

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS *DUDDINGTONIA FLAGRANS* E
MONACROSPORIUM THAUMASIUM NO CONTROLE DOS NEMATÓIDES
RHABDITIS spp., E CIATOSTOMÍNEOS**

CAROLINA MAGRI FERRAZ

VILA VELHA
MARÇO / 2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**UTILIZAÇÃO DOS FUNGOS *DUDDINGTONIA FLAGRANS* E
MONACROSPORIUM THAUMASIUM NO CONTROLE DOS
NEMATÓIDES *RHABDITIS* spp., E CIATOSTOMÍNEOS**

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

CAROLINA MAGRI FERRAZ

VILA VELHA
MARÇO / 2020

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UUV-ES

F381u Ferraz, Carolina Magri
Utilização dos fungos *Duddingtonia flagrans* e
Monacrosporium thaumasium no controle dos nematoides
Rhabditis spp., e ciatostomíneos / Carolina Magri Ferraz. –
2020.
57 f.; il.

Orientador: Fábio Ribeiro Braga.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade
Vila Velha, 2020.
Inclui bibliografias.

1. Fitopatologia. 2. Doenças parasitárias. 3. Sistemas de
controle biológico. 3. Nematoda - Pesquisa. 4. Biotecnologia. I.
Braga, Fábio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.08944

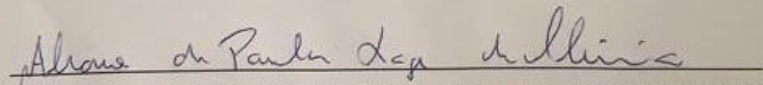
CAROLINA MAGRI FERRAZ

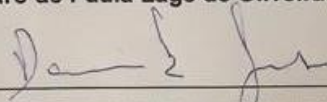
Utilização dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* no controle dos nematoides *Rhabditis* spp., e ciatostomíneos

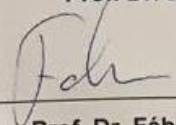
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre (a) em Ciência Animal.

Aprovado (a) em 04 de Março de 2020.

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Álvaro de Paula Lage de Oliveira (Universidade Vila Velha)


Prof. Dr. Dominik Lenz (Universidade Vila Velha)


Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga (Universidade Vila Velha)

Orientador

Dedico este trabalho aos meus pais e ao Fábio, por todo estímulo e ajuda ao longo desta trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por todas as bênçãos e conquistas.

Aos meus pais, Antônio e Cristiane, por todo amor, carinho e compreensão ao longo dos meus anos de estudo e por terem me proporcionado a melhor educação deste o princípio, que foi a base para chegar até aqui.

Ao Fábio, que pôs em mim a vontade de ser mestre, que me estimulou quando nada saía como esperado, que acreditou no meu potencial como médica veterinária e sem dúvidas me tornou uma profissional melhor.

Aos meus irmãos, Victor e Isabela, que mesmo com a diferença de idade, sempre me fazem mais felizes, aliviando os momentos de estresse.

Aos meus nenéns, Nina, Nick, Bia, Lucky, Hanna e Apollo e, aos anjinhos Piter e Mel, pelo carinho e amor incondicional. Com certeza os melhores cachorros deste mundo.

A Universidade Vila Velha, pela infraestrutura, segurança no campus e por ter me agraciado, juntamente com o governo, com a bolsa Prosup Capes.

Ao professor Fernando Tobias, que no meio da minha jornada confiou a mim seu laboratório.

A todos os professores e técnicos que tive a honra de conhecer e aprender com cada um.

A Laryssa, Anna, Samilla, Bruna, Caio e Fabão, por toda ajuda e paciência quando precisei deles. Vocês foram muito importantes.

A toda minha família, avós, tios e primos, por todas as vezes que se interessaram e quiseram ouvir sobre meu trabalho. Vocês são inspirações para mim.

*A todos vocês fica meu eterno agradecimento.
Obrigada!*

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	2
1. Introdução	3
2. Revisão de literatura	6
2.1. Ciatostomíneos.....	6
2.2. <i>Rhabditis</i> spp.....	7
2.3. Fungos nematófagos.....	8
2.4. Nanopartículas de Prata.....	9
3. Objetivos	11
3.1. Objetivo Geral.....	11
3.2. Objetivos Específicos	11
4. Material e Métodos.....	12
Capítulo 1	13
Resumo.....	13
1. Introdução	14
2. Material e Métodos.....	15
2.1. <i>Rhabditis</i> spp.....	15
2.2. Tratamento	16
2.3. Ensaio experimental	16
2.4. Análise estatística.....	17
3. Resultados	17
4. Discussão.....	18

Tabela 1. Grupos experimentais (G1 a G12) utilizados para avaliar o uso combinado de ivermectina 1%, dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% com os fungos nematófagos

<i>Duddingtonia flagrans</i> (AC001) e <i>Monacrosporium thaumasium</i> (NF34), no controle de <i>Rhabditis</i> spp.	23
Tabela 2. Médias, desvios-padrões (DP) e percentuais de redução de <i>Rhabditis</i> spp., recuperados nos grupos experimentais (G1 a G12) após 24 horas de interação.	24
Capítulo 2	25
Resumo	25
1. Introdução	26
2. Material e Métodos	28
2.1. Obtenção do filtrado fúngico de <i>D. flagrans</i> e biossíntese das nanopartículas de prata (AgNP's – <i>D. flagrans</i>)	28
2.2. Caracterização das AgNP's – <i>D. flagrans</i>	28
2.3. Obtenção das L ₃ de ciatostomíneos	29
2.4. Design experimental	29
2.5. Análise estatística.....	30
3. Resultados	30
4. Discussão	31
Figura 1. Caracterização das AgNP's biossintetizadas a partir do filtrado fúngico de <i>Duddingtonia flagrans</i> . Espectro UV-Vis das AgNP's – <i>D. flagrans</i> ($\lambda_{\text{max}} = 408\text{nm}$) e imagem das AgNP's obtidas por meio da MET	34
Referências	35

RESUMO

FERRAZ, CAROLINA MAGRI, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Março de 2020. **Utilização dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* no controle dos nematoides *Rhabditis* spp., e ciatostomíneos.** Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

As nematodioses em animais domésticos são obstáculos na saúde e na produção animal. Neste contexto, a rhabditiose e a ciatostomíase são infecções causadas por nematoides, que se comportam de maneiras distintas, mas que culminam em sérios problemas na saúde de bovinos e equídeos, respectivamente. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a utilização dos fungos *Duddingtonia flagrans* (AC001) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34) associados ao controle químico do *Rhabditis* spp., e na biossíntese de nanopartículas (AgNP) no controle *in vitro* de ciatostomíneos. Foram realizados dois ensaios experimentais em etapas distintas: ensaio A: Uso combinado de ivermectina, dimetilsulfóxido, óleo mineral e fungos nematófagos no controle de *Rhabditis* spp., e ensaio B: Efeito de nanopartículas de prata (AgNP's) de *D. flagrans* em larvas de Ciatostomíneos (subfamília: Cyathostominae). No ensaio A foram formados 12 grupos experimentais, com oito repetições cada: G1 (nematoides + AC001); G2 (nematoides + NF34); G3 (nematoides + ivermectina 1%/controle positivo); G4 (nematoides + dimetilsulfóxido 1%/controle positivo); G5 (nematoides + óleo mineral 100%/controle positivo); G6 (nematoides + AC001 + ivermectina 1%); G7 (nematoides + NF34 + ivermectina 1%); G8 (nematoides + AC001 + óleo mineral 100%); G9 (nematoides + NF34 + óleo mineral 100%); G10 (nematoides + AC001 + dimetilsulfóxido 1%); G11 (nematóide + NF34 + dimetilsulfóxido 1%); G12 (nematóide + água destilada/controlado negativo). No ensaio B foi utilizado filtrado fúngico de *D. flagrans*, obtido a partir de meio com baixo teor de nutrientes (LMN) e enriquecido com quitina. Para a biossíntese das AgNP, solução de AgNO₃ [1:50] foi adicionada ao filtrado. A formação das AgNP – *D. flagrans* foi confirmada por absorção óptica (UV-Vis). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para avaliar o tamanho e a monodispersão dos AgNP. Dois grupos experimentais foram formados em microtubos, com 5 repetições para cada grupo: grupo tratado (G1) e grupo controle (G2), durante um período de 24 horas. Nos microtubos do G1, foram adicionadas aproximadamente 120 L₃ de ciatostomíneos e 1 mL de solução de AgNP's - *D. flagrans*, na concentração de 43,4 µg/mL. Nos microtubos do G2, aproximadamente 120 L₃ e 1 mL de água destilada. Os resultados demonstraram que, a utilização de compostos químicos associados aos conídios fúngicos foi eficiente no controle *in vitro* de *Rhabditis* spp. Por outro lado, as nanopartículas de prata de *D. flagrans* apresentaram atividade larvicida e percentual de redução de 43% na população de larvas de ciatostomíneos, ao final de 24 horas. Sendo assim, concluiu-se que a utilização de controle biológico foi eficiente e pode vir a ser usada como estratégia integrada no manejo sanitário de rebanhos.

Palavras chaves: resistência parasitária, controle biológico, nematodioses, biotecnologia, bovinos, equídeos.

