

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

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO FUNGO
DUDDINGTONIA FLAGRANS E HIPOCLORITO DE SÓDIO A 5% NA
ECLOSÃO DE OVOS DE CIATOSTOMÍNEOS EM COPROCULTURAS
DE EQUINOS**

FABRÍCIO BARCELOS CALAZANS

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2022

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

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO FUNGO
DUDDINGTONIA FLAGRANS E HIPOCLORITO DE SÓDIO A 5% NA
ECLOSÃO DE OVOS DE CIATOSTOMÍNEOS EM COPROCULTURAS
DE EQUINOS**

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

FABRÍCIO BARCELOS CALAZANS

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2022

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

C142a

Calazans, Fabricio Barcelos

Avaliação de diferentes concentrações do fungo *Duddingtonia flagrans* e hipoclorito de sódio a 5% na eclosão de ovos de ciatostomíneos em coproculturas de equinos / Fabricio Barcelos Calazans. – 2022.

31 f. : il.

Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

Dissertação (mestrado em Ciências Animal) –
Universidade Vila Velha, 2022.

Inclui bibliografias.

1. Medicina Veterinária. 2. Equino. 3. Fungos nematófagos.
I. Braga, Fábio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.89

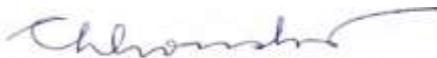
FABRÍCIO BARCELOS CALAZANS

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO FUNGO
DUDDINGTONIA FLAGRANS E HIPOCLORITO DE SÓDIO A 5% NA
ECLOSÃO DE OVOS DE CIATOSTOMÍNEOS EM COPROCULTURAS
DE EQUINOS**

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

Aprovado em 24 de fevereiro de 2022,

Banca Examinadora:



Prof. Dra. Cristiane dos Santos Honsho (Universidade Vila Velha)



Prof. Dr. Filipe Elias de Freitas Soares (Universidade Federal de Lavras)

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

Orientador

DEDICATÓRIA

A luz que me abriu os olhos, a dor dos deserdados e feridos de injustiça não me permite fechá-los nunca mais enquanto vivo. Ainda que o medo costure meus olhos, já não posso deixar de ver: a verdade tocou, com sua lâmina de amor, o centro do meu ser.

(Thiago Mello)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Santíssima Trindade e São Francisco por ter concedido essa oportunidade em minha vida.

Aos meus pais, Adilson Calazans e Maria de Lourdes por todo suporte, amor e incentivo.

Aos meus irmãos Penha e Paulo Rogerio por todo apoio necessário.

A minha afilhada Amanda, amo você.

Ao meu orientador, professor Dr. Fabio Ribeiro Braga, por seu apoio e amizade, além de sua dedicação, competência, atenção e sugestões, fatores fundamentais para realização deste trabalho.

A Dra. Carolina Ferraz pelo apoio de ter me ajudado dá o início e fim nas realizações da pesquisa.

A Dra. Emy Hiura por passar conhecimentos para início do projeto.

Ao Rancho Bela Vista Dr. Caquinho e Dr. Thaynan e professor Dr. Fernando Tobias por apoio de conseguir os animais para coleta das amostras.

Aos estagiários João e Mariana pela ajuda da preparação do experimento.

Aos meus amigos Fabio Sena, Leonardo Gorza por sempre estarem ao meu lado me ajudando e incentivando.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal que contribuíram para minha formação.

Ao funcionário da UVV, Jomar por toda ajuda e amizade.

A Universidade Vila Velha (UVV) pela oportunidade e confiança.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELA.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Os equinos e as nematodioses	12
2.2. Os pequenos estrôngilos ou ciatostomíneos.....	14
2.3. Fungos nematófagos no controle biológico de pequenos Estrongilídeos.....	15
3. OBJETIVOS.....	16
3.1. Objetivo Geral.....	16
3.2. Objetivos Específicos.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Local do Experimento.....	17
4.2. Fungo e composto químico.....	17
4.3. Obtenção de fezes de equinos parasitados com Ciatostomíneos.....	17
4.4. Ensaio Experimental.....	18
4.5. Análise Estatística.....	19
5. RESULTADOS.....	20
6. DISCUSSÃO.....	21
7. CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaio experimental dos grupos G1 a G5.....	18
Tabela 2 - Média e percentual de redução obtidas nas coproculturas após os tratamentos com diferentes concentrações do fungo <i>Duddingtonia flagrans</i> (G1 a G3), hipoclorito de sódio (G4 - controle positivo) e água destilada (G5 - controle negativo).....	20

RESUMO

CALAZANS, FABRICIO BARCELOS, M.Sc, Universidade Vila Velha-ES, Fevereiro de 2022. **Avaliação de diferentes concentrações do fungo *Duddingtonia flagrans* e hipoclorito de sódio a 5% na eclosão de ovos de ciatostomíneos em coproculturas de equinos.** Orientador: Fabio Ribeiro Braga.

