófita ou como um parasita. Além disso, ainda são descritos como organismos imóveis e possuidores de parede celular bem semelhante à parede celular dos vegetais, principalmente quanto à composição química e estrutural. Já em relação à sua suplementação, por serem também parasitos obrigatórios, esses fungos podem se alimentar de uma variedade de helmintos de vida livre ou mesmo viverem sobre a matéria orgânica, nutrindo-se assim como saprófitas (Waller e Faedo, 1996; Larsen *et al.*, 1995; Waller, 2005).

De acordo com Mota *et al.* (2003), mais de 150 espécies de fungos nematófagos já foram catalogados. Esses fungos também são conhecidos como fungos destruidores de helmintos, mas por apresentarem características ovicidas podem também preda ovos de helmintos. Dessa forma, comportando-se como antagonistas naturais, são capazes de promover a captura, a morte ou

mesmo a sua destruição, contribuindo para que os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade diminuam e se enfatize a necessidade da empregabilidade dos programas integrados de controle parasitário, seleção de animais mais resistentes e confecção de vacinas, associado ao controle biológico com a utilização desses fungos (Araújo et al., 2004).

Os fungos nematófagos são divididos em três grupos: endoparasitas, predadores e oportunistas, que são parasitas de ovos, cistos e fêmeas. Essa divisão também equivale à sua morfologia e as características funcionais que estão associadas com a produção de estruturas especializadas para a captura de helmintos. Existe ainda um quarto grupo conhecido como fungos produtores de metabólitos tóxicos, que embora pouco estudados também seja classificados como fungos nematófagos (Nordbring-Herts e Stahammar, 1978; Araújo et al., 2004; Braga et al., 2007).

Os fungos oportunistas além de parasitarem ovos, cistos e fêmeas de fitonematóides e de helmintos, são saprofíticos e, por essa razão, não dependem da presença do parasita no solo para a sua sobrevivência, sendo por isso facilmente cultivado em laboratório. Suas hifas penetram a casca do ovo através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada quitínica e lipídica adjacente. Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina torna vacuolizada e a camada de lipídios torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior (Araújo et al. 2004; Braga et al., 2007; 2010).

É um grupo bastante promissor para ser empregado no controle biológico de helmintos, principalmente porque reduzem em cerca de 70 a 90% os níveis de ovos viáveis no solo. Entretanto, muitas vezes o que impede sua plena eficácia é a estratégia desenvolvida pelos parasitos. A maioria desses helmintos parasitos gastrintestinais produz ovos que rapidamente darão origem

a larvas, dificultando seu processo de interação com os ovos (Lopez-Llorca et al., 2008; Braga et al., 2007; 2011a, 2012b).

O parasitismo de ovos por fungos é um importante fenômeno biológico que tem nas espécies *Pochonia chlamydosporia* (syn. *Verticillium chlamydosporium* Goddard), *Paecilomyces lilacinus* e *Dactyella ovoparasitica* seus principais representantes com significativa atividade ovicida (Lysek et al., 1982).

Após um prolongado estudo de observação, Lysek (1976) estabeleceu um método qualitativo para classificar a atividade ovicida. Esse método primeiramente proposto sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* determina que, o mecanismo de ação de um fungo oportunista está baseado em três tipos básicos de atividade ovicida, com sete subtipos: (1) fisiológica, com efeito bioquímico sem danos morfológicos a casca do ovo, (2) efeito bioquímico lítico, com alteração morfológica progressiva da casca do ovo e danos ao embrião e (3) efeito lítico e morfológico, com penetração do ovo, ataque e morte ao embrião. Em reação à sua subdivisão segue-se: (1a) onde o fungo irá inibir o desenvolvimento embrionário com início da sua atividade ovicida, é reconhecido como um efeito temporário; (1b) os metabólitos do fungo proporcionarão um desenvolvimento anormal das larvas com número aberrante de cromossomos; (2a) ocorrerá a desintegração e remoção enzimática da casca do ovo, e após excessivas lesões dará início à fase de penetração e danos ao embrião; (2b) acontecerá uma mudança na permeabilidade da casca, modificação da barreira osmótica e por consequência vacuolização e desintegração do embrião; (3a) o micélio do fungo penetrará em apenas um local da casca intacta do ovo, e promoverá um ataque e cessamento no desenvolvimento do embrião; (3b) o micélio do fungo penetrará em vários locais da casca promovendo a destruição do embrião e (3c) os fungos iniciarão o processo de ataque enzimático e consequentemente morte ao embrião.

A classificação da atividade ovicida atualmente foi simplificada e é estabelecida de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca, onde são visualizadas as hifas

aderidas à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo (Lysek, 1976; Braga et al., 2008a).

