

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DOS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Duddingtonia flagrans*
E *Arthrobotrys robusta* NA PROFILAXIA DAS INFECÇÕES
NATURAIS POR NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM
OVINOS

JULIANA ROSA CARRIJO MAUAD

Botucatu – SP

Junho/2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

EFICÁCIA DOS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Duddingtonia flagrans*
E *Arthrobotrys robusta* NA PROFILAXIA DAS INFECÇÕES
NATURAIS POR NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS EM
OVINOS

JULIANA ROSA CARRIJO MAUAD

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Francisco
Talamini do Amarante

Co-Orientador: Prof. Dr. Jackson Victor de
Araújo

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *Selma Maria de Jesus*

Mauad, Juliana Rosa Carrijo.

Eficácia dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* na profilaxia das infecções naturais por nematódeos gastrintestinais em ovinos / Juliana Rosa Carrijo Mauad. – Botucatu [s.n.], 2008.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2008.

Orientador: Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Co-Orientador: Jackson Victor de Araújo

Assunto CAPES: 50502042

1. Ovino - Parasito 2. Parasitologia veterinária

CDD 636.3089696

Palavras-chave: Helminto; *Haemonchus* spp.; Controle biológico; Ruminantes

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Juliana Rosa Carrijo Mauad

27 de Junho de 2008

Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante

Prof. Dr. Raimundo Souza Lopes

Profa. Dra. Raquel Abdallah da Rocha

Profa. Dra. Lucia H. O'Dwyer de Oliveira

Prof. Dr. Charles Ferreira Martins

DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho a meus pais:
Alfredo e Maria Cristina.....
”amor incondicional” e ao meu
“anjinho” João Alfredo, que está a
caminho...” presente de Deus
muito esperado”.*

AGRADECIMENTOS

- Prof. Dr. Alessandro Francisco Talamini do Amarante pela oportunidade, por todos os conhecimentos transmitidos e pelo direcionamento profissional.
- Prof. Dr. Jackson Victor Araújo pela co-orientação e ensinamentos.
- Prof. Dr. Eduardo Bagagli e toda equipe do Laboratório de Micologia pelas dúvidas esclarecidas e elaboração de material.
- Prof. Dr. Reinaldo José da Silva por auxiliar pacientemente na microscopia.
- Equipe do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, em especial Artur K. Campos e Fábio R. Braga pela elaboração dos péletes de fungos e por todos os esclarecimentos.
- A amiga irmã Bruna Fernanda da Silva e toda sua família pela ajuda inestimável, amizade sincera e companheirismo. “Vocês são parte da minha família”.
- A Profa. Simone Fernandes por toda colaboração e pelos conselhos oportunos.
- Ao amigo “NICO” pela ajuda em toda a fase experimental, pelo companheirismo e pelos bons e divertidos momentos na Faz. Edgardia.
- A técnica Maria Ângela Gomes pela ajuda nos momentos em que tudo parecia impossível.
- Profa. Dra. Kátia Denise S. Bresciane pela amizade e ensinamentos.
- A minha família (Pai, Mãe, Alê, Paula e Vó Cida): Pelo apoio emocional e financeiro. “Vocês são a base de tudo, meu alicerce”.
- A Sr. João e Sra. Leila Mauad, por todo carinho e apoio durante a estadia em Botucatu e por me receberem como uma filha.
- Ao meu marido Munir Mauad: Pela paciência, apoio e amor.
- Aos amigos do Departamento de Parasitologia, em especial: Aruaque, Márcia, “Bicho”, Nilza, Adriano, “Karis” e todos aqueles que contribuíram para a realização deste estudo e proporcionaram momentos de alegria durante o doutorado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Percentual de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais em coproculturas realizadas com amostras fecais obtidas dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de <i>Duddingtonia flagrans</i> ou de <i>Arthrobotrys robusta</i>	26
Tabela 2 -	Médias aritméticas (\pm desvio padrão) do número de larvas infectantes de <i>Haemonchus</i> spp. (H) e <i>Trichostrongylus</i> spp. (T) por quilograma de matéria seca em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de <i>Duddingtonia flagrans</i> ou de <i>Arthrobotrys robusta</i>	27
Tabela 3 -	Número de nematódeos em cordeiros traçadores colocados em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de <i>Duddingtonia flagrans</i> ou de <i>Arthrobotrys robusta</i> . Os traçadores foram mantidos na pastagem com os grupos experimentais de 31 de outubro à 28 de novembro de 2006.....	27
Tabela 4 -	Datas em que os animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de <i>Duddingtonia flagrans</i> ou de <i>Arthrobotrys robusta</i> , foram tratados individualmente com anti-helmíntico. Experimento com início em 13 de junho e término em 28 de novembro de 2006.....	28
Tabela 5 -	Médias mensais de temperatura, precipitação pluviométrica mensal total e média mensal de umidade relativa do ar de junho a novembro de 2006.....	29