ABSTRACT

FERRAZ, CAROLINA MAGRI, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Março de 2020. **Use of the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* to control nematodes *Rhabditis* spp., and cyathostomins.** Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

Nematodes in domestic animals are obstacles in animal health and production. In this context, rhabditiosis and cyathostomiasis are infections caused by nematodes, which behave in different ways, but which culminate in serious problems in the health of cattle and horses, respectively. The objective of the present work was to evaluate the use of the fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001) and *Monacrosporium thaumasium* (NF34) associated with the chemical control of *Rhabditis* spp., and in the biosynthesis of nanoparticles in the *in vitro* control of cyathostomins. Two experimental tests were carried out in different steps: assay A: Combined use of ivermectin, dimethyl sulfoxide, mineral oil and nematophagous fungi in the control of *Rhabditis* spp., and assay B: Effect of silver nanoparticles (AgNP's) of *D. flagrans* in larvae of Cyathostomins (subfamily: Cyathostominae). In test A, 12 experimental groups were formed, with eight repetitions each: G1 (nematodes + AC001); G2 (nematodes + NF34); G3 (nematodes + 1% ivermectin / positive control); G4 (nematodes + 1% dimethyl sulfoxide / positive control); G5 (nematodes + 100% mineral oil / positive control); G6 (nematodes + AC001 + 1% ivermectin); G7 (nematodes + NF34 + 1% ivermectin); G8 (nematodes + AC001 + 100% mineral oil); G9 (nematodes + NF34 + 100% mineral oil); G10 (nematodes + AC001 + 1% dimethyl sulfoxide); G11 (nematode + NF34 + 1% dimethyl sulfoxide); G12 (nematode + distilled water / negative control). In assay B, *D. flagrans* fungal filtrate was used, obtained from medium with low nutrient content (LMN) and enriched with chitin. For the biosynthesis of AgNP, AgNO₃ solution [1:50] was added to the filtrate. The formation of AgNP - *D. flagrans* was confirmed by optical absorption (UV-Vis). Transmission electron microscopy (MET) was used to evaluate the size and monodispersity of AgNP. Two experimental groups were formed in microtubes, with 5 repetitions for each group: treated group (G1) and control group (G2), during a period of 24 hours. In G1 microtubes, approximately 120 L3 of cyathostomines and 1 mL of AgNP's solution - *D. flagrans*, at 43.4 µg / mL were added. In G2 microtubes, approximately 120 L3 and 1 mL of distilled water. The results showed that the use of chemical compounds associated with fungal conidia was efficient in the *in vitro* control of *Rhabditis* spp. On the other hand, the silver nanoparticles of *D. flagrans* showed larvicidal activity and a percentage reduction of 43% in the population of cyathostomins larvae, after 24 hours. Thus, it was concluded that the use of biological control was efficient and may come to be used as an integrated strategy in the health management of herds.

Keywords: parasitic resistance, biological control, nematodiosis, biotechnology, cattle, equine.

1. Introdução

As nematodioses em animais domésticos são obstáculos na saúde e na produção animal e podem afetar também a saúde humana. Conhecer a epidemiologia do parasito é uma ferramenta importante para o controle efetivo das infecções parasitárias (Traub et al., 2013; Braga et al., 2020). Em especial aqui retratadas, a rhabditiose e a ciatostomíase são infecções causadas por nematoides, que se comportam de maneiras distintas, mas que culminam em sérios problemas na saúde de bovinos e equídeos, respectivamente (Leite et al., 2013; Sobral et al., 2019).

A rhabditiose é causada pelo nematoide de orelha *Rhabditis* spp. Esta parasitose tem sido apontada como um dos entraves mundiais na produção de leite, principalmente em bovinos da raça Gir. No Brasil, as perdas econômicas provocadas pelo *Rhabditis* spp., tem chamado a atenção desde a década de 1990 (Leite et al., 1994; Sobral et al., 2019). Já a ciatostomíase é causada pelos ciatostomíneos, também denominados de pequenos estrogilídeos, grupo de nematoides de equídeos com grande distribuição mundial. Essa doença tem sido relatada como um sério problema na criação destes animais e as drogas anti-helmínticas existentes não conferem sucesso no tratamento dos animais parasitados (Eysker et al., 1999; Nielsen et al., 2019).

Por décadas o controle químico realizado com drogas anti-helmínticas tem sido utilizado, contudo, salvo algumas situações de sucesso, na maioria das vezes este controle tem se mostrado ineficaz (Braga et al., 2009; Barbosa et al., 2016). As razões para este insucesso estão ligadas a resistência parasitária e toxicidade das drogas, que enfatizam a necessidade de serem implementados programas integrados de controle. Neste sentido, por décadas alternativas de

controle que possam vir a somar estrategicamente ao controle químico vem sendo constantemente pesquisadas. Dentre estas alternativas, a utilização de controladores biológicos tem sido uma estratégia interessante. Pesquisas apontam que dentre os controladores biológicos, os fungos nematófagos apresentam alto potencial nematicida e recentemente foram disponibilizados comercialmente (Ferraz et al., 2019; Braga et al., 2020).

Entretanto, a maioria dos trabalhos objetivou a passagem gastrointestinal destes fungos nematófagos em péletes, que foram administrados por via oral em animais domésticos (Silva et al., 2011). Contudo, a partir dos anos 2000, as pesquisas se voltaram para as chamadas “distintas utilizações destes fungos” no controle de agentes nocivos à saúde animal e humana (Braga et al., 2009). Por meio de estudos bioquímicos e moleculares foi constatado que existia a grande possibilidade destes fungos produzirem enzimas extracelulares, com aplicação direta sobre larvas e ovos de nematoides (Esteves et al., 2009; Braga et al., 2011; Soares et al., 2015). Desta forma, as pesquisas avançaram e, recentemente, se descobriu uma nova possibilidade da utilização destes fungos no controle de nematoides, por meio de nanopartículas biossintetizadas a partir do filtrado fúngico (Costa Silva et al., 2017). Barbosa et al. (2019) em trabalho pioneiro provaram que nanopartículas biossintetizadas pelo *Duddingtonia flagrans*, uma espécie de fungo nematófago, foram capazes de causar a destruição de larvas infectantes de *Ancylostoma caninum*, nematoide parasito gastrointestinal de cães e gatos com grande potencial zoonótico.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* associados ao

controle químico de *Rhabditis* spp., e biossintetizar nanopartículas a partir do *D. flagrans* no controle *in vitro* de ciatostomíneos.

2. Revisão de literatura

2.1. Ciatostomíneos

Dentre os endoparasitos de equinos destacam-se os nematoides parasitos gastrintestinais, especialmente o grupo mais abundante, os ciatostomíneos, também denominados pequenos estrogilídeos (Taylor et al., 2017). Estes nematoides são os mais comumente encontrados nas infecções helmínticas destes animais e são potencialmente danosos do ponto de vista clínico (Kaplan et al., 2002; Matthews et al., 2004). Por sua vez, os equinos apresentam susceptibilidade a estes nematoides durante toda a vida, sendo possível observar a parasitose em qualquer idade (Matthews et al., 2004; Tzelos et al., 2017).

Em seu ciclo ambiental, as larvas dos ciatostomíneos se desenvolvem desde a eclosão dos ovos até a fase de larva infectante (L₃), em um período de 2 semanas. Após o desenvolvimento, as L₃ migram do bolo fecal para a pastagem adjacente, onde finalmente são ingeridas pelos equinos (Monteiro et al., 2011; Taylor et al., 2017). Estes autores ainda discorrem a respeito da epidemiologia destas larvas e mencionam que as mesmas são resistentes ao meio ambiente contra intempéries climáticas gerais. Contudo, deve ser ressaltado que a resistência destas larvas também é conferida pela cutícula, que se apresenta nos estádios de L₁ a L₃.

Drogas anti-helmínticas utilizadas para o controle e tratamento destes nematoides em equinos, originalmente foram desenvolvidas para controlar a ocorrência de *Strongylus vulgaris*, sendo estas bem-sucedidas na redução da morbidade e da mortalidade. Entretanto, esta estratégia resultou na seleção e resistência de ciatostomíneos, sendo os benzimidazóis a primeira classe na qual

foi relatada sua resistência no Brasil (Kaplan et al., 2002; Borges et al., 2010). Estudo realizado por Tzelos et al. (2017) demonstrou a resistência destes nematoides também a moxidectina, uma vez que sua prolongada persistência na circulação sanguínea expõe os nematoides a doses sub-terapêuticas do anti-helmíntico, aumentando a seleção de parasitos resistentes. Matthews et al. (2004) mencionam que em seu ciclo biológico as larvas dos pequenos estrogilídeos podem ficar inativadas na mucosa intestinal, tornando-se refratárias a vários anti-helmínticos disponíveis, ou seja, equinos tratados quimicamente ainda podem suportar altas cargas parasitárias.

2.2. *Rhabditis* spp.

Nematoides do gênero *Rhabditis* são os agentes etiológicos mais frequentes nas otites parasitárias de bovinos de orelha longa, principalmente da raça Gir (*Bos taurus indicus*) (Martins Jr. et al., 1971). Alguns autores afirmam que o *Rhabditis* spp., está presente na maioria dos rebanhos da raça Gir e em decorrência à parasitose, sérios problemas sanitários e prejuízos econômicos ocorrem nas propriedades (Msolla et al., 1993; Vieira et al., 1998; Vieira et al., 2001; Duarte e Hamdan, 2004).

A epidemiologia da rhabditiose ainda carece de estudos, sendo até o presente momento pouco esclarecida. Obatolu et al. (1999) sugerem que o alto índice de casos possui correlação positiva com os meses úmidos e quentes do ano, devido ao conseqüente aumento da população de moscas, visto que supõem serem estes insetos os vetores do nematoide.

Segundo Barbosa et al. (2016) as infestações subclínicas não costumam ser diagnosticadas, visto que a rotina clínica de bovinos não engloba o exame

do aparelho auditivo. Em decorrência disto, as afecções auditivas são tratadas apenas quando se tornam crônicas e até mesmo com comprometimento neural. Contudo, a prevenção, o controle e o tratamento da rhabditiose necessitam de maiores estudos, para que se estabeleça programas estratégicos de controle.

