

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO DE EXTRATOS FÚNGICOS DE *PAECILOMYCES LILACINUS*, *TRICHODERMA HARZIANUM* E *TRICHODERMA VIRENS* SOBRE OVOS DE *ANCYLOSTOMA SPP*

FERNANDO DE SOUZA MAIA FILHO¹; BIANCA DELGADO MENEZES HOFSTÄTTER²; ANELISE OLIVEIRA DA SILVA FONSECA³; BEATRIZ MARONEZE PERSICI⁴; JULIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE⁴; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁵

¹Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS, Brasil.

²Médica Veterinária, Mestre em Ciências da Saúde.

³Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel, RS, Brasil.

⁴Bolsista de Iniciação Científica, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS, Brasil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), RS, Brasil – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Ancylostoma caninum e *Ancylostoma braziliense* tem requerido considerável atenção devido o seu potencial zoonótico que está diretamente relacionado à contaminação dos solos com fezes de animais parasitados (CARVALHO et al. 2009; BRAGA et al. 2011). Estudos de prevalência realizados em diversos países apontam taxas consideráveis de contaminação ambiental por formas infectantes desses parasitos (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007; MAHDY et al. 2012).

Embora, o uso de anti-helmínticos nos animais seja o método usual para prevenir a contaminação ambiental por ovos e larvas de *Ancylostoma spp.*, o desenvolvimento de métodos alternativos para prevenção e controle de geohelmintos são cruciais para reduzir a contaminação ambiental por formas infectantes de parasitos (CARVALHO et al. 2009). Neste contexto, os fungos nematófagos têm sido amplamente empregados no controle biológico devido à sua capacidade em apreender e digerir as formas livres (HUANG et al. 2004).

Expressiva atividade enzimática foi relatada quando culturas filtradas de *P. lilacinus* e *Trichoderma spp.* foram utilizadas sobre fitonematóides (SHARON et al. 2007; SANTIN, 2008) e quando extrato bruto enzimático de *P. chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans* foi empregado em ovos e larvas de nematoides de animais (BRAGA et al. 2010; 2011).

Contudo, extratos brutos enzimáticos dos fungos *P. lilacinus* e *Trichoderma spp.* ainda não foram testados sobre ovos de geohelmintos que eclodem em curto intervalo de tempo no ambiente, assim como *Ancylostoma spp.* O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação *in vitro* de quatro diferentes preparações de extratos fúngicos de *P. lilacinus*, *T. harzianum* e *T. virens* sobre ovos de *Ancylostoma spp.*

2. METODOLOGIA

Isolados fúngicos: Foram utilizados quatro isolados fúngicos: *P. lilacinus* CG193 e *Trichoderma harzianum* CG502, cedidos pelo Cenargen e *P. lilacinus* MICLAB009 e *Trichoderma virens* MICLAB 008 obtidos da micoteca do Laboratório de Micologia da UFPel. Discos de 4mm de cultura de cada isolado fúngico foram transferidos para

frascos tipo Erlenmeyer contendo 150 mL de meio mínimo líquido. Os frascos foram incubados a 28°C em agitador rotatório a 120 rpm, durante cinco dias. **Produção dos extratos fúngicos:** extrato bruto, constituído pelo líquido sobrenadante; extrato filtrado, obtido pela passagem do sobrenadante através de papel filtro Whatman nº1; macerado bruto, obtido pela maceração do micélio em 3 banhos de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, posteriormente ressuscitado ao meio líquido sobrenadante; e macerado filtrado, obtido da mesma maneira que o macerado bruto, porém, submetido a filtração em papel filtro Whatman nº1.

Amostras fecais: um pool de 500g de fezes frescas de cães naturalmente infectados, pertencentes ao canil municipal de Pelotas. As fezes foram diluídas e maceradas em água morna e filtradas em peneiras de reticulações de 1mm, 105µm, 55µm e 25µm. O resíduo da última peneira foi lavado em água destilada e a suspensão centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em solução salina supersaturada e novamente centrifugado nas mesmas condições. Em sequência, o sobrenadante foi filtrado em peneira de 25µm e os ovos coletados por lavagem com água destilada (Embrapa, 2009).