Tabela 6 - Percentual de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais em coproculturas realizadas com amostras fecais obtidas dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de <i>Arthrobotrys robusta</i> duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007.....	31
Tabela 7 - Médias aritméticas (\pm desvio padrão) do número de larvas infectantes de <i>Haemonchus</i> spp. (H) e <i>Trichostrongylus</i> spp. (T) por quilograma de matéria seca em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam micélio de <i>Arthrobotrys robusta</i> duas vezes na semana ou diariamente.....	32
Tabela 8 - Número de nematódeos em cordeiros traçadores colocados em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam micélio de <i>Arthrobotrys robusta</i> duas vezes na semana ou diariamente. Os traçadores foram mantidos na pastagem com os grupos experimentais de 25 de junho à 23 de julho de 2007.....	32
Tabela 9 - Datas em que os animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de <i>Arthrobotrys robusta</i> duas vezes na semana ou diariamente, foram tratados individualmente com anti-helmíntico. Experimento com início em 05 de fevereiro e término em 23 de julho de 2007.....	33
Tabela 10 - Médias mensais de temperatura, precipitação pluviométrica mensal total e média mensal de umidade relativa do ar de fevereiro a julho de 2007.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema de distribuição dos piquetes e rotação dos grupos no experimento I.....	16
Figura 2 -	Esquema de distribuição dos piquetes e rotação dos grupos do experimento II.....	17
Figura 3 -	Média aritmética do peso dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de <i>Duddingtonia flagrans</i> ou de <i>Arthrobotrys robusta</i> , no período de junho a novembro de 2006.....	23
Figura 4 -	Média aritmética do volume globular dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio <i>Duddingtonia flagrans</i> e <i>Arthrobotrys robusta</i> , no período de junho a novembro de 2006.....	24
Figura 5 -	Média aritmética do número de ovos de trichostrongilídeos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio <i>Duddingtonia flagrans</i> e <i>Arthrobotrys robusta</i> no período de junho a novembro de 2006.....	25
Figura 6 -	Crescimento de estruturas fúngicas em placas de Petri visualizadas em aumento de 15x.....	26
Figura 7 -	Média aritmética do peso dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de <i>Arthrobotrys robusta</i> , duas vezes por semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007.....	29
Figura 8 -	Média aritmética do volume globular dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de <i>Arthrobotrys robusta</i> duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro à julho de 2007.....	30

Figura 9 - Média aritmética do número de ovos de estrongilídeos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam <i>Arthrobotrys robusta</i> , duas vezes por semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007.....	30
--	----

LISTA DE ABREVIÇÕES

BDA	Batata Dextrose Agar
CMA	Corn Meal Agar
GPY	Glicose, peptona sódica e levedura
L3	Larva infectante
OPG	Ovos por grama de fezes
RPM	Rotações por minuto
TGI	Trato gastrintestinal
VG	Volume globular