O gênero *Pochonia* é um dos mais estudados no controle de helmintos potencialmente nocivos à agricultura e, atualmente, vem se destacando também no combate a seus ovos. O fungo *P. chlamydosporia*, foi encontrado no Alabama, Estados Unidos, em 1981 parasitando ovos e fêmeas de *Meloydogine* sp, sendo considerado como um dos agentes mais promissores para o manejo e controle dos problemas causado por fitonematóides. É também empregado com sucesso na redução da taxa de eclosão de ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lysek, 1976). Essa espécie, uma das mais promissoras desse gênero, é um deuteromyceto parasito facultativo de ovos de nematóides formadores de cistos em raízes e galhas, possuindo ampla distribuição. Caracteriza-se por seu rápido crescimento, produzindo colônias com 15-40 µm de diâmetro. Seus conídios possuem formato variando de elíptico, globoso e algumas vezes bacilar, possui conidióforo pequeno e hifas diferenciadas, que em algumas situações podem ser eretas. No passado, era conhecido como *V. chlamydosporium* (Gams e Zare, 2001).

De acordo com Mauchline et al. (2003), *P. chlamydosporia* tem sido implicado como supressor de vários gêneros de helmintos. Essa espécie parasita ovos de helmintos através de estruturas conhecidas como apressórios, formados a partir de hifas indiferenciadas quando em contato com esses ovos. Além disso, Morton et al. (2003) sugerem a existência de uma protease serino-alcalina, denominada como VCP1, que parcialmente tem sido considerada como um dos elementos que caracterizam seu mecanismo de ação. Os ovos parasitados dilatam-se graças a alterações ultraestruturais e, posteriormente ocorre um enfraquecimento da camada vitelínica por ação de enzimas, como proteases, quitinases e enzimas hidrolíticas, que removem a membrana vitelínica mais externa e degradam a quitina (Kerry, 2000). *P. chlamydosporia* tem importantes características que são requeridas para que um fungo seja um

efetivo agente controle biológico, eficiência na redução das populações de helmintos, longevidade no solo e produção de clamidósporos (Terril et al., 2004).

3.2. Proteases

Segundo a comissão de Classificação Enzimática, proteases pertencem ao grupo 3 (hidrolases), e sub-grupo 4 (que hidrolisa ligação peptídica). Proteases podem ser divididas em dois grandes grupos, com base na sua capacidade para hidrolisar N- ou C- ligações peptídicas terminais (exopeptidases) ou ligações peptídicas internas (endopeptidases). Estas ainda podem ser divididas em aminopeptidases e carboxipeptidases, dependendo de qual extremidade da proteína o resíduo de aminoácido é removido. Também são distinguidas pela presença ou ausência de grupos carregados nas posições em relação ao sítio suscetível e são classificados em uma série de categorias: seu pH ótimo; especificidade de substrato; ou homologia com as proteínas conhecidas (Sumantha et al.,

Em relação ao controle biológico de pragas, as proteases, purificadas ou no extrato bruto, demonstram efetiva atividade nematicida sobre nematóides parasitas de plantas e animais (Tian et al., 2007; Mansfield et al., 1992), relacionando a virulência dos fungos nematófagos com a secreção de proteases (Lopez-Llorca et al., 2008). O mecanismo molecular detalhado da ação patogênica de fungos contra nematóides ainda não foi completamente elucidado. No entanto, cada vez mais se evidencia que enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo proteases, collagenases e quitinases devem estar envolvidas na penetração da cutícula e na digestão celular do nematóide (Huang et al., 2004).

Uma dura cutícula de colágeno e a estrutura protéica da casca do ovo de nematóides parasitas atuam como uma barreira estrutural efetiva contra a invasão por microrganismos. Para efetivar a ação parasitária, os microrganismos devem ser capazes de penetrar essas barreiras e se estabelecerem dentro dos hospedeiros (Khan et al., 2003). Braga et al. (2010a) demonstraram que o extrato bruto enzimático de *P. chlamydosporia*, fungo

nematóforo do grupo ovicida, apresentou atividade efetiva sobre larvas e ovos de nematóides. Em trabalho recente, Braga et al. (2011c) demonstraram que o extrato bruto proteolítico de *D. flagrans* (AC001), fungo predador, foi eficaz na destruição de larvas de primeiro estágio de *A. vasorum*, um nematóide gastrointestinal de cães. Além disso, Braga et al. (2012) purificaram e caracterizaram uma protease produzida por *D. flagrans* (AC001) e demonstraram a sua ação sobre larvas de ciatostomíneos.

3.3. Controle Biológico

Segundo Waller (2005), o método convencional de controlar nematoides parasitos de ruminantes domésticos é a utilização de drogas antihelmínticas sintéticas. Entretanto, Sanyal (2001) menciona até três razões para se buscar novas alternativas de controle desses parasitos, sendo essas: (1) A crescente incidência da resistência aos antihelmínticos. (2) o desejo de minimizar os resíduos em alimentos e (3) a necessidade crescente para se reduzir a degradação ambiental provocada pelas intervenções químicas. Nesse contexto, a utilização de fungos nematóforos para o controle desses parasitos gastrointestinais tem sido demonstrada com sucesso, em condições laboratoriais e a campo (Araujo et al. 2009; Braga et al. 2010). Esses organismos capturam e destroem larvas infectantes de nematoides parasitos de ruminantes domésticos, equinos, cães e gatos. A espécie *D. flagrans* (isolado AC001) é considerada a mais promissora devido a sua grande produção de clamidósporos, estruturas de resistência. Além disso, é classificada como predadora e pode produzir uma série de enzimas e, dentre essas as proteases. De acordo com Lopez-Llorca al. (2008) um importante fator de virulência de fungos nematóforos é a produção de proteases extracelulares. Em trabalho recente, Braga et al. (2010) observaram que o meio de cultura otimizado para produção de proteases do fungo *D. flagrans* (AC001) foi eficiente na destruição de larvas infectantes de ciatostomíneos em condições laboratoriais, entretanto, esses autores chamam a atenção para a necessidade da caracterização dessas proteases produzidas pelo isolado AC001.