Os fungos nematófagos constituem uma opção ao controle dos nematoides gastrintestinais de equinos e sua ação está concentrada no ambiente fecal e direcionada ao combate das larvas de vida livre dos parasitos. Contudo, não existem muitos trabalhos que mencionem a quantidade de estruturas fungicas (conídios e ou clamidósporos) que devem estar presente nas fezes de equinos para que se tenha um controle biológico ambiental efetivo. O presente trabalho objetivou avaliar diferentes concentrações do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) e de Hipoclorito de sódio a 5% na eclosão de ovos de ciatostomíneos, nematoides de equinos, em coproculturas de animais positivos. O ensaio experimental foi realizado no Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico e no Laboratório Clínico da Universidade Vila Velha. Foram obtidas fezes frescas de equinos diretamente da ampola retal com a finalidade de obtenção de amostras positivas para ciatostomíneos. Após a confirmação procedeu-se a realização dos ensaios. Para realização do ensaio experimental, procedeu-se o preparo das coproculturas (20 gramas de fezes) com distintas concentrações de conídios de *D. flagrans* e ou Hipoclorito de sódio a 5%. Foram formados 4 grupos tratados e 1 grupo controle (água destilada) com 5 repetições por grupo. G1 (3 milhões de conídios de AC001 + 20 gramas de fezes), G2 (6 milhões de conídios de AC001 + 20 gramas de fezes) e G3 (9 milhões de conídios de AC001 + 20 gramas de fezes), G4 (5 ml de hipoclorito de sódio 5% + 20 gramas de fezes) e G5 controle (5 ml de água destilada + 20 gramas de fezes). Em seguida, as coproculturas dos grupos tratados e controle foram mantidos em uma câmara de incubação por 10 dias a $\pm 26^{\circ}$ C. Ao final do período experimental os resultados demonstraram houve percentual de redução em todos os grupos (G1 a G4) na eclosão dos ovos de ciatostomíneos, conseqüentemente devido a menor recuperação das L3 nas coproculturas. Foi observado que a concentração de no G1 demonstrou menor percentual de redução no número médio de L3 recuperadas, mas por outro lado apresentou diferença $P < 0,01$ em relação aos demais grupos tratados e G5 controle. Por outro lado, notou-se que não houve diferença $P > 0,01$ entre as concentrações de conídios testadas nos grupos G2 e G3. Conclui-se que as distintas concentrações de conídios de AC001 foram eficientes na redução de ciatostomíneos e podem ser utilizadas em futuros trabalhos a campo, não havendo diferença ($P > 0,01$) na atividade predatória das três concentrações de conídios de AC001 testadas. Contudo, o autor chama a atenção de que o Hipoclorito de Sódio 5% demonstrou boa eficácia, podendo ser utilizado em outros delineamentos com períodos de tempo maior, com associação de AC001 + Hipoclorito de sódio 5% em um futuro trabalho experimental a campo.

Palavras chave: Coproculturas, *Duddingtonia flagrans*, ciatostomíneos, equinos.

ABSTRACT

CALAZANS, FABRICIO BARCELOS, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, February 2022. **Evaluation of different concentrations of the fungus *Duddingtonia flagrans* and 5% sodium hypochlorite on the hatching of cyathostomin eggs in horse coprocultures.** Advisor: Fabio Ribeiro Braga.

Nematophagous fungi are an option to control gastrointestinal nematodes in horses and their action is concentrated in the fecal environment and directed to combat the parasites' free-living larvae. However, there are not many studies that mention the amount of fungal structures (conidia and/or chlamydospores) that should be present in the feces of horses to have an effective environmental biological control. This study aimed to evaluate different concentrations of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* (AC001) and 5% sodium hypochlorite in the hatching of cyathostomin eggs, equine nematodes, in coprocultures of positive animals. The experimental test was carried out in the Experimental Parasitology and Biological Control Laboratory and in the Clinical Laboratory of Vila Velha University. Fresh equine feces were obtained directly from the rectal ampullae in order to obtain positive samples for cyathostomin. After confirmation we proceeded to the tests. For the experimental test, we prepared the stool cultures (20 grams of feces) with different concentrations of *D. flagrans* conidia and/or 5% sodium hypochlorite. There were 4 treated groups and 1 control group (distilled water) with 5 replicates per group. G1 (3 million conidia of AC001 + 20 grams of feces), G2 (6 million conidia of AC001 + 20 grams of feces) and G3 (9 million conidia of AC001 + 20 grams of feces), G4 (5 ml of 5% sodium hypochlorite + 20 grams of feces) and G5 control (5 ml of distilled water + 20 grams of feces). Then, the coprocultures of the treated and control groups were kept in an incubation chamber for 10 days at $\pm 26^{\circ}$ C. At the end of the experimental period, the results showed a percentage reduction in all groups (G1 to G4) in the hatching of cyathostomin eggs, consequently due to the lower recovery of L3 in the coprocultures. It was observed that the concentration of in G1 showed the lowest percentage of reduction in the average number of recovered L3, but on the other hand it showed a difference $P < 0.01$ in relation to the other treated groups and G5 control. On the other hand, it was noted that there was no difference $P > 0.01$ between the concentrations of conidia tested in groups G2 and G3. We conclude that the different concentrations of AC001 conidia were efficient in reducing cyathostomin and can be used in future field studies. There was no difference ($P > 0.01$) in the predatory activity of the three concentrations of AC001 conidia tested. However, the author points out that 5% sodium hypochlorite showed good efficacy, and can be used in other experiments with longer periods of time, with an association of AC001 + 5% sodium hypochlorite in a future experimental study in the field.