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1 INTRODUÇÃO.....	3
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Fungo <i>Arthrobotrys</i> spp.....	7
2.2 Fungo <i>Duddingtonia</i> spp.....	10
3 OBJETIVOS.....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1 Descrição do local.....	14
4.2 Descrição dos trabalhos experimentais.....	14
4.3 Experimento I – Avaliação dos fungos <i>Duddingtonia flagrans</i> e <i>Arthrobotrys robusta</i>	15
4.4 Experimento II – Avaliação de duas frequências de administração do fungo <i>Arthrobotrys robusta</i>	16
4.5 Produção e encapsulamento de microrganismos para os dois tipos de fungos.....	17
4.6 Variáveis avaliadas.....	18
4.6.1 Exames coproparasitológicos.....	19
4.6.2 Exames hematológicos.....	19
4.6.2.1 Volume globular.....	19
4.6.2.2 Tratamentos com anti-helmínticos.....	19
4.6.3 Pesagem dos animais.....	19
4.6.4 Quantificação de larvas infectantes (L ₃) na pastagem...	20
4.6.5 Isolamento de fungos das fezes dos animais.....	20
4.6.6 Cordeiros traçadores.....	21
4.6.7 Dados meteorológicos.....	22
4.7 Análise estatística.....	22
5 RESULTADOS.....	23

5.1 Experimento I – Avaliação dos fungos <i>Duddingtonia flagrans</i> e <i>Arthrobotrys robusta</i>	23
5.2 Experimento II – Avaliação de duas frequências de administração do fungo <i>Arthrobotrys robusta</i>	29
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÕES.....	40
8 BIBLIOGRAFIA.....	41
9 TRABALHOS CIENTÍFICOS.....	52
Seção 1.....	52
Seção 2.....	70
Anexos.....	87

CARRIJO MAUAD, J.R. **Eficácia dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* e *Arhthrobotrys robusta* na profilaxia das infecções naturais por nematódeos gastrintestinais em ovinos.** Botucatu, 2008. 100p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Um dos maiores problemas enfrentados pelos criadores de ovinos são as helmintoses gastrintestinais. O uso indiscriminado de anti-helmínticos teve como consequência a seleção de populações de helmintos resistentes. A utilização de fungos nematófagos predadores como controle biológico é uma das alternativas pesquisadas para auxiliar na profilaxia das helmintoses. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de fungos nematófagos e a administração de diferentes dosagens na profilaxia das nematodioses gastrintestinais em ovinos naturalmente infectados em Botucatu - SP. O experimento foi dividido em duas etapas, nas quais primeiramente avaliou-se o fungo mais eficaz (*Duddingtonia flagrans* e *Arhthrobotrys robusta*) e posteriormente duas dosagens do fungo *A. robusta*. As variáveis avaliadas foram: peso, volume globular (VG), ovos de strongilídeos por grama de fezes (OPG), coproculturas e larvas infectantes (L₃) na pastagem. Não houve diferença significativa no peso médio e VG entre os grupos estudados em ambos experimentos. O número médio de OPG não diferiu significativamente entre os grupos na maioria das colheitas, entretanto o grupo que recebeu o fungo *A. robusta* (Experimento I) foi o que recebeu menor quantidade de tratamentos com anti-helmínticos, logo foi o fungo utilizado para o Experimento II. Neste houve redução significativa no número de L₃ de *Trichostrongylus* spp. por quilo de matéria seca de forragem nos piquetes pastejados pelo grupo tratado diariamente com fungo *A. robusta*. *Haemonchus contortus* foi a espécie predominante em cordeiros traçadores utilizados em ambos os experimentos. Nas condições experimentais do estudo o controle biológico não foi eficaz na profilaxia das helmintoses.

Palavras-chave: Helminto, *Haemonchus* spp., Controle biológico, Ruminantes.

CARRIJO MAUAD, J.R. **Efficacy of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* at the prophylaxis of sheep gastrointestinal nematode natural infection.** Botucatu, 2008. 100p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Parasitic gastroenteritis is one of the major problems confronted of the sheep industry. The indiscriminate use of anthelmintics has had as consequence the resistant selection of helminth population. The use of nematophagous fungi as biologic control is one of the alternatives strategies to gastrointestinal nematode infection prophylaxis. The aim of this work was to evaluate the efficacy of the nematophagous fungi and its use in different doses to the prophylaxis of natural infection by gastrointestinal nematodes in sheep kept on pasture in Botucatu – SP, Brazil. The experiment was carried out in two phases: in the first trial, the comparative efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* fungi was evaluated and in the second, two different strategies of administration of *A. robusta* fungi. The measurements were: body weight, packed cell volume (PCV), faecal egg counts (FEC), and numbers of third stage larvae (L₃) on pasture. There were no significant differences regarding body weight and PCV means between the studied groups of both experiments. The mean FEC did not differ significantly between the groups at the most of the sample collections, however, the daily feed *A. robusta* group (Experiment I) received the smaller quantity of anthelmintics treatments, so it was the fungi used in the Experiment II. *Trichostrongylus* spp. L₃ numbers per kilogram of dry matter was significantly lower on pasture grazed by the daily treated group with *A. robusta* fungi. *Haemonchus contortus* was the predominant species recovered from the tracer lambs in both experiments. At the experimental conditions of the study, the biologic control was not efficient to the helminth prophylaxis in sheep.