2.3. Fungos nematófagos

Os fungos nematófagos veem sendo utilizados como um controle alternativo às nematodioses de animais domésticos, tanto em condições laboratoriais quanto em condições naturais (Tavela et al., 2013). Dentre as espécies de fungos nematófagos existentes, o *Duddingtonia flagrans* (AC001) e o *Monacrosporium thaumasium* são considerados promissores no controle de nematoides (Braga et al., 2010; Silva et al., 2011). O mecanismo de ação destes fungos é composto pela atividade mecânica, através da formação de armadilhas ao longo de suas hifas modificadas e pela atividade enzimática, por meio da produção de enzimas extracelulares, principalmente proteases e quitinases (Mota et al., 2003; Soares et al., 2015).

A este respeito, cita-se o tipo de substrato em que o fungo é crescido, valendo-se da premissa que a produção da sua atividade enzimática é originada a partir do meio de cultura. Trabalho realizado por Braga et al. (2011) demonstrou que quando o extrato bruto é acrescentado de caseína, este se torna otimizado, sugerindo ação proteolítica do *D. flagrans* contra as larvas de ciatostomíneos, através da enzima protease. Em contrapartida, fungos nematófagos crescidos a partir de meio de cultura ágar-quitina, em condições laboratoriais, demonstraram atividade enzimática quitinolítica sobre ovos e larvas de helmintos (Braga et al.,

2015). Por fim, Soares et al. (2015) mencionam que o controle biológico é uma das possíveis aplicações biotecnológicas de enzimas fúngicas.

2.4. Nanopartículas de Prata

Nanopartículas (NP's) metálicas são atualmente uma área de pesquisa em constante crescimento, visto que suas aplicações ocorrem em vários campos da ciência (Alghuthaymi et al., 2015). Dentre as NP's metálicas, as nanopartículas de prata (AgNP's) vem sendo estudadas como uma ferramenta terapêutica com potencial para o tratamento de diversas doenças, devido as suas atividades antiplasmodial, antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticancerígena (Chitra et al., 2014; Kulkarni et al., 2014; Singh et al., 2015; AlSalhi et al., 2016). Devido às suas dimensões, que variam de 1 a 100 nanômetros (nm) de diâmetro, as NP's apresentam tamanho reduzido e elevada área de superfície, permitindo que elas tenham maior área de contato com microrganismos.

Métodos biológicos têm surgido como opções viáveis para a síntese de NP's, dado a necessidade de uma técnica que supere as deficiências dos métodos químicos. A síntese biológica ou biossíntese de NP's tem se demonstrado simples, rentável, confiável e ambientalmente correta, uma vez que utilizam sistemas biológicos, incluindo extratos de plantas, bactérias e fungos (Zhang et al., 2016).

A biossíntese utilizando fungos filamentosos tem atraído interesse considerável para a utilização destes microrganismos na produção de NP's, devido a capacidade que estes organismos possuem de crescerem em substratos pobres em nutrientes e de baixo custo e de produzirem metabólitos

secundários (Alghuthaymi et al., 2015). Além disso, o micélio fúngico pode suportar pressão de fluxo, agitação e outras condições laboratoriais importantes para a produção em larga escala (Chowdhury et al., 2014). Ainda, na síntese biológica utilizando fungos, a biossíntese das NP's ocorre via extracelular, ou seja, a redução ocorre fora da célula, eliminando a necessidade de etapas extras de revestimento das NP's na pós-produção (Chowdhury et al., 2014; Alghuthaymi et al., 2015).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a utilização dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* no controle dos nematoides *Rhabditis* spp. e ciatostomíneos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o uso combinado de fungos nematófagos com compostos químicos no controle *in vitro* de *Rhabditis* spp.
- Biossintetizar nanopartículas de prata a partir do fungo *D. flagrans*.
- Avaliar o efeito *in vitro* de nanopartículas de prata do filtrado fúngico de *D. flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos (L₃).

4. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado em duas etapas, denominadas capítulo 1 e capítulo 2. Cada etapa foi realizada distintamente uma da outra e a seguir são descritos os dois capítulos, com as suas respectivas metodologias.

Capítulo 1 - Publicado na revista *Veterinary Parasitology* (qualis A1).

Uso combinado de ivermectina, dimetilsulfóxido, óleo mineral e fungos nematófagos no controle de *Rhabditis* spp.

Carolina Magri Ferraz¹, Samilla Alves Sobral¹, Otavio Fidelis Junior², Thiago Faccuri Moreira²,
Fernando Luiz Tobias², Filippe Elias de Freitas Soares³, Hugo Leonardo André Geniêr⁴,
Vinicius Longo Ribeiro Vilela⁵, José Antônio Correia Lima¹, Jackson Victor de Araújo⁶, Fabio
Ribeiro Braga^{1*}

¹Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico, Universidade Vila Velha, Espírito Santo, Brasil

²Setor de Medicina Veterinária da Universidade Vila Velha, Espírito Santo, Brasil

³Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil

⁴Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, Brasil

⁵Instituto Federal da Paraíba – IFPB, Brasil

⁶ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil

Resumo

O nematoide *Rhabditis* spp., causa otite externa em bovinos criados em regiões tropicais e seu controle é difícil. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso combinado de ivermectina 1%, dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% com os fungos nematófagos das espécies *Duddingtonia flagrans* (AC001) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34) no controle *in vitro* de *Rhabditis* spp. Para isso, foram formados 12 grupos experimentais, com oito repetições cada: G1 (nematoides + AC001); G2 (nematoides + NF34); G3 (nematoides + ivermectina 1%/controle positivo); G4 (nematoides + dimetilsulfóxido 1%/controle positivo); G5 (nematoides + óleo mineral 100%/controle positivo); G6 (nematoides + AC001 + ivermectina 1%); G7 (nematoides + NF34 + ivermectina 1%); G8

(nematoides + AC001 + óleo mineral 100%); G9 (nematoides + NF34 + óleo mineral 100%); G10 (nematoides + AC001 + dimetilsulfóxido 1%); G11 (nematóide + NF34 + dimetilsulfóxido 1%); G12 (nematóide + água destilada/controlado negativo). Os resultados demonstraram que todos os grupos tratados experimentalmente diferiram estatisticamente ($p < 0.01$) do grupo controle. No presente trabalho, a utilização de dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% conjuntamente com os conídios fúngicos obteve resultado interessante, sendo essa uma premissa futura para o uso combinado tópico de fungos nematófagos com estes veículos, no controle de *Rhabditis* spp.

Palavras-chaves: fungos nematófagos, controle biológico, otite parasitária

1. Introdução

O nematóide *Rhabditis* spp., causa otite externa em rebanhos bovinos de países com clima quente e úmido, causando enormes prejuízos econômicos (Round, 1962; Msolla et al., 1985; 1993; Barbosa et al., 2016). A ivermectina é um fármaco anti-helmíntico pertencente ao grupo das lactonas macrocíclicas e é usado no mundo para controlar nematoides gastrointestinais em ruminantes. No entanto, os resultados do tratamento da otite bovina com ivermectina são ineficazes (Verocai et al., 2009; Barbosa et al., 2016). Deste modo, estudos que associem o uso da ivermectina com alternativas de controle de *Rhabditis* spp. são importantes.

Neste sentido, alguns trabalhos sugerem o uso do controle biológico, por exemplo, com fungos nematófagos, que podem ser associados ao controle químico deste parasito (Araújo e Guimarães, 2002; Braga e Araújo, 2014; Sobral

et al., 2019). No entanto, ainda são necessários estudos adicionais sobre a associação de medicamentos antiparasitários com fungos nematófagos no campo para o controle de *Rhabditis* spp. (Sobral et al., 2019).

Dessa forma, na tentativa de se promover o uso combinado com fungos nematófagos deve-se antes buscar compostos químicos e ou orgânicos que funcionem como veículos, quando associados a estes organismos e que possam promover uma ação sinérgica, sendo esse talvez um fator limitante (Mota et al., 2003). Nessa linha de raciocínio, o óleo mineral 100% e o dimetilsulfóxido 1%, são utilizados como veículos base para produtos na indústria, auxiliando em diversas formulações tópicas (Campos et al., 2004; Williams and Barry, 2004; Patzelt et al., 2012; Manjunath and Shivaprakash, 2013; Picoli et al., 2015). Dessa forma, poderiam atuar como bons veículos na administração tópica de fungos nematófagos.

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso combinado de ivermectina, dimetilsulfóxido e óleo mineral com os fungos nematófagos das espécies *Duddingtonia flagrans* (AC001) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34) no controle *in vitro* de *Rhabditis* spp.

2. Material e Métodos

2.1. *Rhabditis* spp.

Os nematoides foram coletados por meio de lavagem otológica do conduto auditivo externo dos animais. No total, foram utilizadas 6 vacas Gir entre três e oito anos de idade, de um rebanho bovino composto por 200 animais, incluindo vacas, novilhas, bezerros e touros das raças Gir e Girolando (Sobral et al., 2019).

2.2. Tratamento

No presente trabalho foram utilizados: ivermectina 1% (Merial, Brasil), dimetilsulfóxido 1% (Vetnil, Brasil) e óleo mineral 100% (União química, Brasil). Estes compostos foram obtidos no comércio local e têm sido utilizados em procedimentos na rotina clínica do serviço hospitalar médico veterinário da Universidade Vila Velha, Vila Velha, Brasil (Vieira et al., 2018).