Keywords: Coprocultures, *Duddingtonia flagrans*, cyathostomin, horses

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a população de equinos é cerca de 5.577.539 animais, conferindo ao país o terceiro lugar em número de animais na América latina. O estado de Minas Gerais é o estado com o maior rebanho equídeo do país com 763.780 animais (IBGE, 2016). Contudo, a criação de equinos, mesmo sendo um forte setor do agronegócio brasileiro, enfrenta dificuldades, principalmente quando o assunto são as parasitoses gastrintestinais. Devido aos diferentes sistemas de criação e seus hábitos alimentares as infecções e recidivas das nematodioses são frequentes e com isso, em algumas situações a debilidade animal e ocorrência de óbitos podem acontecer (Molento, 2005; Ramos et al., 2014; Barbosa et al.,2018). Nos sistemas de produção de animais criados a campo, o parasitismo por nematoides parasitos gastrintestinais é um fator limitante (Braga et al., 2009; Waghorn, et al., 2003).

Dentre as várias nematodioses que acometem os equinos destaca-se a Ciatostomíase larval ou Colite X, causada pelos pequenos estrongilídeos ou ciatostomíneos, grupo com grande distribuição mundial (Moletto, 2009). Dentre os principais nematoides podem ser citados os pequenos estrôngilos ou ciatostomíneos e os grandes estrôngilos (Ramos et al.,2014).

Em relação ao controle parasitário, no geral, as drogas anti-helmínticas utilizadas em equinos já apresentam resistência parasitaria e, dessa forma pesquisas com controladores biológicos podem vir a ser uma estratégia interessante e justificada (Braga et al., 2009). Braga et al. (2009) e Tavela et al. (2013) demonstraram que o controle biológico com fungos nematófagos e dentre eles a espécie *Duddingtonia flagrans* poderia vir a ser uma boa estratégia de controle parasitário de equinos, mas aqueles autores chamavam atenção para o fato da baixa produção de resultados científicos com distintas contrações de estruturas fungicas destes fungos nas fezes.

Por outro lado, a utilização de desinfetantes químicos ainda é uma rotina bastante utilizada em propriedades rurais por todo o país, visando a destruição de formas pre parasitárias de organismos nocivos a saúde animal (Braga et al., 2009). A literatura menciona que as baias devem ser limpas diariamente para prevenir o acúmulo de fezes, o odor amoniacal da urina e a umidade na cama. Destacando-se

que a limpeza e desinfecção (Programa de Limpeza e Desinfecção de Baias) destes últimos podem ser feita com soluções detergentes e antissépticas (sabão neutro e hipoclorito de sódio). Contudo, a utilização de organismos vivos (fungos nematófagos) e compostos químicos como o hipoclorito nunca foi estudada no controle das formas pre-parasitárias de nematoides parasitos gastrintestinais. Dessa forma o presente trabalho teve por objetivo avaliar diferentes concentrações de conídios do fungo *Duddingtonia flagrans* e hipoclorito de sódio a 5% na eclosão de ovos de ciatostomíneos em coproculturas de equinos

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os equinos e as nematodioses

Os equinos (*Equus caballus*) e asininos (*Equus asini*) são hospedeiros de grande variedade de helmintos, principalmente os nematóides pertencentes à Superfamília *Strongyloidea* (*Strongylus vulgaris*, *Strongylus edentatus*, *Ciatostomíneos*, *Trichostrongylus axei*), Ascarioidea (*Parascaris equorum*), Rhabdiasoidea (*Strongyloides westeri*), Oxyuriodea (*Oxyuris equi*) e cestódeos da Família Anaplocephalidae (*Anoplocephala perfoliata*) (Fernández, Henningsen, Larsen, et al., 1999).

Tendo em vista os sistemas de criação e os hábitos alimentares, os equinos são altamente susceptíveis às infecções parasitárias. Eles se contaminam por meio do próprio ambiente em que vivem, sejam pastagens ou baias. As nematodioses são apontadas como uma das principais causas do baixo rendimento zootécnico dos rebanhos e mortes precoces em animais, ainda em fase produtiva, dessa forma é importante realizar o seu controle a fim de se obter melhor desempenho dos animais (Molento, 2005).

As nematodioses nestes animais são capazes de afetar seu desenvolvimento, podendo causar desde pequenos desconfortos abdominais a casos fulminantes de cólica e morte (Almeida; Santurio; Filho, 2012). A patogenicidade destes parasitos está diretamente relacionada com a espécie envolvida, do estado de saúde do animal infectado, bem como o estágio de desenvolvimento larval destes agentes (Baudena, Chapman, Larsen, et al., 2000). As formas de criação destes animais, bem como seus hábitos alimentares favorecem a grande incidência de infecções parasitárias (Molento, 2005).