Contudo, não existem trabalhos na literatura que mencionam a atividade proteolítica do fungo *D. flagrans* sobre larvas de helmintos de pingüins, podendo o mesmo colaborar com futuras pesquisas acadêmicas nessa área.

4 OBJETIVOS

- O presente projeto possibilitou a ênfase na relação do controle biológico com o nematóide *Contracaecum pelagicum*, helminto gastrintestinal do Pingüim de Magalhães, uma espécie nunca estudada com esse propósito.
- Nesse sentido, a proposta poderá auxiliar na identificação da helmintofauna do pingüim de Magalhães que é pouco estudada, englobando a família Anisakidae, superfamília Ascaridoidea.
- Outra importante inserção poderá ser o estímulo ao conhecimento do controle biológico de anisaquídeos realizado com fungos nematófagos que são originados de solo brasileiro e podem também ser extraídos do solo do Espírito Santo e potencialmente estudados no futuro.

5 METODOLOGIA

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UVV) da Universidade Vila Velha (CEUA-UVV), conforme parecer consubstanciado nº 292/2013.

5.2. OBTENÇÃO DOS FUNGOS

No presente projeto, serão utilizados os fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. Estes fungos são provenientes do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. No presente contexto, o Prof. Dr. Fabio Ribeiro Braga faz parte do grupo de pesquisa da Universidade Federal de Viçosa e por meio da supervisão do Prof. Dr. Jackson Victor de Araújo e detentor da manutenção destes organismos tem obtido sua permissão conjuntamente com a instituição.

A seguir, das bordas das colônias fúngicas crescidas livres de contaminação, discos de ágar com aproximadamente 4 mm de diâmetro, serão retirados, com auxílio de uma alça de platina e inoculados em placas de Petri contendo 20 mL de meio YPSSA (extrato de levedura, 4 g; K₂HPO₄, 1 g; MgSO₄, 0,5 g; amido solúvel, 20 g; Agar, 20 g; água suficiente para 1 L de solução). Em seguida, estas placas serão incubadas em estufa BOD a 25° C, por 28 dias e em ausência de luz. Após este período, a superfície das placas será lavada com 10 mL de água destilada com auxílio de um pincel. A suspensão contida nas placas será passada através de uma peneira acoplada a um recipiente plástico para eliminação dos fragmentos de micélio. A identificação dos clamidósporos será realizada de acordo com Gams e Zare (2001) e Araújo et al. (2004). Os esporos recuperados serão quantificados em dez contagens em câmara de Neubauer e qualificados (clamidósporos) de acordo em 3 alíquotas de 10µL. Após a quantificação e qualificação dos esporos, será feita a diluição para as concentrações desejadas (500, 1500, 2000 e 3000).

5.3. INSTITUTO DE PESQUISA E REABILITAÇÃO DE ANIMAIS MARINHOS (IPRAM)

O presente Instituto é uma associação civil sem fins lucrativos que, dentre suas principais atividades, realiza a reabilitação de pingüins, trabalhando em conjunto com entidades governamentais nas esferas federais e estaduais. O mesmo tem uma equipe multidisciplinar e é presidido pelo Médico Veterinário, Luis Felipe Silva Pereira Mayorga.

5.4. OBTENÇÃO DE OVOS E LARVAS DE *Contraecum pelagicum*

Exemplares adultos do nematoide *C. pelagicum* serão recebidos por meio de doação do Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM), localizado no estado do Espírito Santo. Esse instituto tem renome nacional na conservação de vida marinha, em especial de pingüins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) e durante a realização de necropsias os profissionais envolvidos têm mencionado a presença de nematóides parasitos gastrintestinais do gênero *Contraecum*. A seguir, exemplares fêmeas adultas destes nematóides serão recuperadas durante a necropsia e, das mesmas serão obtidos os ovos por meio de dissecação do útero de acordo com a metodologia modificada de Braga *et al.*, (2010a).

As larvas, as fêmeas de *C. pelagicum* foram selecionadas no Laboratório Clínico (UVV) para a extração dos ovos. A seguir, os ovos foram diluídos em 200 ml água do mar filtrada e autoclavada, e prontamente divididos em placas de Petri e incubados a 18°C no escuro. Estas placas foram diariamente observadas até o início da eclosão. Logo após, as estimativas do número inicial de ovos e o sucesso de eclosão foram obtidos utilizando câmara de McMaster (Ueno e Gonçalves, 1998).

5.5. IDENTIFICAÇÃO DOS NEMATÓIDES

A identificação de indivíduos adultos dos nematóides e dos ovos seguiu os critérios estabelecidos por Yamaguti (1961) e Taylor *et al.* (2007). A mesma foi realizada pelo Prof. Dr. Fabio Ribeiro Braga, com especialidade na

área e a seguir os ovos serão lavados 10 vezes com água destilada por centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos de cada vez, descartando-se o sobrenadante após centrifugação.