Além destes compostos foram utilizados dois isolados de fungos nematófagos das espécies *Duddingtonia flagrans* (AC001) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34). Ambos isolados estão presentes no solo brasileiro e são provenientes do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. A seguir, os isolados foram repicados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar 2% (BDA2%). O crescimento micelial em toda a placa foi observado após 7 dias de cultivo. Para obtenção de uma solução de conídios de ambos os isolados, 5 ml de água destilada foram adicionados em cada placa de Petri e com auxílio de uma espátula os conídios e fragmentos miceliais foram vertidos em tubos *Falcon* de 15 ml (Araújo e Maia, 1993).

2.3. Ensaio experimental

Foram formados doze (12) grupos experimentais em microtubos, sendo cada grupo com oito repetições. Os valores de *Rhabditis* spp., e conídios utilizados nos grupos foram padronizados por meio de alíquotas, mantendo concentrações de aproximadamente 500 nematoides/143µl, 500 conídios/30µl de AC001 e 500 conídios/192µl de NF34. Os grupos experimentais estão descritos na Tabela 1.

Após 24 horas da interação dos nematoides *versus* ivermectina 1%, dimetilsulfóxido 1%, óleo mineral 100%, AC001 e ou NF34, o conteúdo de todos os microtubos nos grupos G1 a G12 foi lido, por meio de microscopia de luz, objetiva de 10x e o número de nematoides foi contabilizado (Mukhtar and Pervaz, 2003; Braga et al., 2013).

2.4. Análise estatística

A seguir, os resultados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e pós teste Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2003). O percentual de redução foi calculado utilizando-se a seguinte equação: % Redução= média de nematoides vivos recuperados no grupo controle – média de nematoides vivos recuperados no grupo tratado x 100/média de nematoides vivos recuperados no grupo controle (Mendoza-De-Gives and Vasquez-Prates, 1994).

3. Resultados

As médias e desvios-padrões de *Rhabditis* spp., recuperados nos grupos experimentais (G1 a G12) e percentual de redução são demonstrados na tabela 2. Os grupos G1 (AC001) e G2 (NF34), tratados apenas com os conídios, apresentaram redução média de 71.8% no número de nematoides vivos. No grupo G3, a ação da ivermectina 1% reduziu em 67% o número de nematoides recuperados ao final de 24 horas. Os grupos G4 e G5 tratados com dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% apresentaram, respectivamente, 42% e 31.20% na redução do número de nematoides. Foi observado também que as combinações ivermectina 1% + AC001 e ou NF34 (percentuais de redução de 43,2% e 30,1%, respectivamente) foram menos efetivas do que quando

comparadas às suas atividades separadamente. Ao final de 24 horas, foi registrado que as combinações AC001 e ou NF34 + óleo mineral 100% (G8 e G9, respectivamente) reduziu em 82.0% e 88.5% o número de *Rhabditis* spp., recuperados. A combinação de AC001 e ou NF34 + dimetilsulfóxido 1% (G10 e G11, respectivamente) reduziu na média 98.5%, o número de nematoides.

4. Discussão

O controle de *Rhabditis* spp., é considerado um desafio na pecuária leiteira nos trópicos, uma vez que não existe uma padronização dos protocolos terapêuticos, o que resulta na baixa eficiência e recidivas de infecção (Msolla et al., 1986; 1993; Leite et al., 2013). Além disso, o tratamento com medicamentos anti-helmínticos é ineficaz na maioria das vezes. Dessa forma, o uso de fungos nematófagos pode representar uma alternativa promissora para o controle biológico. Os resultados do presente estudo demonstraram que *D. flagrans* (AC001) e *M. thaumasium* (NF34) apresentaram atividade predatória sobre *Rhabditis* ssp. No entanto, os autores enfatizam que o uso futuro desses fungos *in vivo* pode ser um desafio, uma vez que é necessário promover a adesão de fungos no canal auditivo.

No presente trabalho, foi observado que a atividade predatória de *D. flagrans* (AC001) e *M. thaumasium* (NF34) foi eficaz. Este resultado está de acordo com o trabalho recente de Sobral et al. (2019), que observaram a eficácia dos isolados AC001 e NF34 sobre *Rhabditis* spp., em condições laboratoriais. Naquela ocasião, estes autores chamaram atenção para uma alternativa futura no controle de *Rhabditis* spp., mas não propuseram nenhuma metodologia para administração de fungos em animais.

Segundo Soares e Monteiro (2011), o uso combinado de controles químicos e biológicos pode representar uma estratégia viável para a pecuária, diminuindo custos, resistência, toxicidade e manejo, além de diminuir os resíduos nos produtos de origem animal e no meio ambiente. No entanto, vale ressaltar que alguns autores apontaram que a reprodução ambiental de controladores biológicos poderia ser comprometida pelas condições ambientais (Sanyal et al., 2004; Anhalt et al., 2010). Contudo, os resultados demonstraram que os compostos químicos testados não interferiram negativamente nas atividades dos fungos, o que possibilita a associação dos mesmos no futuro.

A ivermectina tem sido utilizada há anos no controle das nematodioses de ruminantes domésticos, mas, salvo algumas experiências de sucesso no passado, atualmente já existe a resistência parasitária (Coles et al., 1992; Chaparro et al., 2017). Por outro lado, especificamente, no controle do *Rhabditis* spp, não se tem obtido sucesso no Brasil (Verocai et al., 2009; Barbosa et al., 2016). Na África, Msolla et al. (1985) registraram bons resultados no controle de *Rhabditis bovis* com a ivermectina. No presente trabalho, foi observado que a utilização apenas da ivermectina 1% sem os fungos AC001 e ou NF34 teve melhor eficácia, em relação ao uso combinado com estes fungos.

Da mesma forma, foi observado que atividade predatória de AC001 e NF34 foi melhor quando não associados a ivermectina. Esse fato é interessante e pode vir a ser um fator determinante para estratégias futuras que visem utilizar a combinação tópica de fungos nematófagos com a ivermectina. Além disso, como já discutido anteriormente, alguns obstáculos na utilização de fungos nematófagos, em geral, com drogas antiparasitárias e sua forma de administração merecem mais estudos. Vieira et al. (2017) mencionaram que

antiparasitários tem efeito inibidor *in vitro* sobre fungos nematófagos, e dentre esses o *D. flagrans*, comprometendo suas atividades como agentes de controle biológico.

Por outro lado, Vilela et al. (2018) registraram a eficácia no controle de nematoides gastrintestinais de ovinos quando administraram *D. flagrans* (AC001) encapsulados com alginato de sódio em associação ao cloridrato de levamisole 5%. Contudo, vale ressaltar que o encapsulamento de fungos nematófagos é uma maneira viável e segura que visa a passagem do fungo pelo aparelho gastrintestinal dos bovinos e proteção contra fatores intrínsecos e extrínsecos (Braga and Araújo, 2014; Luns et al., 2018). Assim, são necessários mais testes de compatibilidade entre fungos nematófagos e anti-helmínticos para se avaliar as alterações no desenvolvimento destes organismos causados pelo uso combinado com drogas anti-helmínticas.

Em relação ao óleo mineral 100%, a intenção dos autores foi testar um veículo que no futuro pudesse vir a ser utilizado para a administração tópica dos fungos testados no controle de *Rhabditis* spp. A utilização de fungos (conídios) diluídos em meio aquoso tem sido amplamente explorada (Mendoza de Gives et al., 2018; Silva et al., 2011), contudo, o óleo mineral pode ajudar na maior aderência dos conídios à cutícula do nematoide, sendo esta uma das principais vias da atividade predatória destes fungos (Araújo et al., 1993; Paz Silva et al., 2011).

Os óleos minerais e vegetais têm sido amplamente utilizados como adjuvantes em formulações visando manter a virulência, pois quando adicionados a suspensões fúngicas, os óleos atuam protegendo os conídios das condições ambientais desfavoráveis e até mesmo aumentam a eficácia de

fungos entomopatogênicos (Camargo et al., 2012). Todavia, este é o primeiro trabalho realizado com fungos nematófagos no uso combinado com óleo mineral 100%. Foi observado que o óleo mineral apresentou alta afinidade pelos conídios fúngicos, tornando-o um veículo em potencial para ser utilizado como adjuvante no controle biológico de *Rhabditis* spp.

No presente trabalho os autores utilizaram o dimetilsulfóxido na concentração de 1%, com a finalidade de testar esse composto como um permeabilizante no conduto auditivo dos animais, que por ventura recebam o uso combinado com fungos nematófagos. O dimetilsulfóxido 1% também apresentou alta afinidade pelos conídios fúngicos. Willian e Barry (2004) afirmaram que a pele humana, por exemplo, funciona como barreira que causa dificuldades para a liberação transdérmica de agentes terapêuticos. Segundo estes autores, para vencer tal barreira, é necessário o emprego de intensificadores de penetração, os quais são produtos químicos que interagem com constituintes cutâneos para promover o fluxo de drogas. Neste sentido, o dimetilsulfóxido 1% possui a propriedade biológica de aumentar a penetração de moléculas hidrofílicas e lipofílicas na pele (Simon et al., 2009; Willian and Barry, 2004). Nucleotídeos são exemplos deste mecanismo, quando solubilizados em solventes orgânicos a passagem de tais moléculas pela membrana celular é potencializada (Mangia et al., 2014).

Araújo e Guimarães (2002) em trabalho pioneiro comprovaram *in vitro* que o isolado NF34 foi eficiente na destruição de *Rhabditis* spp. Recentemente, Sobral et al. (2019) registraram que *D. flagrans* (AC001) e *M. thaumasium* (NF34) poderiam ser utilizados em condições *in vivo* no controle de *Rhabditis* spp. nos animais infectados. Contudo, estes autores reconhecem a importância de uma

metodologia para vias de administração tópica corretamente. No presente trabalho, a utilização de dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% conjuntamente com os conídios fúngicos obteve resultado interessante, sendo essa uma premissa para o uso combinado tópico de fungos nematófagos com estes veículos no controle de *Rhabditis* spp., e tratamento da otite parasitária a campo.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo – Código 001 da autora Carolina Magri Ferraz; assim como ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de produtividade do autor Fabio Ribeiro Braga. Ainda, também agradecem a FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo) e Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais).