No geral, a forma larval no parasitismo gastrointestinal causa uma reação inflamatória, caracterizada por influxo de neutrófilos, eosinófilos, e macrófagos, ao penetrar na mucosa intestinal. Devido à migração das larvas ocorre arterite ileocecólica evidenciada histologicamente por inflamação multifocal, necrose e fibrose, havendo evidências de que o fator de necrose tumoral (TNF) e a interleucina (IL-1) sejam os mediadores-chave envolvidos em deflagrar a cascata inflamatória (Fernández, Larsen, Nansen, et al., 1997).

Segundo Bird, J.; Herd (1994), uma elevada importância às infecções em potros com idades inferiores há seis meses, por causar perdas econômicas resultantes de um estado geral de debilidade, atrasos no crescimento e potencialmente a morte dos animais. A transmissão ocorre de forma horizontal, sendo a principal via de contaminação dos potros, a ingestão dos ovos presentes nas pastagens. As migrações das larvas no fígado podem originar hemorragias e fibroses (Bird, J.; Herd, 1994).

Em infecções maciças, pode ocorrer fibrose difusa por todo órgão. A sintomatologia respiratória quando presente cursa com edema e consolidação provocando bronquite eosinofílica. Os parasitas adultos, no intestino delgado, apresentam ação espoliadora, afetando a ingestão dos nutrientes e alterando a motilidade intestinal, podendo apresentar consequências graves como: invaginações, oclusões e até perfurações intestinais quando a infecção for caracterizada por altas cargas parasitárias (Buzatti, A.; Paula Santos, C.; Fernandes, 2015).

Outro fator determinante para que ocorra a infecção é que os animais não adquirem imunidade protetora, como consequência, cavalos com qualquer idade podem ser afetados (Canever, Braga, Boeckh, et al, 2013). Os sinais clínicos apresentados pelos cavalos infectados são variáveis, mas os mais comuns incluem níveis reduzidos de desempenho, crescimento lento, perda de peso, pelo grosso e sem brilho, debilitação, diarreia e cólicas (Castro, Oliveira, Anjos, et al, 2003).

Fatores como as condições climáticas influenciam diretamente nas características das pastagens, criando condições propícias ao desenvolvimento de formas infectantes dos nematoides parasitos gastrintestinais (Araújo et al., 2004). Por outro lado, o uso intensivo de drogas anti-helmínticas é o modo mais comum de se promover algum tipo de controle, mas na grande maioria das vezes o mesmo se torna ineficaz, devido o problema da resistência parasitária (Molento, 2005; Araújo et al., 2010).

2.2. Os pequenos estrôngilos ou ciatostomíneos

Os pequenos estrôngilos são os nematoides de maior importância para os

equinos devido ao seu potencial patogênico, atual prevalência e capacidade de desenvolver resistência anti-helmíntica (Lester et al., 2013). Podem ser encontrados no intestino delgado e grosso dos eqüinos, são histiófagos e realizam migrações apenas na parede intestinal e entram em hipobiose. Segundo Corning (2009), os pequenos estrôngilos apresentam uma prevalência muito elevada, independentemente do clima ou do tipo de manejo, o ciclo de vida desses parasitas é direto, sem hospedeiro intermediário.

Deve ser ressaltado que 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). Sendo assim, os nematoides strongilídeos são comuns e representam um grupo de grande importância no Brasil, já que grande parte do rebanho encontra-se infectado (Castro et al., 2003).

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 (Taylor et al., 2017).

Resultados de pesquisas realizadas a campo sugerem que os equinos adquirem resistência aos pequenos strongilídeos com a idade, verificados através da redução da carga parasitária e a contagem de ovos nas fezes. Essa resposta, porém, é lenta e inconsistente na maioria dos animais e não tem relação com a intensidade do contato parasitário anterior (Assis, Araújo, 2003; Anjos, Rodrigues, 2006).

Matthews et al. (2004) mencionam que em seu ciclo biológico as larvas dos pequenos strongilídeos 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 (Kaplan, Vidyashankar, 2012).

Os principais sintomas relacionados a infecções maciças por ciatostomíneos são: emagrecimento súbito, anemia, edema, anorexia e diarreia crônica. Nos animais mais velhos a apresentação sintomatológica é mais leve. Segundo Corning (2009), a mortalidade pode chegar aos 50% nos casos de da ciatostominose larval.

2.3. Fungos nematófagos no controle biológico de pequenos estrogilídeos

Medidas alternativas que possam auxiliar no controle químico das nematodioses em equinos têm sido consideradas cada vez mais estudadas (Braga et al., 2009). Dentre elas, o controle biológico por fungos nematófagos tem se destacado como uma estratégia efetiva, no controle de pequenos estrogilídeos (Braga et al., 2010).

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).