Key – words: Helminth, *Haemonchus* spp., Ruminants, Biological control.

1. Introdução

No Brasil, até pouco tempo, apenas duas regiões se destacavam como produtoras de ovinos: a Nordeste, englobando os ovinos deslanados e a Sul com os produtores de lã e carne. No entanto, as criações de ovinos têm se expandido em todo o território nacional, como é o caso do Estado de São Paulo, o que tem despertado a necessidade de novas pesquisas para solução de problemas sanitários.

Segundo Araújo et al. (2001), um dos maiores problemas enfrentados pelos criadores são as helmintoses gastrintestinais, que causam retardo no desenvolvimento dos animais, gastos expressivos com tratamentos profiláticos e curativos e, em casos extremos, a morte. Os prejuízos econômicos devido à redução na produtividade, mortalidade e despesas com mão de obra e antiparasitários são as principais conseqüências das infecções (AMARANTE, 2001).

A maioria dos animais geralmente apresenta infecção subclínica, em virtude da imunidade adquirida, tornando-se difícil quantificar os efeitos decorrentes dessas parasitoses, além disso, animais jovens são mais susceptíveis às infecções (ARAÚJO et al., 1998; 2006). Por não terem adquirido ainda resistência imunológica aos nematódeos, os sintomas das helmintíases são mais evidentes nos animais jovens (ROCHA et al., 2005).

O uso indiscriminado de anti-helmínticos teve como conseqüência a seleção de populações de helmintos resistentes aos diferentes grupos químicos utilizados no tratamento dos ovinos (BORAY et al., 1990; AMARANTE et al., 1992; ECHEVARRIA et al., 1996; MOTA et al., 2003). Além disso, os resíduos químicos destes produtos causam impacto negativo sob o ponto vista ambiental e de saúde pública (BORAY et al., 1990).

No Estado de São Paulo, as maiores contaminações da pastagem com larvas infectantes foram registradas no período de inverno (AMARANTE e BARBOSA, 1995). Entretanto, a transmissão de nematódeos gastrintestinais em ovinos ocorre ao longo de todo o ano (AMARANTE e BARBOSA, 1995; AMARANTE et al., 1996; FERNANDES et al., 2004).

Alternativas para o controle de nematódeos gastrintestinais têm sido desenvolvidas e pesquisadas, tais como: manejo de pastagens (BRUNDSOON,

1980), seleção de animais geneticamente resistentes (FRISCH e VERCOE, 1984), desenvolvimento de vacinas (EMERY, 1996) e controle biológico (GRONVOLD et al., 1993; ARAÚJO et al., 1996). Uma das mais promissoras é o controle biológico com a utilização de fungos nematófagos predadores de larvas infectantes na pastagem (SILVA, 2003; ARAÚJO et al., 2004a, 2006).

Segundo Waller e Larsen (1993) esses fungos são os organismos antagonistas de nematódeos mais estudados, reduzindo efetivamente populações de parasitos presentes na pastagem.

No Brasil foram realizados vários estudos “in vitro” e “in vivo” com fungos nematófagos em diferentes espécies (ARAÚJO et al., 1992; ALVES et al., 2003; CASTRO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004b; 2006). Mais recentemente, alguns experimentos foram realizados a fim de avaliar a eficácia do biocontrole para pequenos ruminantes em condições naturais, ou seja, naturalmente infectados mantidos em pastagem (GRAMINHA et al., 2005; ARAÚJO et al., 2006).