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

Tabela 1. Grupos experimentais (G1 a G12) utilizados para avaliar o uso combinado de ivermectina 1%, dimetilsulfóxido 1% e óleo mineral 100% com os fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (AC001) e *Monacrosporium thaumasium* (NF34), no controle de *Rhabditis* spp.

Grupos	Design Experimental
G1	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/30 µl de <i>D. flagrans</i>
G2	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/192 µl de <i>M. thaumasium</i>
G3 (controle positivo)	500 nematoides/143 µl + 8µl de ivermectina 1%
G4 (controle positivo)	500 nematoides/143 µl + 8µl de dimetilsulfóxido 1%
G5 (controle positivo)	500 nematoides/143 µl + 1000µl de óleo mineral 100%
G6	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/30 µl de <i>D. flagrans</i> + 8µl de ivermectina 1%
G7	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/192 µl de <i>M. thaumasium</i> + 8µl de ivermectina 1%
G8	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/30 µl de <i>D. flagrans</i> + 1000µl de óleo mineral 100%
G9	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/192 µl de <i>M. thaumasium</i> + 1000µl de óleo mineral 100%
G10	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/30 µl de <i>D. flagrans</i> + 8µl de dimetilsulfóxido 1%
G11	500 nematoides/143 µl + 500 conídios/192 µl de <i>M. thaumasium</i> + 8µl de dimetilsulfóxido 1%
G12 (controle)	500 nematoides/143 µl + 100µl de água destilada

Tabela 2. Médias, desvios-padrões (DP) e percentuais de redução de *Rhabditis* spp., recuperados nos grupos experimentais (G1 a G12) após 24 horas de interação.

Grupos experimentais	<i>Rhabditis</i> spp., recuperados	
	Média±DP	% Redução
G1 - AC001	53±32,9	64,2%
G2 - NF34	30,6±28,5	79,3%
G3 - Ivermectina 1%	48,9±34,8	67%
G4 - Dimetilsulfóxido 1%	85,9±25,7	42%
G5 - Óleo Mineral 100%	107,8±8,3	27,2%
G6 - AC001 + ivermectina 1%	84±35,7	43,2%
G7 - NF34 + ivermectina 1%	103,5± 32,1	30,1%
G8 - AC001 + óleo mineral 100%	26,8±26,9	82%
G9 - NF34 + óleo mineral 100%	17±8,0	88,5%
G10 - AC001 + dimetilsulfóxido 1%	1,9±2,7	98,7%
G11 - NF34 + dimetilsulfóxido 1%	2,5±3,4	98,3%
G12 - Água destilada	148± 33,5	0%

Diferença significativa ($p < 0,01$) entre o grupo tratado e o grupo controle é indicada por um asterisco – teste de Tukey.

Capítulo 2

Efeito de nanopartículas de prata (AgNP's) de *Duddingtonia flagrans* em larvas de Ciatostomíneos (subfamília: *Cyathostominae*)

Carolina Magri Ferraz¹, Laryssa Pinheiro Costa Silva², Filippe Elias de Freitas Soares³, Ricardo Leandro Oliveira Souza¹, Fernando Luiz Tobias¹, Jackson Victor de Araújo⁴, Francielle Bosi Rodrigues⁵, Flavia Pessoa Laviola¹, Denise Coutinho Endringer⁵, Pedro Mendoza de Gives⁶, Fábio Ribeiro Braga^{1*}

¹Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico, Universidade Vila Velha, Brasil

²Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Lavras, Brasil

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Brasil

⁵Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Vila Velha, Brasil

⁶Departamento de Helmintologia, CENID-SAI, INIFAP, México

Resumo

Os ciatostomíneos são reconhecidos como um sério problema de saúde na criação de equinos em diferentes partes do mundo. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito *in vitro* de nanopartículas de prata do filtrado fúngico de *Duddingtonia flagrans* (AgNP – *D. flagrans*) sobre larvas infectantes de ciatostomíneos (L₃). Foi utilizado filtrado fúngico de *D. flagrans*, obtido a partir de meio com baixo teor de nutrientes (LMN) e enriquecido com quitina. Para a biossíntese das AgNP, solução de AgNO₃ [1:50] foi adicionada ao filtrado. A formação das AgNP – *D. flagrans* foi confirmada por absorção óptica (UV-Vis). A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada para avaliar o tamanho e a monodispersão dos AgNP. Dois grupos experimentais foram

formados em microtubos, com 5 repetições para cada grupo: grupo tratado (G1) e grupo controle (G2), durante um período de 24 horas. Nos microtubos do G1, foram adicionadas aproximadamente 120 L₃ de ciatostomíneos e 1 mL de solução de AgNP's - *D. flagrans*, na concentração de 43,4 µg/mL. Nos microtubos do G2, aproximadamente 120 L₃ e 1 mL de água destilada. A MET revelou que as AgNP – *D. flagrans* tinham uma forma esférica e tamanho aproximado de 10 nm. Ao final deste período, obteve-se um percentual de redução de 43% na população de L₃ do G1 (p <0,01) em relação ao G2. Devido à resistência parasitária dos ciatostomíneos aos medicamentos disponíveis comercialmente e a inexistência de um novo composto químico para seu controle, os autores sugerem mais estudos que possam provar a capacidade real e o uso futuro de nanopartículas de prata ecologicamente corretas no controle de pequenos strongilídeos de equinos.

Palavras-chave: equino, controle biológico, fungos nematófagos, nanopartículas de prata

1. Introdução

Ciatostomíneos (subfamília: Cyathostominae) são patógenos primários de equinos e tem sido reconhecidos como um sério problema de saúde na criação destes animais (Love et al., 1999; Matthews et al., 2004; Braga et al., 2009; Nielsen et al., 2019; Tzelos et al., 2017). Sabe-se que estes parasitos são resistentes a várias drogas anti-helmínticas, em particular ao benzimidazol, praziquantel e pirantel (Tarigo-Martinie et al., 2001; Kaplan, 2002; Drogemuller et al., 2004; Coles et al., 2006; Beech et al., 2011; Peregrine et al., 2014). Por

serem invasores altamente patogênicos e frequentes da parede intestinal, tiveram importância significativa em doenças entéricas de equinos em todo o mundo, inclusive no Brasil (Uzal e Diab, 2015; Olinda et al., 2016). Devido ao ciclo evolutivo muito rápido dos ciatostomíneos (cerca de 2 meses), é comum uma alta contaminação ambiental e recorrência de infecções por estes nematoides, principalmente nos trópicos (Braga et al., 2009; Tavela et al., 2013).

Nos últimos anos foram realizados estudos utilizando a associação de compostos químicos e fungos nematófagos (controle biológico) para o controle de ciatostomíneos e resultados promissores foram obtidos (Kaplan, 2002; Braga et al., 2009; Tavela et al., 2013; Hernández et al., 2018).

Com os avanços biotecnológicos no controle biológico, verificou-se que os fungos nematófagos podem produzir enzimas extracelulares e nanopartículas de prata (AgNP's), com atividade biológica (Braga et al., 2013; Wang et al., 2013; Costa-Silva et al., 2018, Barbosa et al., 2019). A produção dessas enzimas é precisamente a “vantagem” que os fungos têm para biossintetizar nanopartículas de prata ecológicas, pois convertem íons metálicos tóxicos em nanopartículas não tóxicas por meio de seu efeito catalítico (Khan et al., 2017).

A nanotecnologia forneceu novas soluções para problemas antigos no campo da saúde, produção, criação e nutrição animal. Sobre este fato, Barbosa et al. (2019) relataram a atividade nematicida de nanopartículas de prata biossintetizadas pelo fungo *D. flagrans* (AgNP's - *D. flagrans*) em larvas infectantes de *Ancylostoma caninum*, um nematoide potencialmente zoonótico. Além disso, nesse estudo, os autores provaram que as AgNP's - *D. flagrans* são seguras até a concentração de 43,4 µg/mL.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade nematocida de nanopartículas de prata ecologicamente corretas de *D. flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção do filtrado fúngico de *D. flagrans* e biossíntese das nanopartículas de prata (AgNP's – *D. flagrans*)

Foi utilizado o fungo nematófago *D. flagrans* (AC001). Este isolado é obtido do solo brasileiro de Viçosa, Minas Gerais, Brasil e é mantido pelo Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil, por meio da técnica de semeadura contínua em ágar-água 2%. O filtrado de *D. flagrans* foi obtido a partir da filtração do fungo cultivado em meio com baixo teor de nutriente (LMN) e enriquecido com quitina, de acordo com a metodologia de Costa Silva et al. (2017). Para a biossíntese das AgNP – *D. flagrans* a partir do filtrado fúngico, 100 ml de solução 1 mM de AgNO₃ [1:50] foram adicionados ao filtrado e este foi mantido em agitador a 120 rpm, 60°C, durante 24 horas, no escuro. A formação das AgNP - *D. flagrans* foi visualizada pela mudança de cor da solução e confirmada por absorção óptica (UV-Vis).

2.2. Caracterização das AgNP's – *D. flagrans*

A confirmação da formação das AgNP's - *D. flagrans* foi realizada utilizando um espectrofotômetro de absorbância Ultravioleta-Visível (UV-Vis, espectrofotômetro Spectramax 190), a 1 nm de resolução e varredura de 200 a 600 nm. O tamanho e a monodispersão das AgNP's - *D. flagrans* foram visualizados a partir de imagens de alta resolução obtidas por Microscopia

Eletrônica de Transmissão (MET) (Figura 1). Uma amostra da solução de AgNP - *D. flagrans* foi inserida em uma grade de cobre revestida com Formvar (Ted Pella Inc., Redding, CA, EUA) e examinada por MET usando um microscópio JEOL (JEOL, Inc., Peabody, MA, EUA), Modelo JEM1400, operando a 120 V com filamento hexaborídeo lathanum (LAB6).