Duddingtonia flagrans é um fungo nematófago que possui grande capacidade de produzir clamidósporos, que permanecem viáveis depois de ingeridos e eliminados pelas fezes, colonizando-as logo após a sua deposição no solo e predando os nematódeos por meio de hifas adesivas (Larsen et al., 1992; Waghorn et al., 2003). Devido a sua forma de ação, o uso do fungo *D. flagrans* tem atraído muita atenção e tem sido foco de inúmeras pesquisas na última década. Este fungo tem sido utilizado com sucesso no controle in vivo e in vivo de nematoides de equinos (Tavela et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- ✓ Avaliar o uso de diferentes concentrações de conídios do fungo *Duddingtonia flagrans* e Hipoclorito de sódio 5% na eclosão de ovos de ciatostomíneos em coproculturas positivas de equinos.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar se as distintas concentrações do fungo *D. flagrans* demonstraram eficácia na redução de larvas de ciatostomíneos
- ✓ Verificar qual a melhor concentração de conídios de *D. flagrans* pode ser utilizado em futuros delineamentos
- ✓ Comparar o uso das concentrações do fungo *D. flagrans* com o uso de Hipoclorito de sódio 5%.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local do Experimento

O ensaio experimental foi realizado no Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico e no Laboratório Clínico da Universidade Vila Velha (UVV). Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Vila Velha, sob o número 306.

4.2. Fungo e composto químico

Foi utilizado o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001), proveniente do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Este fungo foi repicado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar 2% (BDA2%), para posterior obtenção de uma solução de conídios e clamidósporos, por meio da adição de água destilada em cada placa de Petri e com auxílio de uma espátula os conídios e fragmentos miceliais foram recuperados e vertidos em tubos *Falcon* de 15 ml (Cort, James, Donald, et al., 1992).

Para o controle positivo, foi utilizado hipoclorito de sódio a 5% (Audax Butterfly®). Este produto foi obtido no comércio local.

4.3. Obtenção de fezes de equinos parasitados com Ciatostomíneos

Foram obtidas fezes frescas de equinos diretamente da ampola retal com auxílio de luva. A seguir, procedeu-se a realização da técnica de O.P.G contagem de ovos por grama de fezes de acordo com Gordon & Withlock (1939). Posteriormente, procedeu-se a realização das coproculturas e, ao final de quatorze dias, foram obtidas larvas de terceiro estágio (L3), que foram identificadas e quantificadas segundo os critérios descritos por Bevilaqua et al. (1993), em microscópio óptico, objetiva de 10x. A leitura do Baermann demonstrou que 100% das L3 visualizadas eram de ciatostomíneos.

4.4. Ensaio Experimental

Para realização do ensaio experimental, procedeu-se o preparo das

coproculturas (20 gramas de fezes) com distintas concentrações de conídios de *D. flagrans* e ou Hipoclorito de sódio a 5%. Foram formados 4 grupos tratados e 1 grupo controle (água destilada), conforme a tabela abaixo (Tabela 1), com 5 repetições por grupo.

Tabela 1 - Ensaio experimental dos grupos G1 a G5

Grupo	Ensaio Experimental
G1	Aproximadamente 3 milhões de conídios de AC001 + 20 gramas de fezes
G2	Aproximadamente 6 milhões de conídios de AC001 + 20 gramas de fezes
G3	Aproximadamente 9 milhões de conídios de AC001 + 20 gramas de fezes
G4	5 ml de hipoclorito de sódio 5% + 20 gramas de fezes
G5	5 ml de água destilada + 20 gramas de fezes

Em seguida, as coproculturas dos grupos tratados e controle foram mantidos em câmara de incubação por um período de 10 dias a $\pm 26^{\circ}$ C. Após esse período, procedeu-se a realização da técnica de Baermann conforme a metodologia descrita por Braga et al. (2010) para se avaliar o percentual de redução da L3 em cada grupo tratado e controle. O percentual de redução foi calculado utilizando-se a seguinte equação descrita por (Mendoza de Gives and Vasquez-Prates, 1994).

% Redução=

Média de L₃ recuperadas no grupo controle – média de L₃ recuperadas no grupo tratado

Média de L₃ recuperadas no grupo controle

4.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram interpretados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2003).

5. RESULTADOS

Os resultados demonstraram que ao final do período experimental (10 dias) houve percentual de redução em todos os grupos (G1 a G4) na eclosão dos ovos de ciatostomíneos, conseqüentemente devido a menor recuperação das L3 nas coproculturas (Tabela 2).

Foi observado que a concentração de no G1 demonstrou menor percentual de redução no número médio de L3 recuperadas, mas por outro lado apresentou diferença $P < 0,01$ em relação aos demais grupos tratados e G5 controle. Por outro lado, notou-se que não houve diferença $P > 0,01$ entre as concentrações de conídios testadas nos grupos G2 e G3.

É importante destacar que hipoclorito de sódio (G4 - controle positivo) também apresentou percentual de redução ao final do ensaio experimental.

Tabela 2 - Média e percentual de redução obtidas nas coproculturas após os tratamentos com diferentes concentrações do fungo *Duddingtonia flagrans* (G1 a G3), hipoclorito de sódio (G4 - controle positivo) e água destilada (G5 - controle negativo).

	Grupos Experimentais				
	G1	G2	G3	G4	G5
Média	150a	87b	60b	96bc	519bcd
% Redução	71,1%	83,2%	88,4%	81,5%	-

Media seguida pela mesma letra minúsculas nas linhas não diferem estatisticamente entre si Tukey (0.01)

6. DISCUSSÃO

De acordo com Fontenot et al. (2003), *D. flagrans* tem uma taxa ótima de crescimento em temperatura entre 20 e 30 °C de 15 e 60 mm por semana. Na presença de nematoides, esse fungo consegue produzir de 700 a 800 armadilhas por cm² em curto intervalo de tempo. No presente trabalho, houve a germinação e consequentemente a predação das L3, o que ao final do ensaio demonstrou eficácia na utilização de AC001 em distintas concentrações de conídios.