Segundo Amarante (2004) para reduzir o uso de antiparasitários para a profilaxia das helmintoses é necessária à utilização de técnicas de manejo que visem diminuir a contaminação das pastagens com as larvas infectantes. Logo, categorias mais suscetíveis à verminose, como animais jovens e fêmeas no periparto se beneficiariam e conseqüentemente teriam melhor desempenho produtivo.

2. Revisão de literatura

Segundo Gronvold et al. (1996), nos sistemas biológicos, microrganismos antagonistas reguladores atuam como controladores naturais de toda população existente na natureza, os quais procuram manter o equilíbrio ambiental, independente da atuação do homem. O termo controle biológico provém da utilização destes antagonistas naturais disponíveis na fauna e flora para reduzir a quantidade de determinado agente causador de perdas produtivas, como as larvas infectantes dos parasitos gastrointestinais.

Drechsler (1937) relatou, que a maioria dos fungos nematófagos são mitospóricos e até então eram classificados na divisão dos Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae.

Apresentam micélio septado e bem desenvolvido, com reprodução agâmica através de esporos exógenos formados sobre ramificações do micélio. Entretanto, Gray (1987) relatou que a maioria dos fungos pertence aos gêneros *Arthrobotrys*, *Dactylaria*, *Dactyella*, *Trichothecium*, *Duddingtonia*, *Monacrosporium*, *Genicularia* e *Dactylariopsis*.

Os fungos, para atuarem adequadamente contra os nematódeos, devem apresentar especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva, adaptação às condições ambientais locais, capacidade para sobreviver à trajetória do trato gastrintestinal (TGI) dos animais, germinar nas fezes e capturar as larvas infectantes no ambiente (GRONVOLD et al., 1996; ARAÚJO et al., 2000; MOTA et al., 2003; GRAMINHA et al., 2005).

Fungos nematófagos e/ou antagonistas são colonizadores naturais de solos, podendo estar presentes na pastagem e serem ingeridos pelos animais. Foram primeiramente descritos há mais de um século e catalogados em mais de 150 espécies, as quais foram divididas em três grupos principais: predadores, endoparasitos e oportunistas (BARRON, 1977; GRONVOLD et al., 1993). Os predadores pertencem a um grupo heterogêneo de microfungos, caracterizado por sua habilidade em capturar e destruir nematódeos, assim como competir pelas fontes de nutrientes ou suplementos necessários para o desenvolvimento fúngico em formas de vida livre (WALLER e FAEDO, 1996).

O grupo predador é, normalmente, constituído por aqueles fungos que são capazes de matar e consumir organismos microscópicos através das armadilhas distribuídas ao longo de suas hifas. O estímulo para ativar as armadilhas acontece quando larvas de nematódeos se movimentam, pelo contato com suas excretas, compostos biológicos ou até mesmo por condições adversas, tais como: escassez de nutrientes e de água (BALAN e GERBER, 1972). O aparecimento das estruturas predadoras pode acontecer dentro de 24 horas após a interação do fungo e do nematódeo (PRAMER, 1964). Segundo Wharton e Murray (1990), a cutícula externa das larvas infectantes (L₃) dos nematódeos parasitos de animais domésticos parece não proteger as larvas da ação predatória dos fungos.

A categoria dos fungos endoparasitas, parasita obrigatoriamente nematódeos e não desenvolve hifas externas, exceto as reprodutivas (BARRON, 1977; GRONVOLD et al., 1993). Primeiramente propagam-se nas

fezes produzindo estruturas especializadas, denominadas armadilhas, com a finalidade de capturar e fixar os nematódeos. Após a fixação, o fungo penetra no interior da presa, matando-a por destruição dos seus órgãos internos. Possuem esporos bastante diversificados no tamanho, coloração, forma e resistência no ambiente. Muitos fungos nematófagos apresentam esporos secos, provenientes de estruturas de frutificação vertical, denominadas conidióforos, os quais fazem a dispersão aérea dos conídios. Enquanto em algumas espécies os conidióforos apresentam-se com apenas um conídio em sua extremidade, em outras, possuem cachos de conídios (GRONVOLD et al., 1993).