2.3. Obtenção das L₃ de ciatostomíneos

Fezes frescas retiradas da ampola retal de cavalos foram obtidas usando luvas de plástico. A idade dos cavalos variava de 1,5 a 5 anos. Esses animais pertencem a uma propriedade localizada no estado do Espírito Santo, Brasil. Para o processamento das fezes, foram utilizadas 2 g de cada amostra para o exame parasitológico de contagem de ovos por grama de fezes (OPG), seguindo a metodologia de Gordon e Whitlock (1939), para avaliar a positividade para strongilídeos. A partir das amostras positivas, foram realizadas coproculturas, que em seguida foram armazenadas em uma câmara de incubação a 28 ° C por 7 dias, segundo Braga et al. (2009). Após este período, utilizando a técnica de Baermann (Staniland et al., 1954), as L₃ foram extraídas e identificadas de acordo com os critérios mencionados por Keith (1953).

2.4. Design experimental

Dois grupos experimentais foram formados em microtubos plásticos de 1,5 mL, com 5 repetições para cada grupo: grupo tratado (G1) e grupo controle (G2). Aproximadamente 120 larvas infectantes (L₃) de ciatostomíneos e 1 mL da solução de AgNP - *D. flagrans*, na concentração de 43,4 µg/mL, foram adicionadas a cada microtubo do G1 (Barbosa et al., 2019). Nos microtubos do

G2, aproximadamente 120 L₃ e 1 mL de água destilada (sem adição das nanopartículas) foram adicionados a cada microtubo. Os microtubos de ambos os grupos permaneceram por 24 horas em um agitador, no escuro. Após este período, analisou-se o conteúdo de cada microtubo para, eventualmente, contar larvas vivas e mortas, de acordo com a metodologia modificada de Braga et al. (2015).

2.5. Análise estatística

Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2003). A porcentagem de redução foi calculada utilizando a seguinte equação: % Redução = média de L₃ recuperadas do grupo controle - média de L₃ recuperadas do grupo tratado x 100 / média de L₃ recuperadas do grupo controle (Mendoza-De Gives e Vazquez e Prats 1994).

3. Resultados

A média de L₃ recuperadas no grupo tratado (G1) foi menor do que no grupo controle (G2). Ao final deste período (24 horas), obteve-se um percentual de redução de 43% de L₃ nos microtubos do G1 ($p < 0,01$) em relação ao G2. As AgNP's - *D. flagrans* apresentaram uma forte absorbância espectrofotométrica a 408 nm, característica de nanopartículas de prata. Imagens das AgNP's - *D. flagrans* foram obtidas por meio de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), registrando sua forma esférica e tamanho aproximado de 10 nm (Figura 1).

4. Discussão

No presente estudo, as AgNP's - *D. flagrans* foram eficientes na destruição das L₃ de ciatostomíneos, com efeito nematicida em 24 horas. Este resultado corrobora o estudo de Barbosa et al. (2019), na qual os autores registram que as AgNP's – *D. flagrans* foram eficientes na destruição de L₃ de *A. caninum*, promovendo extensas alterações nas cutículas das larvas. A produção das AgNP's utilizando o filtrado de *D. flagrans* como agente redutor e estabilizador foi ecologicamente correta, simples e fácil de realizar, visto que não necessitou de etapas extras de revestimento para estabilização das NP's. De igual modo, no presente trabalho, a síntese das AgNP's ocorreu via extracelular, onde a etapa de purificação é mais fácil e seu produto pode ser diretamente empregado em várias aplicações (Yadav et al., 2015). Além disso, Ingle et al. (2008) mencionaram que existe uma forte relação entre as propriedades ópticas e a forma das nanopartículas e, no presente estudo, as AgNP - *D. flagrans* apresentaram cor azulada, 10 nm de diâmetro e ressonância plasmônica de 408 nm, típica de nanopartículas esféricas de prata. Ao melhor do nosso conhecimento não existem trabalhos na literatura científica que abordem a ação de nanopartículas derivadas de fungos nematófagos sobre ciatostomíneos, sendo este o primeiro relato.

Foi observado um percentual de redução de 43% com a atividade das AgNP's – *D. flagrans* frente ao grupo controle (G2), demonstrando ser essa uma possível “ferramenta” a ser melhor explorada no campo da biotecnologia e futuramente como um nematicida sustentável. Contudo, muito ainda se deve avançar, principalmente em como se comportaria tal produto no organismo animal. Esta afirmação corrobora os resultados de Barbosa et al. (2019) que

registraram em seu teste de citotoxicidade que AgNP's - *D. flagrans* em células não cancerígenas (fibroblastos L929) não foram tóxicas até a concentração de 43,4 µg/mL, portanto, no presente trabalho, foi utilizada a mesma concentração de AgNP - *D. flagrans* e os resultados obtidos foram interessantes e pode ser usado em novas delimitações *in vivo*.

Braga et al. (2011) demonstraram que quando o extrato bruto é acrescentado de caseína, este se torna otimizado, sugerindo ação proteolítica do *D. flagrans* sobre as L₃ de ciatostomíneos, através da enzima protease. Em contrapartida, fungos nematófagos crescidos a partir de meio de cultura acrescentado de quitina, em condições laboratoriais, demonstraram atividade enzimática quitinolítica sobre ovos e larvas de helmintos (Soares, 2014; Braga et al., 2015). Neste contexto, os autores sugerem que a produção de AgNP's – *D. flagrans* provenientes de meio contendo quitina seja um fator determinante no processo de infecção da cutícula do nematoide, visto que a cutícula é uma estrutura extracelular composta principalmente por quitina e proteína e podem variar amplamente entre as espécies e entre os estádios de desenvolvimento dentro de uma mesma espécie (Fetterer e Rhoads, 1993).

Devido à resistência parasitária dos ciatostomíneos aos compostos químicos comercialmente disponíveis e à falta de um novo no mercado para seu controle, os autores sugerem mais estudos que possam provar a capacidade real e o uso futuro de nanopartículas de prata ecológicas do *D. flagrans* no controle de nematoides de equinos.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudo – Código 001 da autora Carolina Magri Ferraz; assim como ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de produtividade do autor Fabio Ribeiro Braga. Ainda, também agradecem a FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo) e Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais).

Conflito de interesse

Os autores declaram que não possuem conflito de interesse.

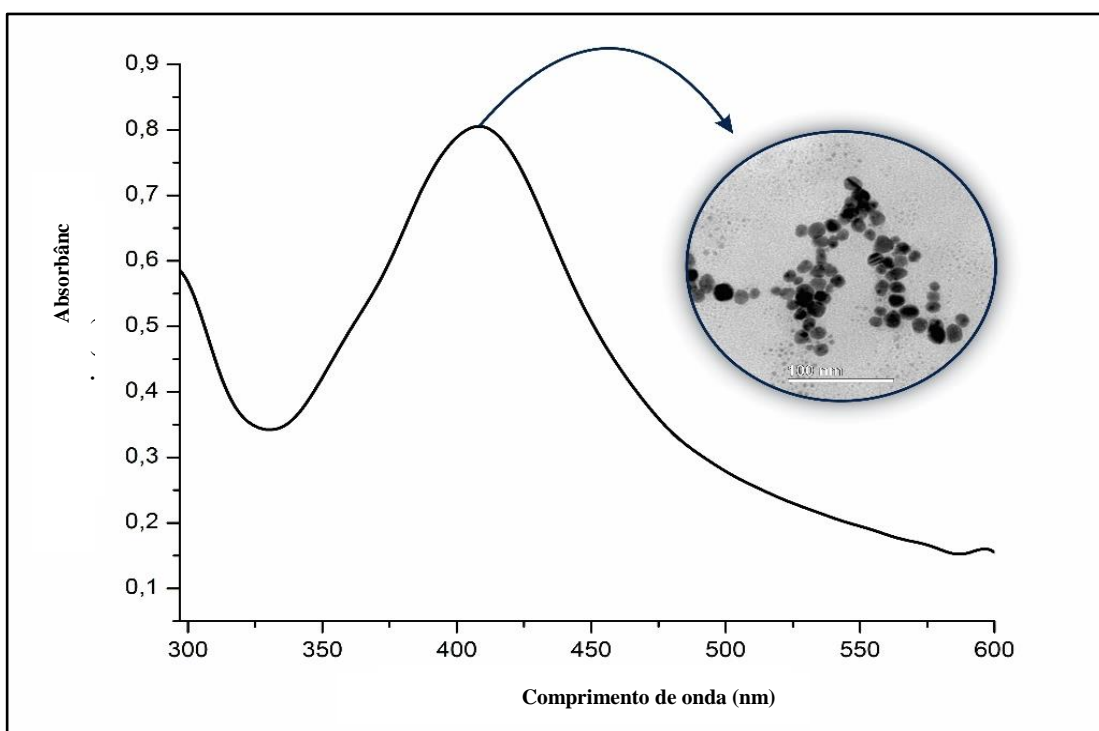


Figura 1. Caracterização das AgNP's biossintetizadas a partir do filtrado fúngico de *Duddingtonia flagrans*. Espectro UV-Vis das AgNP's – *D. flagrans* ($\lambda_{\text{max}} = 408\text{nm}$) e imagem das AgNP's obtidas por meio da MET.