O fungo *D. flagrans* (AC001) é um fungo que possui grande capacidade de produzir clamidósporos, que permanecem viáveis depois de ingeridos e eliminados pelas fezes, colonizando-as logo após a sua deposição no solo e predando os nematódeos por meio de hifas adesivas (LARSEN et al., 1992; WAGHORN et al., 2003). Devido a sua forma de ação, o uso deste fungo tem atraído muita atenção e tem sido foco de inúmeras pesquisas na última década, contudo existem poucos relatos da sua utilização direta em coproculturas de equinos, o que pode vir a direcionar mais contribuições nessa área (Braga et al., 2009). É importante frisar que por meio das visitas realizadas na propriedade, local de coleta das amostras, os relatos do proprietário sugeriram alta infecção helmíntica, o que pode ser comprovado no O.P.G inicial dos animais.

No controle de nematoides de equinos, diversos estudos já relataram eficácia de *D. flagrans* (Madeira de Carvalho et al., 2007; Braga et al., 2009; Araujo et al., 2010; Braga et al., 2010; Braga et al., 2011). A espécie se destaca pela capacidade de produzir grande quantidade de clamidósporos, estruturas reprodutivas com parede espessa e altamente resistente, que, se ingeridos, percorrem o trato gastrointestinal dos animais e permanecem viáveis quando nas fezes. Por meio dos resultados apresentados acima, no presente trabalho, no geral a média de redução dos grupos G1, G2 e G3 foi de 80,9% ao final do ensaio, o que comprova a sua eficácia e atividade predatória em ambiente fecal, mimetizando o bolo fecal depositado durante o pastejo dos animais.

O que se percebe é que o uso combinado do controle químico e biológico representa um meio para diminuir as consequências causadas pelo uso inadequado de medicamentos isolados, porém em condições ambientais a ação dos agentes biológicos pode ser afetada de acordo com alguns autores (Sanyal et al., 2004).

Em condições ideais de temperatura e umidade, logo após sua excreção, inicia-se a colonização das fezes pelo fungo (Larsen et al., 1999). No presente trabalho, o desenvolvimento do fungo foi estimulado pelo contato com um número crescente de L₃ presentes nas coproculturas e com redução da recuperação das L₃ em todas as diferentes concentrações em G1, G2 e G3 de conídios, corroborando com Mota et al (2003) que mencionaram a produção de redes tridimensionais adesivas e a digestão dos conteúdos internos (Mota et al., 2003)

Resultados de pesquisas realizadas a campo sugerem que os equinos adquirem resistência aos pequenos strongilídeos com a idade, verificados através da redução da carga parasitária e a contagem de ovos nas fezes. Essa resposta, porém, é lenta e inconsistente na maioria dos animais e não tem relação com a intensidade do contato parasitário anterior (Assis; Araújo, 2003; Anjos; Rodrigues, 2006). Por outro lado, o presente trabalho, destacou o uso de distintas concentrações de conídios e também a utilização de composto químico e com isso demonstrando a constante busca de alternativas que possam ser sinergias ao controle que utiliza apenas drogas anti-helmínticas.

É importante observar que a fim de se evitar a proliferação de fungos e bactérias nos equinos, é recomendável que as baias devem ser limpas uma a duas vezes diariamente com pá e vassoura. Quando se utiliza maravilha a parte úmida deve ser retirada. Uma vez por semana, logo após a limpeza, a baia deve ser pulverizada com solução de desinfetante. Ao auxiliar na eliminação de odores e bactérias relacionados à presença animal, o desinfetante agrega na manutenção de uma criação mais saudável, pois a torna menos suscetível a infecções de diferentes tipos, como virais, fungicas e bacterianas. Nesse sentido, outro ponto merece destaque, o cuidado e asseio com o animal. O hipoclorito de sódio, que é encontrado na maioria dos alvejantes, elimina a maioria das bactérias e vírus que podem causar doenças nos animais estabulado.

Os desinfetantes de amplo espectro são utilizados na higienização das instalações de equinos, e estão inclusos na categoria química dos álcoois, aldeídos, halogênicos, fenóis ou agentes de amônio quaternário (Dwyer, 2004). A eficácia dos desinfetantes pode ser reduzida ou inativada por fatores associados a limpeza das baias, como a carga orgânica, água dura e detergentes.

Ainda de acordo com Dvorak (2005), detergentes não iônicos não carregados, são detergentes industriais adequados para associação do uso de desinfetantes, de acordo com suas características, eles apresentam boa penetração e dispersão, são bons emulsificantes, apresentam eficácia na redução da tensão superficial, além de possuírem propriedades espumantes reduzidas. No presente trabalho a utilização de Hipoclorito de sódio 5% foi eficiente em reduzir nas coproculturas o número de L3. Esse resultado pode ser extrapolado no futuro para uma utilização diretamente

voltada para a limpeza das baias e desinfecção do local como um todo.

