

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 trichostrongilídeos.

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 eclodibilidade 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 eclodibilidade dos ovos de tricostrongilídeos. Em 24 horas de incubação, os extratos fúngicos EF e MB inibiram a eclodibilidade 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 nematoides 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 nematoides 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.; GENIÊR, H. L. A.; FERREIRA, S. R.; QUEIROZ, J. H. Ovicidal 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.; GENIÊR, 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 nematoides 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. 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.