Referências

- Alghuthaymi, M.A., Almoammar, H., Rai, M., Said-Galiev, E., Abd-Elsalam, K.A., 2015. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**(2), 221-236.
- AlSalhi, M.S., Devanesan, S., Alfuraydi, A.A., Vishnubalaji, R., Munusamy, M.A., 2016. Green synthesis of silver nanoparticles using *Pimpinella anisum* seeds: antimicrobial activity and cytotoxicity on human neonatal skin stromal cells and colon cancer cells. *Int J Nanotechnol Nanomed.* 11, 4439-4449.
- Anhalt, F.A., Azevedo, J.L., Sugayama, R.L., Specht, A., Barros, N.M., 2010. Potential of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Ascomycetes, hypocreales) in the control of *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera, Tortricidae) and its compatibility with chemical insecticides. *Braz. J. Biol.* 70(4), 931-936.
- Araújo, J.V., Maia, A.S., 1993. Antagonistic effect of predacious fungi *Arthrobotrys* on infective *Haemonchus placei* larvae. *J. Helminthol.* 67, 136–138.
- Araújo, J.V., Guimarães, M.P., 2002. Ação do fungo predador de nematoides *Monacrosporium thaumasium* sobre *Rhabditis* spp. *Ciê. Anim.* 12(2), 129-132.
- Ayres, M., Ayres, J.R., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2003. *BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá.

Barbosa, A.C.M.S., Silva, L.P.C., Ferraz, C.M., Tobias, F.L., Araújo, J.V., Loureiro, B., Braga, G.M.A.M., Veloso, F.B.R., Soares, F.E.F., Fronza, M., Braga, F.R., 2019. Nematicidal activity of silver nanoparticles from the fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int. J. Nanomed.* 14, 2341—2348.

Barbosa, J.D., Silva, J.B., Lima, D.H.S., Araújo, L.H.V., Santos, L.L., Reis, A.S.B., Salvarani, F.M., Brito, M.F., 2016. Detection and treatment of otitis by *Rhabditis blumi* in cattle of northern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 36(7), 605 – 610.

Beech, R.N., Skuce, P., Bartley, D.J., Martin, R.J., Prichard, R.K., Gilleard, J.S., 2011. Anthelmintic resistance: markers for resistance or susceptibility?. *Parasitology.* 138, 160-174.

Borges, F.A., Nakamura, A.Y., Almeida, G.D., Cadamuro, V.H.A., 2010. Eficácia de formulações anti-helmínticas comerciais em equinos no município de Douradina, Paraná. *Ciencia An. Bras.* 11(3).

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

Braga, F.R., Araújo, J. V., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Araujo, J.M., Ferreira, S.R., Benjamin, L.A., 2010. Predatory activity of the nematophagous fungus

Duddingtonia flagrans on horse cyathostomin infective larvae. Trop. Anim. Health Prod. 42, 1161–1165.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Araujo, J.M., Genier, H.L.A., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Queiroz, J.H., Ferreira, S.R., 2011. Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomins. J. Helminthol. 85, 164–170.

Braga, F.R., Araujo, J.M., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Tavela, A.O., Frassy, L.N., Lima, W.S., Mozzer, L.R., 2013. *In vitro* predatory activity of conidia of fungal isolates of the *Duddingtonia flagrans* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 46(1), 108-110.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Soares, F.E.F., Araujo, J.M., Ferreira, S.R., Tavela, A.O., Silveira, W.F., Queiroz, J.H., 2013. Proteolytic action of the crude extract of *Duddingtonia flagrans* on cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae) in coprocultures. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 22, 143–6.

Braga, F.R., Araújo, J.V., 2014. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(1), 71-82.

Braga, F.R., Soares, F.E.F., Giuberti, T.Z., Lopes, A.D.C.G., Lacerda, T., Ayupe, T.H., Queiroz, P.V., Gouveia, A.S., Pinheiro, L., Araújo, A.L., Queiroz, J.H.,

Araújo, J.V., 2015. Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Vet. Parasitol.* 212, 214–218.

Braga, F.R., Ferraz, C.M., da Silva, E.N., de Araújo, J.V., 2020. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control *in vivo* and *in vitro* of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *3 Biotech.* 10(2), 62.

Camargo, M.G., Gôlo, P.S., Angelo, I.C., Perinotto, W.M.S., Sá, F.A., Quinelato, S., Bittencourt, V.R.E.P., 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Vet. Parasitol.* 188, 140-147.

Campos, A.K., Mota, M.A., Araújo, J.V., Cecon, P.R., 2004. Predatory activity, radial growth and esporulation of nematode-trapping fungus *Monacrosporium* spp, submitted to cryopreservation. *Cienc. Rural.* 34(2), 465-469.

Chaparro, J.J., Villar, D., Zapata, J.D., López, S., Howell, S.B., López, A. and Storey, B. E., 2017. Multi-drugresistant *Haemonchus contortus* in a sheep flock in Antioquia, Colombia. *Vet. Parasitol.:Regional Studies and Reports*,10, 29–34.

Chitra, K., Annadurai, G., 2014. Antibacterial Activity of pH-Dependent Biosynthesized Silver Nanoparticles against Clinical Pathogen. *Biomed Res Int.* 2014:1-6.

Chowdhury, S., Basu, A., Kundu, S., 2014. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. *Nanoscale. Res. Lett.* **9**(1), 365-376.

Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **44**, 35–44.

Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna, G.V., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* **136**, 167–85.

Costa Silva, L.P., Pinto Oliveira, J., Keijok, W.J., da Silva, A.R., Aguiar, A.R., Guimarães, M.C.C., Ferraz, C.M., Araújo, J.V., Tobias, F.L., Braga, F.R., 2017. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int. J. Nanomed.* **12**, 6373–6381.

Drogemuller, M., Schnieder, T., Samson-Himmelstjerna, G.V., 2004. Beta-tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and -resistant populations. *J. Parasitol.* **90**, 868-870.

Duarte, E.R., Hamdan, J.S., 2004. Otitis in cattle, an aetiological review. J. Vet. Med. B. 51, 1-7.

Eysker, M., Klei, T.R., 1999. Mucosal larval recovery techniques of cyathostomes: can they be standardized?. 85(2), 137-144.

Esteves, I., Peteira, B., Atkins, S.D., Magan, N. and Kerry, B., 2009. Production of Extracellular Enzymes by Different Isolates of *Pochonia chlamydosporia*. Mycological Research, 113, 867–876.

Ferraz, C.M., Sobral, S.A., Senna, C.C., Junior, O.F., Moreira, T.F., Tobias, F.L., Soares, F.E.F., Geniêr, H.L.A., Vilela, V.L.R., Lima, J.A.C., de Araújo, J.V., Braga, F.R., 2019. Combined use of ivermectin, dimethyl sulfoxide, mineral oil and nematophagous fungi to control *Rhabditis* spp. Vet. Parasitol. 275, 108924.

Fetterer, R.H., Rhoads, M.L., Junior, J.F.U., 1993. Synthesis of tyrosine derived cross-links in *Ascaris suum* cuticular proteins. J. Parasitol. 79, 160-166.

Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J. Council Sci. Ind. Res. 12, 50-52.

Hernández, J.Á., Sánchez-Andrade, R., Cazapal-Monteiro, C.F., Arroyo, F.L., Sanchís, J.M., Paz-Silva, A., Arias, M.S., 2018. A combined effort to avoid strongyle infection in horses in an oceanic climate region: rotational grazing and parasitocidal fungi. Parasit. Vectors 11, 240.

Ingle, A., Gade, A., Pierrat, S., Sonnichsen, C., Rai, M., 2008. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Curr. Nanosci.* 4, 141-144.

Kaplan, R.M., 2002. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Vet. Res.* 33, 491–507.

Keith, R., 1953. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. *Aust. J. Zool.* 1, 223.

Khan, Z.U.H., Khan, A., Chen, Y., Shah, N.S., Muhammad, N., Khan, A.U., Tahir, K., Khan, F.U., Murtaza, B., Hassan, S.U., Qaisrani, S.A., Wan, P., 2017. Biomedical applications of green synthesized Nobel metal nanoparticles. *J. Photochem. Photobiol. B.* 173, 150-164.

Kulkarni, N., Muddapur, U., 2014. Biosynthesis of Metal Nanoparticles: A Review. *J Nanotechnol.* 2014: 1-8.

Leite, R.C., Leite, R.C., Faccini, L.H., 1994. Diagnóstico e tratamento da otite parasitária por nematódeos rhabditiformes em bovinos. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 3, 69-70.

Leite, P.V.B., Leite, L.B., Cunha, A.P., Silva, M.X., Bello, A.C.P.P., Domingues, L.N., Leite, J.A., Leite, R.C., 2013. Clinical aspects and dynamics of auricular parasitosis in Gir cattle. *Pesq. Vet. Bras.* 33(3), 319-325.

Love, S., Murphy, D., Mellor, D., 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Vet. Parasitol.* 31, 113-121.

Luns, F.D., Assis, R.C.L., Silva, L.P.C., Ferraz, C.M., Braga, F.R., Araújo, J.V., 2018. Coadministration of Nematophagous Fungi for Biological Control over Nematodes in Bovine in the South-Eastern Brazil. *BioMed. Res. Int.* 2018, 1-6.

Mangia, S.H., Moraes, L.F., Takahira, R.K., Motta, R.G., Franco, M.M.J., Megid, J., Silva, A.V., Paes, A.C., 2014. Efeitos colaterais do uso da ribavirina, prednisona e dimetilsulfóxido 1% em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose. *Pesq. Vet. Bras.* 34(5), 449-454.

Manjunath, P., Shivaprakash, B.V., 2013. Pharmacology and Clinical Use of Dimethyl Sulfoxide: A Review. *Int. J. Mol. Vet. Res.* 3(6).