Ainda deve ser destacado aqui que, distintas concentrações do produto poderiam ser testadas com a finalidade de se observar qual a melhor concentração e diluição do produto a ser empregado com segurança e economia na rotina da limpeza das baias nas propriedades rurais. Corroborando com isso, Bull et al. (2019) mencionaram que a prática de manter cavalos em baias é comum no manejo de cavalos, essa tendência permite melhor benefícios de controle na rotina do animal, reprodução, nutrição e manejo sanitário.

A limpeza e desinfecção de todas as instalações são primordiais, existem vários tipos de pisos utilizados que visam contribuir para impedir a proliferação de fungos, bactérias e outros agentes nocivos a saúde humana. Além disso, a cama das baias, um item importante para o conforto animal deve ser trocadas diariamente, a fim de não acumular fezes, evitando com isso as reinfecções helmínticas (Majewski & Oliveira, 2020).

Por fim, é fundamental destacar que ainda não existem muito relatos do uso combinado de *D. flagrans* (conídios) e Hipoclorito de Sódio 5%, o que no futuro poderia elucidar uma possível atuação sinérgica ou não dessa associação voltada diretamente para o controle sanitário ambiental em baias de equinos estabulados e em currais no modo geral.

7. CONCLUSÃO

- ✓ As distintas concentrações de conídios de AC001 foram eficientes na redução de ciatostomíneos e podem ser utilizadas em futuros trabalhos a campo.
- ✓ Não houve diferença ($P > 0,01$) na atividade predatória das três concentrações de conídios de *D. flagrans* (AC001) testadas.
- ✓ A utilização de Hipoclorito de Sódio 5% demonstrou boa eficácia, podendo ser utilizada em outros delineamentos com períodos de tempo maior.

- ✓ Sugere-se a utilização do uso associado de AC001 com hipoclorito de sódio, destacando-se um futuro trabalho experimental a campo.

REFERÊNCIAS

Almeida, G.L.; Santurio, J.M.; Filho, J.O.J. et al. Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southern Region of Brazil. *Parasitol. Res.*, v.110, p.657-62, 2012.

Anjos, D. H. S.; Rodrigues, M. L. A. Diversity of the infra communities of strongylid nematodes in the ventral colon of *Equus caballus* from Rio de Janeiro state, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 136, n. 3-4, p. 251-257, 2006.

Araújo, J.M.; Araújo, J.V.; Braga, F.R. et al. In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri* *Parasitol. Res.*, v.107, p.103-108, 2010.

Araujo, J.V. et al. Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, n.2, p.65-71, 2004.

Assis, R. C. L.; Araújo J. V. Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrointestinal de eqüinos em formulação de alginato de sódio. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 3, p. 109-113, 2003.

Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L. & Santos, A.S. (2003) Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas. 290 pp. Belém, Sociedade civil mamiraua; Brasília, CNPq. Bevilaqua, C.M.L., 2003.

Baudena, M.A.; Chapman, M.R.; Larsen, M. et al. Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Vet. Parasitol.*, v.89, p.219-230, 2000.

Barbosa, F.C., et al., Eficácia anti-helmíntica da ivermectina em equinos: exames coproparasitológicos e hematológicos. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.19, 1-12, e-44583, 2018.

Bevilaqua, C.M.L.; Rodrigues, M.L.A.; Concordet, D. Identification of infective larvae of some common nematode strongylid of horses. *Revue Médecine Vétérinaire*, v. 44, nº 2, p. 989-995, 1993.

Bird, J.; Herd, R.P. Nematophagous fungi for the control of equine cyathostomes. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* v.16, p.658-665, 1994.

Braga, F.R.; Araújo, J.V.; Araujo, J.M. et al. Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). *Exp. Parasitol.*, v.128, p.460-463, 2011.

Braga, F.R.; Araújo, J.V.; Silva, A.R. et al. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* , v.163, p.335-340, 2009.

Braga, F.R.; Araújo, J.V.; Silva, A.R. et al. Predatory activity of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on horse cyathostomin infective larvae. *Tropical animal health and production*, v.42, p.1161-1165, 2010.

Buzatti, A.; Paula Santos, C.; Fernandes, M.A.M. et al. *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Exp. Parasitol.* v.159, p.1-4, 2015.

Bull, J., Bas, F., Silva-Guzmán, M., Wentzel, H. H., Keim, J. P., & Gandarillas, M. (2019). Characterization of feeding, sport management, and routine care of the Chilean corralero horse during rodeo season. *Animals*, 9(9), 697.

Canever, R.J.; Braga, P.R.; Boeckh, A. et al. Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Vet. Parasitol.* , v.194, p.35-39, 2013.

Castro, A.A.; Oliveira, C.R.C.; Anjos, D.H.S. et al. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.12, p.53-57, 2003.

Corning, Susan. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & vectors*, v. 2, n. 2, p. S1, 2009.

Cort, W.W.; James, E.A.; Donald, L.A. et al. Investigation on the control of hookworm disease. II. The description of an apparatus for isolating infective hookworm larvae from soil. *Am. J. Epidemiol.*, v.2, p.1-16, 1992.