Ensaio experimental: os ensaios *in vitro* consistiram em quatro tratamentos e um grupo controle. Em placas de Petri foram vertidos 4 mL dos extratos fúngicos. À esse volume foi acrescido 1 mL de uma suspensão contendo 10³ ovos de *Ancylostoma* spp. Nas placas correspondentes ao grupo controle verteu-se 1 mL de uma suspensão contendo 10³ ovos de *Ancylostoma* spp acrescido de 4 mL de meio mínimo líquido. Todas as placas foram incubadas a 25°C, durante 24 horas. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições. Após 24 horas, a leitura foi realizada em lupa estereoscópica e considerou o número total de larvas de *Ancylostoma* spp. presentes nos grupos tratados e controle.

Análise estatística: Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. As análises foram efetuadas com auxílio do programa estatístico SAS considerando uma probabilidade de 5%. Também foi calculado o percentual de redução da média de larvas utilizando-se a equação descrita por Braga et al. (2010; 2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 24 horas de interação observou-se que as diferentes formulações fúngicas avaliadas (EB, EF, MB e MF) de *P. lilacinus* CG193, *P. lilacinus* MICLAB009, *T. harzianum* e *T. virens* foram capazes de reduzir, em algum percentual, a eclodibilidade dos ovos de *Ancylostoma* spp. Quando analisado o percentual de redução na eclosão dos ovos de *Ancylostoma* spp. foi evidenciado que o maior valor de redução de eclodibilidade ocorreu quando utilizado MB, observando-se um percentual de redução de 68,43% e 47,05% em *P. lilacinus* MICLAB009 e CG193, respectivamente, e 56,43% em *T. harzianum* CG502. Apenas no isolado *T. virens* o percentual de redução do MB (52,25%) foi levemente inferior ao MF (53,64%).

Embora os mecanismos de patogenicidade dos fungos nematófagos não estejam completamente elucidados, evidências mostram que enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo proteases, colagenases e quitinases podem estar envolvidas na penetração e digestão da cutícula dos nematóides (HUANG et al. 2004).

Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a atividade ovicida dos fungos avaliados sobre ovos de *Ancylostoma* spp. foi decorrente da ação de enzimas hidrolíticas.

4. CONCLUSÕES

O emprego de extratos brutos enzimáticos dos fungos *P. lilacinus*, *T. harzinum* e *T. virens* reduz significativamente a eclosão de ovos de *Ancylostoma* spp. em 24 horas de exposição, constituindo-se em promissores agentes de biocontrole de ovos de geohelmintos no ambiente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; FERREIRA, R. S.; QUEROZ, H.J. Ovicidal action of a crude enzymatic extract of the fungus *Pochonia clamydosporia* against *cyathostomin* eggs. **Veterinary Parasitology**. V.172, p.264-268, 2010.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; LIMA, W. S.; MOZZER, L. R.; QUEIROZ, J. H. Atividade larvicida do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.44, p.383-385, 2011.

CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* spp. evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. **Journal of Helminthology**.v.83, p.231-236, 2009.

EMBRAPA PECUÁRIA, SUDESTE. Protocolo de recuperação de ovos de nematóides gastrointestinais. **Protocolo laboratório sanidade animal**. n 9, 2009.

HUANG, X.; ZHAO, N.; ZHANG, K. Extracellular enzymes serving as factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Research Microbiology**. v.155, p.811–816, 2004.

KATAGIRI, S. & OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. **Arquivos do Instituto de Biologia**. v.74, p.175-184, 2007. PATRÍCIO, F. R. A.; KIMATI, H.; NETO, J. T.; PETENATTI, A.;

MAHDY, M. AK.; LIM, Y. AL.; NGUI, R.; FATIMAH, MR. S.; CHOY, S. H.; YAP, N. J.; AL; MEKHAF, H. M.; IBRAIM, J.; JUNIN, J. Prevalence and zoonotic potencial of canine hookworms in Malásia. **Biomedic**.v.5, p.1-7, 2012.

SANTIN, R. C. M. **Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris*.** 2008. 91fl. Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Fitotecnia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil .

SHARON, E.; CHET, I.; VITERBO, A.; BAR-EYAL, M.; NAGAN, H.; SAMUELS, G.J.; SPIEGEL, Y. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. **European Journal of Plant Pathology.** v.118, p.247–258, 2007.