

INTERAÇÃO E EFEITO OVICIDA DOS ISOLADOS *Paecilomyces lilacinus* E *Trichoderma* spp. EM OVOS DE *Ancylostoma* spp.

FERNANDO DE SOUZA MAIA FILHO¹; BIANCA HOFSTATTER¹; ANELISE FONSECA¹; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA²

¹Universidade Federal de Pelotas- fmaia2404@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – danielabraye@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Estudos sobre parasitismo em animais de companhia vêm despertando crescente interesse ante o relacionamento cada vez mais estreito entre cães e seres humanos, expondo estes últimos a agentes de zoonoses (OLIVEIRA et al. 2009). Segundo BALASSIANO (2007), os gêneros que ocorrem com maior frequência no mundo são *Ancylostoma* spp. e *Toxocara* spp.

Vários estudos referentes à contaminação ambiental e grau de infecção de cães com *Ancylostoma* spp. foram realizados por diversos autores (OLIVEIRA–SEQUEIRA et al. 2002; BLAZIUS et al. 2005; ARAÚJO 2006; SCAINI et al. 2003; KATAGIRI;OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007), demonstrando que este parasito é o mais prevalente em cães.

Problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade enfatizam a necessidade de serem implementados programas integrados de controle parasitário, que assegurem saúde e segurança dos organismos vivos, por meio de tratamentos estratégicos baseados na epidemiologia, eliminação de vermifugações desnecessárias e medidas de higiene (MOTA et al. 2003). Além disso, CORDEIRO (2008), relata que a resistência dos ovos e larvas no ambiente e a dificuldade de desinfecção justificam a necessidade de medidas alternativas que ajudem na descontaminação do solo. Diversos métodos alternativos para o controle dos nematódeos gastrintestinais têm sido pesquisados: manejo de pastagens (BRUNDSON, 1980), seleção de animais geneticamente resistentes (FRISCH e VERCOE, 1984), desenvolvimento de vacinas (EMERY, 1996) e controle biológico utilizando bactérias e fungos nematófagos (GRONVOLD et al. 1993; ARAÚJO et al. 1996), sendo este último considerado um dos mais promissores (LARSEN, 1999). Independente da forma de controle biológico, um dos fatores que deve ser levado em consideração é o ciclo biológico do parasito. Estudos com *Toxocara canis* utilizam fungos ovicidas que causam a destruição dos ovos em períodos de 14 a 21 dias. Neste parasito esse efeito é possível, uma vez que o ovo eclode em torno de 2 a 6 semanas (OVERGAAUW, 1997). No entanto, com *Ancylostoma* spp. essa metodologia não é viável, pois a eclosão dos ovos ocorre entre 24 e 48 horas. Nesse caso, podem-se utilizar extratos brutos de fungos. Estudos nesse sentido foram realizados por BRAGA et al. (2011). Todavia, é imprescindível verificar-se a capacidade de interação do fungo com o ovo antes de utilizar-se extratos brutos.

O objetivo do presente estudo é avaliar a capacidade de interação dos isolados fúngicos *Paecilomyces lilacinus* e *Trichoderma* spp. com ovos de *Ancylostoma* spp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das amostras de fezes:

As amostras de fezes foram colhidas do solo e acondicionadas em frascos plásticos, identificados com o local da coleta e imediatamente transportadas ao

laboratório de parasitologia do Instituto de Biologia/UFPel para processamento.

2.2 Obtenção dos ovos: A obtenção dos ovos seguiu o protocolo de recuperação de ovos de nematódeos gastrointestinais utilizado pela Embrapa Pecuária Sudeste (2009). Para isso, foram realizadas coleta de fezes de cães parasitados por *Ancylostoma* spp. Inicialmente as fezes foram diluídas e maceradas em água morna (+/- 40°C), filtradas em quatro peneiras com reticulações de 1mm, 105µm, 55µm e 25µm. A última peneira foi submetida a lavagem para a obtenção dos ovos que ficaram retidos. Após, essa suspensão foi centrifugada, sendo descartado o sobrenadante e novamente suspensa em solução salina saturada para suspensão dos ovos. Após centrifugação, e descarte do sobrenadante, os ovos foram adicionados de água destilada, contados em câmara de Neubauer e conservados em refrigeração com MIF (solução de mercúrio cromo/formol) até sua utilização. Essa metodologia foi adotada para que os ovos não eclodissem permitindo assim a avaliação da interação fungo-ovo.

2.3 Obtenção dos isolados fúngicos: O isolado fúngico *Paecilomyces lilacinus*, foi cedido pelo CENARGEN (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia). Já o isolado *Trichoderma* spp. foi obtido da micoteca do Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