Ensaio A

Para compor o ensaio experimental A, os ovos de *C. pelagicum* serão vertidos sobre a superfície de placas de Petri de 9,0cm de diâmetro contendo o meio AA2% nas seguintes concentrações de clamidósporos (500, 1500, 2000 e 3000). Sendo realizadas 6 repetições para cada grupo. Nos tratamentos, cada placa continha mil ovos de *C. pelagicum* com apenas uma das concentrações e o grupo controle com apenas mil ovos. Nos intervalos de 5 e 7 dias, cem ovos serão retirados de cada placa dos tratamentos e do controle sem clamidósporos de acordo com a técnica descrita por Araújo et al. (1995), sendo então avaliados em objetiva de 40x de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek et al. (1982): tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca e tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio A

Avaliação da capacidade ovicida do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *C.pelagicum*.

Os resultados esperados neste ensaio estarão relacionados aos percentuais de atividade ovicida que poderá ser aferido a partir dos efeitos dos tipos 1, 2 e 3, de acordo com os dias estudados, demonstrando a possível interação ao final do experimento do fungo *P. chlamydosporia* sobre os ovos de *Contraecaecum pelagicum*. Ao final do experimento, Foi observada a diferença se houve ou não diferença estatística na destruição dos ovos (efeito do tipo 3) em relação ao grupo controle. Por meio de microscopia de luz, objetiva de 10x

e 40x poderá ser observada a colonização e posterior destruição dos ovos de *C. pelagicum* pelos fungos utilizados. Foi demonstrado o intervalo de tempo em que à ação do fungo foi maior e com essa informação mais estudos poderão ser utilizados na pesquisa com controle biológico de nematoides gastrintestinais.

Os resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 a 5 e 7 dias de interação em diferentes concentrações (500, 1500, 2000 e 3000) de clamidporos do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) são mostrados na Figura 1.

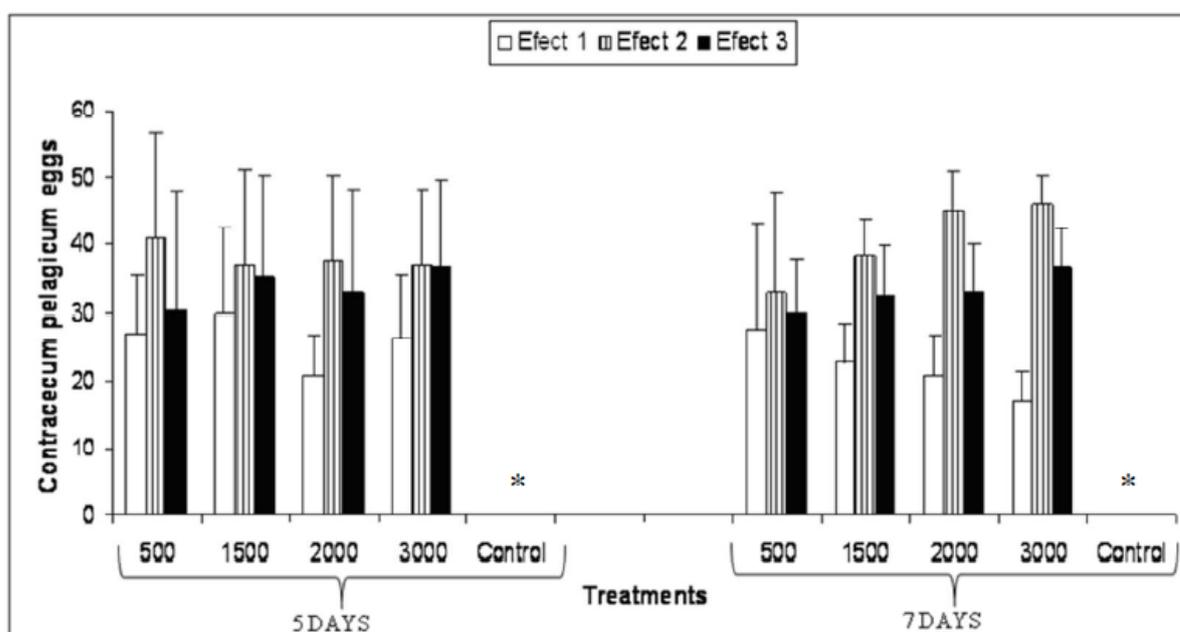


Figura 1. As percentagens de atividade ovicida para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 a 5 e 7 dias de interação de clamidoporos do fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) em diferentes concentrações (500, 1500, 2000 e 3000) sobre ovos de pelagicum *Contraeaecum* eo grupo controle. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,01$).