Os fungos oportunistas são parasitas de ovos. As hifas penetram através da casca do ovo, por pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração da permeabilidade da casca e, assim, expandindo seu volume. Logo, a colonização acontece quando as hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, os quais atuam como fonte de conídios, conseqüentemente colonizam o conteúdo do ovo e ou as larvas em desenvolvimento no seu interior (MORGAN-JONES e RODRÍGUES-KÁBANA, 1987).

A classificação da atividade ovicida atualmente foi simplificada e é estabelecida de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca, onde são visualizadas as hifas aderidas à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo (LYSEK e NIGENDA, 1989; LYSEK e STERBA, 1991). No grupo dos fungos ovicidas destacam-se as espécies *Pochonia chlamydosporia* e *Paecylomices lilacinus*. Esses fungos têm demonstrado atividade *in vitro* em ovos de *Fasciola hepatica* e *Schistosoma mansoni* (BRAGA et al., 2008a, 2008b). Em trabalho recente, Braga et al. (2008c) demonstraram a eficácia de *P. lilacinus* sobre ovos de *Moniezia* sp.. A ação de *P. chlamydosporia* também foi comprovada sobre ovos dos nematódeos *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* (BRAGA et al., 2007).

Larsen et al. (1994), em estudo realizado na Austrália, isolaram 48 espécies do gênero *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* de 1742 amostras de fezes

frescas de diferentes espécies animais. No Brasil, Saumell et al. (1999) identificaram alguns isolados (*Arthrobotrys oligospora*, *Monacrosporium eudermatum*, *Monacrosporium gephyropagum* e *Harposporium lilliputanum*) em fezes frescas de bovinos em Minas Gerais.

Vários estudos têm demonstrado que o uso de fungos nematófagos (WALLER et al., 1996; LARSEN, 1999) pode contribuir para o controle estratégico dos nematódeos gastrintestinais, em especial os predadores e que variedades de espécies regionais, identificadas e isoladas em diferentes solos do mundo podem demonstrar maior eficiência predatória (WALLER e FAEDO, 1996; ESLAMI et al., 2005).

Resultados satisfatórios de ensaios a campo com bovinos já foram obtidos em diferentes partes do mundo na década passada (GRONVOLD et al., 1993; LARSEN et al., 1995; NANSEN et al., 1995), entretanto, a necessidade de novas alternativas para o controle das helmintoses de pequenos ruminantes incentivou que estudos fossem direcionados a estas espécies (FONTENOT et al., 2003; WRIGHT et al., 2003; WALLER et al., 2004, 2006, GOMEZ-RINCON et al., 2006).

No Brasil foram realizados vários estudos “in vitro” e “in vivo” com fungos nematófagos em diferentes espécies de animais (ARAÚJO et al., 1992; ALVES et al., 2003; CASTRO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004a; ARAÚJO et al., 2006). Mais recentemente, alguns experimentos foram realizados a fim de avaliar a eficácia do biocontrole para pequenos ruminantes em condições naturais, ou seja, naturalmente infectados mantidos em pastagem (GRAMINHA et al., 2005; ARAÚJO et al., 2006).

2.1 Fungo *Arthrobotrys* spp.

Cooke e Godfrey (1964) classificaram o gênero *Arthrobotrys* como nematófago facultativo, o qual engloba grande número de espécies. Este gênero foi descrito primeiramente em 1839 por Corda, proveniente de amostras de solo, porém não havia sido relatada sua capacidade predatória. Todos os isolados são capazes de produzir armadilhas na presença de nematódeos de vida livre. Em geral, as espécies pertencentes ao gênero formam conídios blásticos com ramificações em até três septos, de aproximadamente 300 mm

de comprimento, formato ovóide e proliferação na extremidade dos conidióforos (ZHANG et al., 1996). Segundo Van Oorschot (1985), pode apresentar-se com seis conídios de formato ovóide, hialino, septados próximo à região mediana, com 18-27 μm de comprimento por 8 -12 μm de largura.