Martins, JR.W., Nunes, I.J., Ribeiral, L.A., 1971. Nota sobre a ocorrência de Rhabditidae (Nematoda, Rhabditida) relacionados com otite em bovinos na região geo-econômica de Brasília, DF. *Ciênc. Cult.* 23, 248-249.

Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., Dowdall, S.M.J., Proudman, C.J., 2004. Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anoplocephala perfoliata*. *Vet. Res.* 35, 371–381.

Mendoza-De Gives, P., Vazquez-Prats, V.M., 1994. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. Vet. Parasitol. 5(3), 197-203.

Mendoza-de Gives, P., López-Arellano, M.E., Aguilar-Marcelino, L., Olazarán-Jenkins, S., Reyes-Guerrero, D., Ramírez-Vargas, G., Vega-Murillo, V.E., 2018. The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally treated calves maintained under tropical conditions-Dose/response assessment. Vet. Parasitol. 15(263), 66-72.

Monteiro S. Parasitologia na medicina veterinária. 1rd ed. São Paulo: Roca; 2011.

Mota, M.A., Campos, A.K., Araújo, J.V., 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. Pesq Vet Bras. 23(3).

Mota, M.A., Campos, A.K., Araújo, J.V., 2003. Influence of different storage methods on the predatory capacity of the fungi *Arthrobotrys robusta* and *Monacrosporium thaumasium* after passage through the bovine gastrointestinal tract. World. J. Microbiol. Biotechnol. 19(9), 913-916.

Msolla, P., Falmer-hansen, J., Musemakweli, M.J., 1985. Treatment of bovine parasitic otitis using ivermectin. Trop. Anim. Health. Prod. 17(3), 166-168.

Msolla, P., Matuf, E.P.M., Monrad, J., 1986. Epidemiology of Bovine Parasitic Otitis. *Trop. Anim. Health Prod.* 18, 51-52.

Msolla, P., Semuguruka, W.D., Kasuku, A.A., Shoo, M.K., 1993. Clinical observations on bovine parasitic otitis in Tanzania. *Trop. Anim. Health. Prod.* 25, 15-18.

Mukhtar, T., Pervaz, I., 2003. *In Vitro* Evaluation of Ovicidal and Larvicidal Effects of Culture Filtrate of *Verticillium chlamydosporium* Against *Meloidogyne javanica*. *Int. J. Agric. Biol.* 5(4), 576-579.

Nielsen, M.K., Sauermann, C.W., Leathwick, D.M., 2019. The effect of climate, season, and treatment intensity on anthelmintic resistance in cyathostomins: A modelling exercise. 269, 7-12.

Onatolu, U.U., Pfukenyi, D.M., Ushe, T., 1999. A retrospective epidemiological study of parasitic otitis in cattle in the South-East Lowveld of Zimbabwe. *Zimbabwe Vet. J.* 30(1), 19-24.

Olinda, R.G., Ferreira, J.S., Firmino, M.O., Alves, R.C., Dantas, A.F.M., Riet-Correa, F., 2016. Typhocolitis by Cyathostomins Larvae on a Donkey. *Acta. Sci. Vet.* 44, 133.

Patzelt, A., Lademann, J., Richter, H., Darvin, M.E., Schanzer, S., Thiede, G., 2012. *In vivo* investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Skin. Res. Technol.* 18, 364-369.

Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R.O., Cortiñas, F.J., Sánchez, J.A., Francisco, R., Arias, M., Suárez, J.L., López-Arellano, M.E., Sánchez, A.R., Mendoza-De-Gives, P.M., 2011. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Vet. Parasitol.* 30, 277–282.

Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K., 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter?. *Vet. Parasitol.* 201, 1-8.

Picoli, T., Barbosa, J.S., Vargas, G.D., Hübner, S.O., Fischer, G., 2015. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (DMSO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (mdbk). *Sci. An. Health.* 3(2), 159-168.

Round, M.C., 1962. The Helminth Parasites of Domesticated Animals in Kenya. *J. Helminthol.* 36(4), 375-449.

Sanyal, P.K., Chauhan, J.B., Mukhopadhyaya, P.N., 2004. Implications of fungicidal effects of benzimidazole compounds on in integrated nematode parasite management in livestock. *Vet. Res. Communic.* 28(5), 375-385.

Silva, A.R., Araújo, J.V., Braga, F.R., Alves, C.D.F., Frassy, L.N., 2011. Activity *in vitro* of fungal conidia of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on *Haemonchus contortus* infective larvae. *J. Helminthol.* 85(2), 138-141.

Simon, L.S., Grierson, L.M., Naseer, Z., Bookman, A.A.M., Shainhouse, J.Z., 2009. Efficacy and safety of topical diclofenac containing dimethyl sulfoxide (DMSO) compared with those of topical placebo, DMSO vehicle and oral diclofenac for knee osteoarthritis. *Pain*. 143(3), 238-245.

Singh, P., Kim, Y.J., Singh, H., Wang, C., Hwang, K.H., 2015. Biosynthesis, characterization, and antimicrobial applications of silver nanoparticles. *Int J Nanotechnol Nanomed*. 10: 2567-2577.

Soares, F.B., Monteiro, A.C., 2011. Compatibilidade de *Metarhizium anisopliae* com carrapaticidas químicos. *Arq. Inst. Biol*. 78, 385-391.

Soares, F.E.F., de Queiroz, J.H., de Araújo, J.V., Queiroz, P.V., Gouveia, A. de S., Hiura, E., Braga, F.R., 2015. Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. *Biocontrol Sci. Technol*. 25, 337–344.

Soares, F.E.F., 2014. Produção, purificação e identificação de enzimas extracelulares de fungos nematófagos e suas atividades nematicidas. Universidade Federal de Viçosa.

Sobral, S.A., Ferreira, B.S., Senna, C.C., Ferraz, C.M., Moreira, T.F., Junior, O.F.L., 2019. *Rhabditis* spp., in the Espírito Santo, State of Brazil and evaluation of biological control. *Rev. Bras. Parasitol. Vet*. 28(2), 333-337.

Staniland, L.N., 1954. A Modification of the Baermann Funnel Technique for the Collection of Nematodes from Plant Material. *J. Helminthol.* 28, 115.

Tarigo-Martinie, J.L., Wyatt, A.R., Kaplan, R.M., 2001. Prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in cyathostomes of horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1957–60.

Tavela, A.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Silveira, W.F., Silva, V.H.D., Júnior, M.C., Borges, L.A., Araujo, J.M., Benjamin, L.A., Carvalho, G.R., Paula, A.T., 2013. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Res. Vet. Sci.* 94, 568–572.

Taylor, M., Coop, R., Wall, R. *Parasitologia Veterinária*. 4rd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

Traub, R.J., 2013. *Ancylostoma ceylanicum*, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. *Int J Parasitol.* 43(12), 1009-1015.

Tzelos, T., Barbeito, J.S.G., Nielsen, M.K., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B., 2017. Strongyle egg reappearance period after moxidectin treatment and its relationship with management factors in UK equine populations. *Vet. Parasitol.* 237, 70–76.

Uzal, F.A., Diab, S.S., 2015. Gastritis, Enteritis and Colitis in Horses. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 31, 337-358.

Verocai, G.G., Fernandes, J.I., Correia, T.R., Melo, R.M.P.S., Alves, P.A.M., Scott, F.B., Grisi, L., 2009. Inefficacy of albendazole sulphoxide and ivermectin for the treatment of bovine parasitic otitis caused by rhabditiform nematodes. Pesq. Vet. Bras. 29(11), 910-912.

Vieira, F.T., Labruna, M.B., Barbosa, A.C.M.S., Aguiar, A.R., Acosta, I.C.L., Martins, T.F., Dietze, R., Braga, F.R., 2018. Occurrence of ticks in dogs in a hospital population in the state of Espírito Santo, Brazil. Pesq. Vet. Bras. 38(3), 519-521.

Vieira, J.N., Filho, F.S.M., Ferreira, G.F., Mendes, J.F., Gonçalves, C.L., Villela, M.M., Nascente, P.S., 2017. *In vitro* susceptibility of nematophagous fungi to antiparasitic drugs: interactions and implications for biological control. Braz. J. Biol. 77(3), 476-479.

Vieira, M.C.M., Silva, L.A.F., Borges, N.C., 1998. Estudo da prevalência de otites clínicas por Rhabditis sp. em bovinos da raça Gir no estado de Goiás. Goiânia - GO. Anais Esc. Agron. e Vet. 28(2), 19- 29.

Vieira, M.C.M., Silva, L.A.F., Araújo, J.L.B., 2001. Parasitic otitis by rhabditiform nematode in Gir cattle: evaluation of treatments. Ci. Anim. Bras. 2(1), 51- 55.

Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F., Braga, F.R., Vieira, V.D., Lucena, S.C., Araújo, J.V., 2018. Control of sheep gastrointestinal nematodes using the combination of *Duddingtonia flagrans* and Levamisole Hydrochloride 5%. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 27(1), 23-31.

Williams, A.C., Barry, B.W., 2004. Penetration enhancers. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56(2004), 603–618.

Wang, Y., Sun, L., Yi, S., Huang, Y., Lenaghan, S.C., Zhang, M., 2013. Naturally Occurring Nanoparticles from *Arthrobotrys oligospora* as a Potential Immunostimulatory and Antitumor Agent. *Adv. Funct. Mater.* 23(17), 2175-2184.

Yadav, A., Kon, K., Kratosova, G., Duran, N., Ingle, A.P., Rai, M., 2015. Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: progress and key aspects of research. *Biotechnol. Lett.* 37, 2099–2120.

Zhang, X.F., Liu, Z.G., Shen, W., Gurunathan, S., 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 17: 1534-1568.