No final da experiência, houve diferença significativa ($P < 0,01$) na destruição de ovos (efeito do tipo 3) com os quatro concentrações testadas em comparação com o grupo de controle. Não foi observada diferença ($P > 0,01$) sobre a atividade ovicida entre as quatro concentrações usadas. Através de luz câmara ambiental a 25° C durante 28 dias e na ausência de luz. Após este

período, a superfície das placas foi lavada com água destilada com a ajuda de um pincel. A suspensão contida nas placas foi passada através de um crivo ligado a um recipiente de plástico para a remoção de fragmentos de micélio. A identificação de clamidporos foi realizada de acordo com Gams e Zare (2001). Esporos recuperados foram quantificados em dez contagens em câmara de Neubauer e qualificados (clamidosporos) de acordo com três alíquotas de 10½. Após a quantificação e qualificação dos esporos, a diluição para as concentrações desejadas (500, 1500, 2000 e 3000) foi realizada. Através de luz microscopia, 40x e 10x objetiva, foram observados ovos de *C. pelagicum* destruída pelo fungo *Pochonia chlamydosporia* (VC4) no final da experiência (Fig. 2A-I). As percentagens mais elevadas para o efeito do tipo 3 foram observados a concentrações de 2000 e 3000 clamidporos no final da experiência (7 dias) com percentagens de destruição de 45,3% e 46,2%, respectivamente.

Para compor o ensaio experimental, o *C. pelagicum* ovos foram transferidos sobre a superfície de placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro contendo o meio de 2% de WA nas seguintes concentrações de clamidporos (500, 1500, 2000 e 3000). Seis repetições foram realizadas para cada grupo. Nos tratamentos, cada placa continha mil ovos de *C. pelagicum* com apenas uma das concentrações e do grupo de controlo com apenas mil ovos. Nos intervalos de 5 e 7 dias, cem ovos foram removidos de cada placa dos tratamentos e controlo sem clamidporos de acordo com a técnica descrita por Araújo *et al.* (1995), e, em seguida, avaliado em 40x objetiva, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek *et al.* (1982). Os dados de cada intervalo de estudo, foram submetidos a um teste não paramétrico de Friedman com 1% de probabilidade Ayres *et al.* (2003).

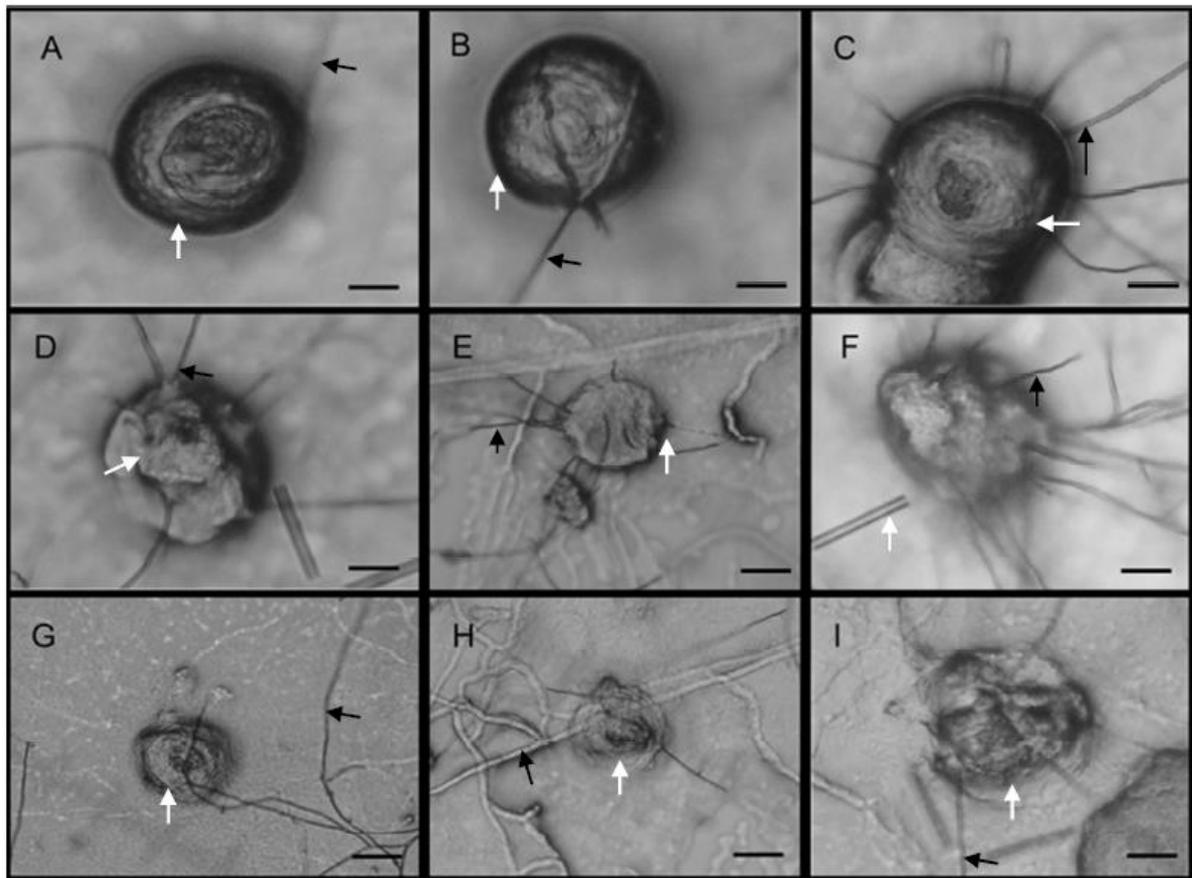


Figura 2 A-I. As hifas do fungo *Pochonia chlamydosporia*, (seta negra) e os ovos de *Contracaecum pelagicum* destruído (seta branca) no final da experiência. Microscópio de luz. Ampliação: 10 x 40 x e objectiva. Bares: A - 156 μ m; B - 182 μ m; C - 182? μ m; D - 182 μ m; E - 124,8 μ m; F - 182 μ m; G - 119,6 μ m; H - 104 μ m e I - 182 μ m.