A diversidade na ecologia dos fungos foi demonstrada recentemente por Sue et al. (2007) em ensaio realizado na China para investigar a influência das estações e diferentes altitudes na ocorrência dos diversos gêneros e espécies. Das 17 espécies isoladas, *Arthrobotrys oligospora*, *Arthrobotrys musiformis*, *Monacrosporium ellipsosporum* e *Monacrosporium thaumasium* foram predominantes. Concluiu-se que quanto menor a altitude do local, maior a diversidade de fungos e que temperaturas mais elevadas favoreceram a quantidade dos mesmos no pasto.

A administração diária dos fungos *Dactylaria* sp., *A. oligospora* e *Duddingtonia flagrans*, durante sete dias, foi avaliada através de colheitas em três diferentes horários após ingestão (8, 16 e 24 horas). As amostras fecais colhidas foram depositadas em placas de Petri contendo 5×10^3 larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e avaliadas após 15 e 21 dias de incubação. Notou-se que o fungo *D. flagrans* teve a melhor atuação, reduzindo a porcentagem de nematódeos em 96,3% e 91,4% para observações realizadas aos 15 e 21 dias, respectivamente (FLORES-CRESPO et al., 2003).

Chauhan et al. (2005) realizaram estudo para avaliar a ação de clamidósporos dos fungos *A. musiformis* e *D. flagrans* fornecidos separadamente (G2 e G3) e agregados (G4). A dose diária utilizada foi de 1×10^6 clamidósporos durante 10 dias para ovinos (n=10) infectados artificialmente com 10.000 larvas infectantes de *H. contortus*. Quando comparados ao grupo controle (G1) não houve nenhuma diferença entre os tratamentos testados, ou seja, neste ensaio ambos os fungos foram ineficazes e não demonstraram nenhum efeito antagonista, sinérgico ou suplementar.

Araújo (1998) investigou “in vitro” a capacidade de isolados de fungos predadores das espécies *A. musiformis* (isolado 3), *Arthrobotrys conoides* (isolado A) e *Arthrobotrys robusta* (isolados B e E) de predação e matar larvas infectantes de *Cooperia punctata*. Dois grupos foram testados: grupo 1 (fungos e larvas infectantes) e grupo 2 (controle, apenas com larvas infectantes). O isolado E de *A. robusta* foi o menos eficiente com resultados estatisticamente

similares aos do grupo controle (sem fungo). Observou-se variabilidade dentro da mesma espécie de fungo quanto à capacidade predatória de larvas infectantes de *C. punctata*. Este tipo de variabilidade já havia sido relatada por Araújo et al. (1994) e Araújo e Patarroyo (1995) em estudo sobre a interação entre larvas infectantes de *Haemonchus placei* e diferentes isolados de *Arthrobotrys*.

Posteriormente, Araújo et al. (2000) avaliaram a atividade predatória de *A. robusta*, encapsulado em alginato de sódio em quatro diferentes tratamentos: péletes do fungo com parafina (G1), péletes do fungo sem parafina (G2), péletes sem parafina e sem fungo (G3) e com parafina e sem fungo (G4) formulados em diferentes temperaturas 4°C, 25°C, 30°C e 35°C. O tratamento dos péletes fúngicos sem parafina (G2), a temperatura de 4°C foi o melhor ($P < 0,01$), pois possibilitou isolamento dos fungos nas fezes entre 18 a 72 horas após administração oral dos mesmos.

O potencial dos fungos nematófagos (*Arthrobotrys* sp. e *M. thaumasium*) também foi testado em ensaio laboratorial no controle de larvas de ciatostomíneos (CASTRO et al., 2003). Os fungos foram avaliados em três temperaturas, mantidos em câmara climatizada, durante 15 dias. Os resultados sugeriram que o fungo *M. thaumasium* foi o que teve o melhor desempenho, com resultados similares em todas as temperaturas estudadas (25 °C, 28 °C e 30 °C).

Araújo et al. (2004a) avaliaram a ação predatória “in vitro” para *Cooperia* sp. e *Haemonchus* sp. de quatro diferentes isolados fúngicos (*Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense*, *Arthrobotrys robusta* e *Duddingtonia flagrans*) testados de duas maneiras: isoladamente ou associados. Os resultados foram satisfatórios ($P < 0,05$) para a recuperação do número médio de larvas infectantes em relação aos grupos de fungos testados separadamente e associados com duas variedades fúngicas ao comparar com o grupo controle, o qual teve a maior recuperação das L₃.

