

AÇÃO DE EXTRATOS FÚNGICOS DE *Trichoderma virens* SOBRE OVOS DE TRICOSTRONGILÍDEOS - RESULTADOS PARCIAIS

CRISTIANE TELLES BAPTISTA¹; FERNANDO MAIA FILHO²; ÂNDRIOS MOREIRA²; NATÁLIA BERNE²; CAROLINE QUINTANA BRAGA²; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA³

¹Universidade Federal de Pelotas – cris-baptista@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – fmaia2404@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – andriossilvamoreira@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nbernevet@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.com

³Nome da Instituição do Orientador – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As helmintoses gastrintestinais são uma das principais causas que interferem no desenvolvimento da atividade pecuária, determinando retardo no crescimento, morte e custos com manejo (ARAÚJO, 2006). As perdas econômicas mundiais ocasionadas por parasitos gastrintestinais são estimadas em milhões de dólares/ano, isso se dá, principalmente, pelo impacto que causam na produção de carne, leite e também aos altos custos das medidas de controle (ANUALPEC, 2003). As taxas de mortalidade se mostram maiores, principalmente entre os animais jovens (GRAMINHA et al., 2001).

Dentre os parasitos gastrintestinais que mais acometem ruminantes estão os pertencentes à família Trichostrongylidae e incluem os gêneros *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Nematodirus* e *Cooperia* (FORTES, 1997). De acordo com AMARANTE e SALES (2007), *Haemonchus contortus* é o principal endoparasita de ovinos, pois devido ao seu hábito hematófago, promove quadros graves de anemia e morte.

A utilização de anti-helmínticos vem mostrando-se como um método eficaz de controlar o parasitismo. Entretanto, seu uso excessivo tem ocasionado o surgimento de nematoides resistentes (SUTHERLAND; LEATHWICK, 2011; MOLENTO, 2004). Adicionalmente, há uma grande preocupação com resíduos na carne e no leite, bem como o risco de contaminação ambiental (MOTA et al., 2003).

Neste sentido, pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de encontrar medidas alternativas para controlar as endoparasitoses, buscando minimizar o emprego de quimioterápicos e também reduzir os níveis de poluentes no ambiente e nos produtos de origem animal (MOTA et al., 2003). Entre as opções, sugere-se o controle biológico como uma alternativa viável e promissora na redução das infecções ocasionadas por parasitos gastrintestinais. Sua ação se dá por meio de organismos vivos e antagonistas naturais no ambiente (ARAÚJO et al., 2004). A utilização de fungos nematófagos como controle biológico de parasitos vem aumentando gradativamente (BRAGA et al., 2010). Estes micro-organismos estão presentes no ecossistema e sua ação é direcionada ao parasitismo dos ovos e larvas de vida livre dos geohelmintos (BRAGA et al., 2010).

O presente estudo objetivou avaliar a ação *in vitro* de extratos fúngicos de *Trichoderma virens* sobre ovos de tricostrongilídeos.

2. METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foi utilizado um isolado fúngico de *T. virens* pertencente a micoteca do Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas. As culturas foram mantidas em tubos de ensaio contendo agar batata (PDA) a 4°C, posteriormente foram subcultivadas para placas de Petri com PDA e incubadas a 25°C, durante 10 dias. Discos de 4mm de cultura do isolado fúngico foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyer contendo 100 mL de meio mínimo líquido [glicose(1,8g/L); NH4NO3(0,4g/L); MgSO47H2O (0,12g/L); Na2HPO4 7H2O (3,18g/L), KH2PO4 (0,26g/L), extrato de levedura (0,3g/L)]. Os frascos foram incubados a 25°C em agitador rotatório a 120 rpm, durante cinco dias.

A partir das culturas em meio mínimo líquido, dois diferentes extratos foram preparados: extrato filtrado (EF), obtido pela passagem do sobrenadante através de papel filtro Whatman nº1 e extrato macerado bruto (MB) obtido pela maceração do micélio em três banhos de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, o qual foi ressuspenso ao meio líquido sobrenadante. Todos os extratos foram preparados e utilizados no mesmo dia.

A coleta de fezes foi realizada da ampola retal de ovinos naturalmente infectados com nematódeos gastrointestinais. As fezes foram encaminhadas para o laboratório, acondicionadas em caixas térmicas. Para a obtenção dos ovos, no laboratório foi realizada a quantificação individual da infecção, através da técnica de Gordon & Whitlock (1939), assim sendo possível identificar as amostras positivas e negativas. As amostras positivas que apresentavam em torno de 1000 ovos por grama de fezes serão processadas de acordo com a técnica descrita por Hubert e Kerboeuf (1992) para recuperação de ovos, em no máximo duas horas após a coleta das fezes. Esta técnica determina que passe as amostras em quatro tamises de 1 milímetro, 105 µm, 55 µm e 25 µm. Os ovos retidos na malha de menor diâmetro serão lavados com água destilada estéril e centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos.