Em Pinguins de Magalhães as mudanças observadas por *C. pelagicum* estão relacionados à inflamação e obstrução, levando à morte nestes animais. Por outro lado, de acordo com López-Serrano *et al.* (2000), esses parasitas têm significativa importância para a saúde pública, com a descrição das infecções em humanos, resultando em perfurações gastrointestinais, reações alérgicas e obstrutivas. Além disso, embora não haja relato na literatura de infecção humana por *Contracaecum* sp., Mamíferos foram experimentalmente infectados, resultando em efeitos prejudiciais para o organismo, indicando a sua importância (Barros *et al.*, 2004).

Quanto ao uso de fungos nematófagos, muito se tem estudado sobre as diferenças percentuais para sua atividade predatória (Braga *et al.*, 2011; Araujo *et al.*, 2012). Assim, no presente estudo o fungo *Pochonia chlamydosporia*

(VC4) utilizados em diferentes concentrações foi eficaz na destruição de ovos de *C. pelagicum* ao longo da experiência. Esta informação indica que este fungo pode ser usado com sucesso no controle biológico de helmintos potencialmente zoonóticos (Araújo et al, 2012). A produção de clamidosporos é uma das principais características que se dirigem possivelmente um fungo pode ser usado no controle ambiental de ovos de helmintos parasitas gastrointestinais. Estas estruturas permitem fungos nematófagos à capacidade de passagem através do tracto gastrointestinal dos animais domésticos, bem como ser facilmente disperso no ambiente externo, em seguida, atua como dispersores naturais (Araújo et al., 2004).

Outro aspecto importante observado na eficiência de destruição de ovos de helmintos por *P. chlamydosporia* é o seu crescimento a partir de meios de cultura dito "pobre". Neste ponto, a literatura refere que este fungo comporta-se de diferentes maneiras de acordo com o meio de cultura utilizado, mantendo a sua capacidade ovicida através de contato com os ovos. Eren e Pramer (1965) mencionam que o periódico fornecimento de nematóides a fungos nematófagos em meio de culturas pobres em nutrientes reduzem seu crescimento saprofítico aumentando a sua atividade como antagonista natural. Partindo dessa premissa, em trabalhos recentes Braga et al. (2011) propuseram que não só o meio de cultura, mas também a quantidade de clamidporos ser utilizados no controle in vitro de ovos de helmintos foram duas características importantes do ponto de vista biológico. No presente estudo, observou-se que as concentrações de 2000 e 3000 clamidosporos apresentou os maiores percentuais ovicidas. Assim, os resultados sugerem mais uma vez que a concentração de clamidoconídios e a forma WA 2%, apesar de ser considerado como um "pobre" meio de cultura pode influenciar a predação de ovos.

Paperna (1964) relata que o peixe pode servir (transporte) como hospedeiros definitivos, intermediários ou paratênicos nos ciclos de muitas espécies de parasitas de vida e geralmente afetam a comercialização do peixe produzido comercialmente, aumentando, assim, um monte de preocupações de saúde pública, especialmente em áreas onde o peixe cru ou fumado são comidos. Neste sentido, uma larga variedade de géneros de helmintos sugere

a utilização de "agentes" biocontroladores em vários estudos em condições de laboratório. Neste contexto, a literatura também relata alguns trabalhos onde fungos nematófagos têm demonstrado a sua atividade em ovos e larvas de helmintos de aves, que podem representar, no futuro, um controle alternativo (Braga et al., 2012, 2013). Yáñez et al. (2012) descrevem úlceras gástricas causadas por *Contraecium* em mamíferos e aves (tais como pinguins), mas este é o primeiro relato de infecção de um fungo ovicida sobre *C. ovos pelagicum* de Pinguim de Magalhães.

7 REFERÊNCIAS

Anderson, R.C. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2. Ed. Wallingford, UK: **CAB International**, 2000. 650p.

Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 13: 165 – 169, 2004.

Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Araújo DM, Ferreira SR, Soares FEF et al. Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. **Research in Veterinary Science**, 2012.

Araujo JM, Araújo, JV, Braga FR, Carvalho RO, Silva AR, Campos AK. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. **Experimental Parasitology**, 121:338- 341, 2009.

Araújo MA, Santos S, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 47: 37–42, 1995;

Ayres M, Ayres JRM, Ayres DL, Santos AS. **Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas**. Belém: **Sociedade civil mamirauá**: Brasília CNPq, p. 290, 2003.

Barros L.A, Torttelly R, Pinto R.M, Gomes D.C. Effects of experimental infections with larvae of *Eustrongylides ignotus* Jäegerskiold, 1909 and *Contracaecum multipapillatum* (Drasche, 1882) Baylis, 1920 in rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 56: 325 332, 2004.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annual Review Biochemistry** 72, 248–254, 1976.

Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Frassy LN, Tavela AO, Soares FEF et al. Pochonia chlamydosporia fungal activity in a solid medium and its crude extract against eggs of Ascaridia galli. **Journal of Helminthology**, 15: 1-5, 2011a.

Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR. 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**, 40: 356-358, 2007.

Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Correa, DN, Pereira CAJ. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi Duddingtonia flagrans, Monacrosporium sinense and Pochonia chlamydosporia on Schistosoma mansoni eggs. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 24, 2713-2716, 2008 a.

Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Araujo JM, Silva AS, Carvalho RO, Tavela, AO . In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi Duddingtonia flagrans, Monacrosporium sinense and Pochonia chlamydosporia on Fasciola hepatica eggs. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, 24, 1559-1564, 2008b.

Braga, F.R, Araújo, J.V, Silva, A.R, Araujo, J.M, Carvalho, R.O, Tavela, A.O, Campos, A.K, Carvalho, G.R. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus Duddingtonia flagrans in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 163, 335-340, 2009 a.

Braga, F.R, Araújo, J.V, Silva, A.R, Araujo, J.M, Carvalho, R.O, Campos, A.K, Tavela, A.O, Ferreira, S.R, Frassy, L.N, Alves, C.D.F. Duddingtonia flagrans, Monacrosporium thaumasium and Pochonia chlamydosporia as a possible biological control agent of Oxyuris equi and Austroxyuris finlaysoni. **Journal of Helminthology**, 84, 21-25, 2010 a.

Braga F.R, Araújo JM, Silva ARE, Araújo JV, Carvalho RO, Soares FEF, Queiroz JH, Genier H. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of fungus *Pochonia chlamydosporia* against *Ancylostoma* sp eggs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 44, 116-118, 2011b.

Braga, F.R, Araújo, J.V, Soares, F.E.F, Araujo, J.M.; Geniêr, H.L.A, Silva, A.R, Carvalho, R.O, Queiroz, J.H,; Ferreira, S.R. Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomin. **Journal of Helminthology**, 4, 1-7, 2010b.

Braga, F.R, Araújo, J.V, Tavela, A.O, Vilela, V.L.R, Soares, F.E.F, Araujo, J.M, Queiroz, L.M, Silveira, W.F, Feitosa, T.F, Dantas, E.S, Athayde, A.C.R. First report of the interaction of nematophagous fungi on *Libyostrongylus douglassii* (Nematoda: Trichostrongilidae) of ostrich. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2013, in press.

Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Tavela AO, Araujo JM, Carvalho RO, Fernandes FM, Queiroz JH. Enzymatic analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. **Biocontrol Science and Technology**, 22, 685-696, 2012.

Boersma PD, Stokes DL, Yorio PM. 1990. **Reproductive variability and historical change of Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) at Punta Tombo, Argentina**. In: Davis LS, Darby JT (eds.), *Penguin biology*. Academic Press, San Diego, USA. pp. 15-43.

Campos AK, Araújo JV, Guimarães MP. Interaction between the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* and infective larvae of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea). **Journal of Helminthology**, 82:337-341, 2008.

Carvalho CO, Cuenca SC, Kleeb SR, Gallo H, Baldassin P. Gross and histopathological findings in magellanic penguins *Spheniscus magellanicus* Forster, 1781). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 64, 2012.

Carvalho RO, Braga FR, Araújo JV. Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma* spp. infective larvae in dogs. **Veterinary Parasitology**, 176, p. 236-239, 2011.

Eren J, Pramer D. The most probable number of nematode-trapping fungi in soil. *Soil Science* 99, 285. Ederli NB, Oliveira FCR, Monteiro CM, Silveira LS, Rodrigues MLA. Ocorrência de *Contraecaecum pelagicum* Johnston & Mawson, 1942 (Nematoda, Anisakidae), em pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* Forster, 1781) (Aves, Spheniscidae) no litoral do Espírito Santo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61, 1006-1008, 2009.

Faedo M, Larsen M, Dimander SO, Yeates GW, Hoglund J, Waller PJ. Growth of the Fungus *Duddingtonia flagrans* in soil surrounding feces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. **Biological Control**, 23, 64-70, 2002.

Frassy LN, Braga FR, Silva AR, Araújo JV, Ferreira SR, Freitas LG. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 43, 102-104, 2010.

Gams W, Zare R A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. **Nova Hedwigia**; 73, 329-337, 2001.

Garbin LE, Navone GT, Diaz JI, Cremont F. Further study of *Contraecaecum pelagicum* (Nematoda: Anisakidae) in *Spheniscus magellanicus* (Aves: Spheniscidae) from Argentinean coasts. **Journal of Parasitology**, 93, 143-150, 2007.

Højgaard DP. Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae), Isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. **SARSIA**, 83, 21-28, 1998.

Huang, X, Zhao, N, Zhang, K. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research in Microbiology** 155, 811–816, 2004.

Khan, A, Willians, K.L, Nevalainen, K.M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. **Biological Control**, 31, 346–352, 2004.

Kerry BR. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review Phytopathology**, 38, 323-441, 2000.

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, p.680 –685, 1970.