2.4 Atividade *in vitro* dos fungos: Os fungos foram mantidos em tubos de ensaio contendo ágar batata em temperatura ambiente. A partir desses cultivos, subculturas foram realizadas para ágar batata a 25°C, durante 10-14 dias. A partir desses isolados, discos de 4 mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri contendo ágar-água 2%, a 25°C, durante 10 dias. Após esse período, uma suspensão contendo aproximadamente 10³ ovos de *Ancylostoma* spp. foi distribuída na superfície do ágar. A cada teste os ovos foram avaliados para verificar a sua integridade. Todas as placas foram incubadas a 25°C. Os grupos controles foram constituídos por placas de Petri contendo ágar-água sem fungo. Para cada fungo testado foram realizadas cinco repetições. Em intervalos de 7, 14 e 21 dias, aproximadamente 100 ovos foram retirados de cada placa de acordo com a técnica descrita por ARAÚJO et al. (1995). Os ovos foram preparados em lâminas de microscopia com uma gota de azul de Amam 1% e avaliados em microscopia de luz de acordo com os parâmetros estabelecidos por LYSEK et al. (1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observou-se que os isolados testados apresentaram interação com os ovos de *Ancylostoma* spp. aos 7 dias de avaliação. Entretanto, não houve efeito tipo três (efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, penetração de hifas e colonização interna do ovo). Já aos 14 dias, mas principalmente aos 21 dias evidenciou-se que *Paecilomyces lilacinus* interagiu com 85% dos ovos, causando efeito tipo três. Já com *Trichoderma* spp. foi observado que 98% dos ovos foram destruídos nessa data. Este resultado é relevante, uma vez que se os fungos avaliados tem capacidade de interagir com o ovo, há a possibilidade do extrato bruto dos mesmos serem capazes de impedir a eclosão do ovo impedindo, assim, que este parasito atinja a forma infectante (L3). Em ovos de *Ancylostoma* spp. não é possível utilizar-se o controle biológico com fungos nematófagos através da

interação fungo-ovo como é feito com *Toxocara canis* (ARAÚJO, 1995; CIARMELA, 2002), uma vez que a eclosão dos ovos ocorre entre 24 e 48 horas, o que inviabiliza a ação ovicida do fungo, pois o mesmo necessita de mais tempo para produzir o referido efeito. Entretanto, é possível utilizar-se extratos brutos do fungo que contenham enzimas proteolíticas, lipases e quitinases que podem atuar sobre o ovo causando a sua inviabilização em períodos de 24-48 horas. Um estudo com extrato bruto foi realizado em ovos de *Ancylostoma* spp. com o fungo *Pochonia chlamydosporia* obtendo 76,8% de redução da eclosão dos ovos *in vitro* BRAGA et al. (2011). Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que os fungos *Paecilomyces* e *Trichoderma* spp. têm capacidade de interagir e destruir os ovos de *Ancylostoma* spp., o que nos leva a crer que esses fungos produzem substâncias com capacidade ovicida.

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos demonstram que *Paecilomyces lilacinus* e *Trichoderma* spp. são capazes de colonizar e causar a destruição de ovos de *Ancylostoma* spp. Estes dados servirão de base para um futuro estudo onde será avaliado o extrato bruto desses fungos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. n.47, p.37-42, 1995.
2. ARAÚJO, J.V.; NETO, A. P.; AZEVEDO, M. H. F. Screening parasitic nematode trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**. n. 48, p. 543-552, 1996.
3. ARAÚJO, V. J. Helminthoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. **Revista Ceres, Viçosa**, v. 53, n.307, p. 363-365, 2006.
4. BALASSIANO, B.C.C. **Fatores associados à infecção natural de cães por parasitos gastrintestinais**. 2007. 70f. Tese de doutorado - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
5. BLAZIUS, R.D.; et al. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de cães errantes da cidade de Itapema, SC. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.38, n.1, p.73-74, 2005.
6. BRAGA, F.R.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A.R.; ARAÚJO, J.V.; CARVALHO, R.O.; SOARES, F.E.F.; QUEIROZ, J.H.; GÊNIER, H.L.A. Ação ovicida do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V.44, n.1 p.116-118, 2011.
7. BRUNDSON, R.V. Principles of helminth control. **Veterinary Parasitology**., Amsterdam, v.6, p.185-215, 1980.

8. CIARMELA, M.L.; MINVIELLE, M.C.; LORI, G.; BASUALDO, J.A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**. n.103 p.251–257, 2002.
9. CORDEIRO, L.N. **Efeito *in vitro* de extratos etanólicos da raiz de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.
10. EMERY, D.L. Vaccination against worm parasites of animals. **Bulletin de la Société Pathologie Exotique**. Australia, v.64, p.31-45, 1996.
11. FERREIRA, P.A.; FERRAZ, S.; LOPES, E.A.; FREITAS, L.G. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. **Revista Trópico – Ciências Agrárias e Biológicas**. n.2, p.15-21, 2008.
12. FRISCH, J. E.; VERCOE, J.E. An analysis of different cattle genotypes reared in different environments. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.103, p.137-153, 1984.
13. GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEM, P.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode trapping fungi: a survey of Danish studies. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v.48, p.311-325, 1993.
14. KATAGIRI, S. OLIVEIRA-SEQUEIRA, T.C.G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v.74, n.2, p.175-184, abr./jun., 2007.
15. LYSEK H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. **Acta University**, Palack Olumue, v.76, p.: 9-13, 1976.
16. MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 23, n.3, p. 93-100, 2003.
17. OLIVEIRA, V. S. F. et al. Ocorrência de helmintos gastrointestinais na cidade de Goiânia, Goiás. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.38, n.4, p. 279-283, 2009.
18. OLIVEIRA–SEQUEIRA, T. C. G. et al. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.19-27, 2002.
19. OVERGAAUW, P.A.M.; Aspects of *Toxocara* epidemiology: Human toxocarosis. **Critical Reviews in Microbiology** v. 23, p. 215-231,1997.