Em placas de cultivo de tecidos, verteu-se 500 µm dos extratos fúngicos, EF e MB. A esse volume acrescentou-se 500 µm de uma suspensão contendo aproximadamente 100 ovos de tricostrongilídeos. Nas placas correspondentes ao grupo controle verteu-se 500 µm de uma suspensão contendo aproximadamente 100 ovos de tricostrongilídeos acrescido de 500 µm de meio mínimo. Todas as placas foram incubadas a 25°C, durante 24 e 48 horas. Cada tratamento se constituiu de cinco repetições. Após 24 e 48 horas, realizou-se a leitura em lupa estereoscópica levando-se em consideração o número total de larvas (ovos eclodidos) de tricostrongilídeos presentes em cada placa dos grupos tratados e controle. Foi calculado o percentual de redução de eclosibilidade através da fórmula citado por Braga et al., (2010, 2011):

$$\% \text{ de redução} = \frac{(\text{média de larvas do grupo controle} - \text{média de larvas do grupo tratado})}{\text{média de larvas do grupo controle}} \times 100$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que os extratos fúngicos empregados neste estudo foram capazes de inibir a eclosibilidade dos ovos de tricostrongilídeos. Em 24 horas de incubação, os extratos fúngicos EF e MB inibiram a eclosibilidade em 87,5% e 98,2% dos ovos; e em 48 horas a inibição observada foi de 78,8% e 92,4%, respectivamente. Estudos prévios realizados por BRAGA et al. (2011) empregando extrato filtrado do fungo *Pochonia chlamydosporia* evidenciaram um percentual de redução de 76,8% na eclosão dos ovos de *Ancylostoma* spp.

Adicionalmente, os resultados do presente estudo são similares aos relatados por HOFSTATTER et al. (2016) que demonstraram redução da eclodibilidade de ovos de *Ancylostoma* spp. quando expostos aos extratos fúngicos de *Purpureocillium lilacinum* e *T. virens*. Esses autores relataram um percentual de redução de eclodibilidade de 52,25% quando utilizado o extrato macerado bruto e de 53,64% quando empregado o macerado filtrado de *T. virens*. Este é o primeiro estudo a avaliar a ação de extratos fúngicos sobre ovos de tricostrongilídeos. Embora a maioria dos estudos relatados empregue a ação predadora de fungos nematófagos sobre larvas destes parasitos (GRAMINHA et al., 2001; FONTENOT et al., 2003; ESLAMI et al., 2005). Acredita-se que o emprego de métodos que inibam a eclodibilidade de ovos de tricostrongilídeos no ambiente possa contribuir de maneira significativa no controle destas importantes parasitoses.

4. CONCLUSÕES

Os resultados *in vitro* do presente estudo evidenciam que *T. virens* pode ser um ótimo candidato no biocontrole de helmintos de importância em medicina veterinária. A probabilidade de se utilizar esses fungos em ambientes contaminados torna o controle biológico um método promissor e eficaz. Estudos utilizando métodos alternativos para controlar essa parasitose é necessária, visto que ao se reduzir o número de ovos e larvas infectantes se diminuirá a infecção das espécies suscetíveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A. F. T.; SALES, R. O. Controle de endoparasitoses dos ovinos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.1, n.1, p.91-113, 2007.

ANUALPEC: Anuário estatístico da produção animal. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. p.380, 2003.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Atividade *in vitro* dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematoídeos tricostrongilídeos (nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.2, p.65-71, 2004.

ARAÚJO, J. V. Diagnóstico das helmintoses. **Caderno Didático**, 113 Universidade Federal de Viçosa, p.9-46, 2006.

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

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. H.; SOARES, F. E. F.; GENIÉR, H. L. A.; FERREIRA, S. R.; QUEIROZ, J. H. Ovicultural action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia chlamydosporia* against cyathostomin eggs. **Veterinary Parasitology**, v.172, p.264-268, 2010.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; GENIÉR, 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(1), p.116-118, jan-fev, 2011.

CIARMELA, M. L.; LORI, M. G.; BASUALDO, J. A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.251-257, 2002.

ESLAMI, A.; RANJBAR-BAHADORI, S.; ZARE, R.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. The predatory capability of Arthrobotrys cladodes var. macroides in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Veterinary Parasitology**, v.130, p. 263-266, 2005.

FONTENOT, M.E. ; MILLER, J.E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Vet. Parasitol.** v.118, p.203–213, 2003.

FORTES, E. **Parasitologia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone., p.686, 1997.

GAMS, W.; ZARE, R. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. **Nova Hedwigia**, v.73, n.3-4, p.329-337, 2001.

GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A New Technique for Counting Nematode Eggs in sheep faeces. **Journal Council Science Industrial Research**, v.12, p. 50-52, 1939.

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CÂNDIDO, R. C.; SILVA, G. F.; COSTA, A. J.; Avaliação *in vitro* da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.22, n.1, p.11-16, 2001.

HOFSTATTER, B. D. M. ; FONSECA, A. da S.; MAIA-FILHO, F. de S.; VALENTE, J. de S. ; PERSICI, B. M.; POTTER, L.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, D. I. B. Effect of *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* spp. Eggs,. **Revista Iberoamericana de Micología**, *in press*. 2016.

HUBERT, J., KERBOEUF, D. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. **Veterinary Record**, v.130, p.442-446, 1992.

MOLENTO, M. B.; LIFSCHITZ, A.; SALLOVITZ, J.; LANUSSE, C.; PRICHARD, R. Influence of verapamil on the pharmacokinetics of the antiparasitic drugs ivermectin and moxidectin in sheep. **Parasitology Research**, v.92, p.121-127, 2004.

MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.23, n.3, p.93-100, 2003.

SUTHERLAND, I. A., LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends Parasitology**, n.27, p.176–181, 2011.