Larsen M. Biological control of helminths. *Internacional Journal for Parasitology*, 29, 139-146, 1999. Larsen M, Nansen P, Wolstrup J, Gronvold J, Henriksen S, Zorn. A. Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Veterinary Parasitology**, 60, 321-330, 1995.

López-Serrano MC, Gomez AA, Daschner A, Morenoancillo A, De Parga JMS, Caballero MT, Barranco P, Cabanás R. Gastroallergic anisakis: Findings in 22 patients. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 15, 503-506, 2000.

Lopez-Llorca LV, Maciá-Vicente JG, Jansson HB. Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio, A., Mukerji, K.G. (Eds) *Integrated Management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Springer, Dordrecht, **The Netherlands**, 51–57, 2008.

Lysek H, Fassatiová O, Pineda NC, Hernández NL. Ovicidal fungi in soils of Cuba. **Folia Parasitologica**, 29, 265-270, 1982.

Lysek H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. *Acta University Palackiana Olomueensis*, 76, 9-13, 1976.

Mansfield, L.S, Gamble, H.R, Fetterer, R.H. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* I. Structural components. *Comp Biochem Physio* 103, 681–686, 1982.

Martins ML, Santos RS, Marengoni NG, Takahashi HK, Fujimoto RY. Infection and susceptibility of three fish species from the Paraná River, Presidente Epitácio, SP, Brazil to *Contracaecum* sp. larvae (Nematoda: Anisakidae). **Acta Scientiae Veterinariae**, 25, 73-78, 2003.

Mayorga, L.F.S.P, Renata C.C, BHERING, L, MEDEIROS, C.C, COSTA, L.M.B. Instituto de **Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos**, Boletim N.2, Pinguins no Brasil, 2011.

Mauchline TH, Kerry BR, Hirsch P. The biocontrol fungus *Pochonia chlamydosporia* shows nematode host preference at the infraspecific level. **Mycological Research**, 108, 161-169, 2003.

Mota M.A, Campos, A.K, Araújo, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 23, 93-100, 2003.

Morton OC, Hirsch PR, Peberdy JP, Kerry BR. Cloning of and genetic variation in protease VCP1 from the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. **Mycological Research**, 107, 38-46, 2003.

Nordbring-Hertz B, Stahammar C.M. Capture of nematode by *Arthrobotrys oligospora* an electron microscope study. **Canadian Journal of Botanic**, 56, 1297-1307, 1978.

Ruoppolo V, Silva-Filho RP, Adornes AC, Catão-Dias JL, 2004. Occurrence of Malaria in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*) in a rehabilitation center in Southern Brazil. **Proceedings of the Vth International Penguin Conference, Ushuaia, Argentina.**

Ruoppolo, V., Adornes, A.C., Nascimento, A.C., Silva-Filho, R.P., 2004. Reabilitação de pingüins afetados por petróleo. **Clínica Veterinária** 51, 78-83.

Ruoppolo, V., Callahan, B., Silva-Filho, R. P., Heredia, S. R., Griot, K., Matus, R., Holcomb, J., 2007a. Update on the IFAW Penguin Network: presenting goals and achievements since 2001. **Proceedings of the 9th International Effects of Oil on Wildlife Conference** (Monterey, California, USA), pp. 143-147.

Terril TH, Larsen M, Samples O, Hsted S, Miller JE, Kaplan RM, Gelaye S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Veterinary Parasitology**, 120, 285-296, 2004.

Rezende GC. **Aspectos Ecológicos da Helmintofauna de Pinguins-de-Magalhães, *Spheniscus magellanicus* (Aves: Spheniscidae), procedentes do Litoral Norte do Estado de São Paulo.** Dissertação de Mestrado, 2009.

Santos CP. Um nematódeo parasita do pinguim *Spheniscus magellanicus* (Forster) (Ascaridoidea, Anisakidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**; 79, 233-237, 1984.

Segers R, Butt TM, Kerry BR, Peberdy JF. The nematophagous fungus *Verticillium chlamyosporium* produces a chymoelastase-like protease which

hydrolyses host nematode proteins in situ. **Microbiology** 140, 2715–2723, 1994.

Sumantha, A., Larroche, C., Pandey, A. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. **Food Technology and Biotechnology**, 44, 211–220, 2006.

Soares, F.E.F, Braga, F.R, Araújo, J.V, Lima, W.S, Mozer, L.R, Queiroz, J.H. In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. *Parasitology Research* 110, 2423-2427, 2012. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. **Veterinary Parasitology**. 3^a ed, 2007, 468p.

Tian B, Yang J, Zhang, K. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. MINIREVIEW. **FEMS Microbiology Ecology** 61, 197–213, 2007.

Ueno, H., Gonçalves, P.C. 1998. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. Ed. UFRGS – JICA. Tokyo, Japan. 143 p.

Waller PJ, Faedo M. The prospect for biological control of the free living stages of nematode parasite of livestock. **International Journal for Parasitology**, 26, 915-925, 1996.

Waller PJ. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. **Animal Feed Science Technology**, 126, 277-289, 2005.

Yamaguti S. **Systema Helminthum - Nematodes**. Vol. III. - Part I e II. London: Interscience Publishers. 1961, 1261p.