Dwyer, RM 2004. Desinfecção ambiental para controle de doenças infecciosas equinas. *Veterinario. Clin. N. Am. Prática Equina.* 20 : 531-542.

Dvorak, G. 2005. Desinfecção 101. Centro de Segurança Alimentar e Saúde Pública, Iowa State University, Ames, IA.

Fernández, A.S.; Henningsen, E.; Larsen, M. et al. A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. *Equine Vet. J.*, v.31, p.488-491, 1999.

Fernández, A.S.; Larsen, M.; Nansen, P. et al. Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. *Vet. Parasitol.* , v.73, p.257-266, 1997.

Fontenot, M. E. et al. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. *Veterinary Parasitology*, v. 118, n. 3-4, p. 203- 213, 2003.

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. 1939.

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

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://serieestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PPM01>. 2016. Acesso em: 10 outubro 2020.

Kaplan, R. M.; Vidyashankar, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol*, v.186, p.70-78, 2012.

Larsen, M. Biological control of helminthes. *International Journal for Parasitology*, v.29, n.1, p.139-146, 1999.

Larsen, M.; Nansen, P.; Grøndahl, C. et al. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. *Parasitology*, v.113, p.1-6, 1996.

Larsen, M. et al. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *Journal of Helminthology*, v. 66, n.2, p.137-141, 1992.

Lester, H. E. et al. Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in Southern England. *Veterinary parasitology*, v. 197, n. 1, p. 189-196, 2013.

Madeira De Carvalho, L.M.; Gillespie, A.T.; Serra, P.M. et al. Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrogilidose equina no Ribatejo. *Rev. Port. Ciênc. Vet*, v.102, p.233-247, 2007.

Majewski, R. L., & de Oliveira, D. D. S. (2020). Equoterapia—a importância da avaliação do equino como instrumento terapêutico. *Vivências*, 16(30), 233-246.

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.; Vasquez-prats, V.M. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Veterinary Parasitology*, v. 55, n. 1-3, p. 197-203, 1994.

Molento, M.B. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Vet. Parasitol.* , v.163, p.229-234, 2009.

Molento, M.B. Parasite resistance of helminths of equids and management proposal's. *Cienc. Rural*, v.35, p.1469-1477, 2005.

Molento, M. B. Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 35, n. 6, p. 1469-1477, nov./dez. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n6/a41v35n6.pdf>>. Acesso em: 12 julho.2020.

Molento, M.B. Técnica de contagem de larvas no pasto como ferramenta para diagnóstico parasitológico. In: SIMPÓSIO DA REDE DE HELMINTOLOGIA PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2., 2001, Buenos Aires. *Anais.*. Buenos Aires: [s.n.], 2001. p.2.

Mota, M.A.; Campos, A.K.; Araújo J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesqui. Vet. Bras*, v.23, p.93-100, 2003.

Nielsen, M.K.; Reinemeyer, C.R.; Donecker, J.M. et al Anthelmintic resistance in equine parasites-Current evidence and knowledge gaps. *Vet. Parasitol.* , v.204, p.55-63, 2014.

Nansen, P. et al. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans* *Parasitology Research*, v.81, n.5, p.371-374, 1995.

Paz-Silva, A.; Francisco, I.; Valero-Coss, R.O. et al. Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Vet. Parasitol.* , v.179, p.277-282, 2011.

Ramos, O. S., et al., Levantamento quantitativo de artigos sobre endoparasitismo em equinos publicados em periódicos na área de ciências agrárias nos últimos 10 anos no Brasil. *PUBVET*, Londrina, V. 8, N. 6, Ed. 255, Art. 1690, Março, 2014. Disponível em <<https://www.pubvet.com.br/artigo/1138/>>. Acesso em:20 abril.2020.

R Core team (2013). R: a language and environment for statistical computing, version 2.15.3. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.r-project.org/>» <https://www.r-project.org/>. Acesso em 2 de jan. 2022.

Saumell, C.A.; Fernández, A.S. Hongos nematófagos para el control biológico de nemátodos parásitos de rumiantes. *Revista de Medicina Veterinaria*, v.81, n.4, p.270-273, 2000.

Santos, C.P.; Padilha, T.; Rodrigues, M.L.A. Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. *Ciênc. Rural*, v.31, p.839-842, 2001.

Santos, C.P. Isolamento, identificação, produção de fungos nematófagos e avaliação de algumas características biológicas do fungo *Duddingtonia flagrans*. 2000. 90f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

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.

Stromberg, B.E. Environmental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.* , v.72, p.247-264, 1997.

Tavela, A.E.O.; Araújo, J.V.; Braga, F.R. et al. 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.*v.94, p.568-72, 2013.

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.

Waller, P.J. Possible means of using nematophagous fungi to control nematode parasites of livestock. In: FAO. Biological control of gastro-intestinal nematodes of ruminants using predacious fungi Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998. p.11-14. (19 FAO Animal Production and Health).

Waller, P. J. et al. The potential nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. *Veterinary Parasitology*, v.102, p.299-308, 2001.

Waghorn, T.S. et al. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastro-intestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, v.118, n.-4, p. 227-234, 2003.