Araújo et al. (1998) desenvolveram, durante seis meses, experimentos a campo no município de Viçosa - MG, empregando conídeos de *A. robusta* para o controle de nematódeos de bovinos, durante seis meses. A região estudada é caracterizada por temperaturas elevadas no período chuvoso, o que favorece o crescimento dos pastos e também possibilita o desenvolvimento adequado do

fungo. Os bezerros tratados apresentaram, em relação ao grupo controle, 53,8% de redução na contagem de ovos por grama de fezes (OPG) e os animais traçadores 70,45% ($P < 0,05$) de redução na carga parasitária, nos últimos três meses do experimento (estação chuvosa). Estes resultados sugeriram, que o uso dos fungos no período chuvoso, reduziu a infestação larvária das pastagens, no período seco.

Outro estudo no campo foi realizado para avaliar o fungo *Arthrobotrys musiformis* em ovinos (GRAMINHA et al., 2005). O desenho experimental foi elaborado com três tratamentos e nove repetições para cada tratamento: controle (Grupo A), 2×10^6 conídios microencapsulados (Grupo B) e 2×10^6 conídios *in natura* (Grupo C). Os animais foram tratados semanalmente durante quatro meses. Os resultados demonstraram que o fungo não foi capaz de agir na pastagem, diminuindo a quantidade de larvas infectantes como se esperava, uma vez que os animais se reinfetavam. Fato demonstrado pela alta taxa de ovos por grama de fezes nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle.

2.2 Fungo *Duddingtonia* spp.

Segundo Van Oorschot (1985) as espécies do gênero *Duddingtonia* são caracterizadas por produzir vários conídios na extremidade dos conidióforos, os quais apresentam formato entre elíptico e ovóide, septo mediano e medem de 25-50 μm de comprimento por 10-15 μm de largura (COOKE e GODFREY, 1964). A predação realizada por esta espécie ocorre por meio de hifas adesivas e produção de grande quantidade de clamidósporo em matéria seca.

A maioria dos estudos desenvolvidos no exterior (LARSEN et al., 1994; WALLER e FAEDO, 1996) estão centrados em ensaios laboratoriais e em campo com o fungo *D. flagrans*.

Faedo et al. (1997), ao compararem os fungos *D. flagrans* e *Arthrobotrys* spp. no controle de larvas de *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos, consideraram o primeiro fungo superior em relação à sobrevivência na passagem pelo trato gastrintestinal (TGI), obtendo esporos viáveis para germinação, crescimento fecal e captura de larvas infectantes antes delas migrarem das fezes para o pasto.

Skipp et al. (2002) detectaram e isolaram o fungo *D. flagrans* em seis de 205 amostras fecais obtidas de ovinos em diferentes propriedades na Nova Zelândia. Após administração oral dos clamidósporos, detectaram o fungo nas fezes entre 16 e 40 horas após, indicando sua passagem pelo TGI.

No Brasil, Araújo et al. (2006) avaliaram a capacidade de sobrevivência após passagem no TGI de um isolado brasileiro de *D. flagrans* (AC 001) e posteriormente sua ação predatória *in vitro* para diferentes nematódeos (*Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus*). Após os tratamentos dos grupos 1 e 2 (20 g de péletes com fungo e sem fungo respectivamente), as fezes foram colhidas em diferentes intervalos do dia (14, 20, 24, 36 e 46 horas) e então avaliadas. Observaram redução significativa ($P < 0,05$) no número de larvas infectantes de ambas as espécies de nematódeos em comparação aos grupos controles nos horários de 14 e 46 horas, e também, às 20 horas para as larvas de *H. contortus*.

Trabalhos “*in vitro*” são importantes para encontrar os fungos com maior potencial para biocontrole, entretanto são limitados, pois superestimam a capacidade predatória dos fungos em ambiente restrito, onde o nematódeo não consegue escapar, e nem as reais interferências do solo são reproduzidas (ARAÚJO et al., 1992; GOMES et al., 1999). Portanto, a partir da seleção de fungos com base em testes laboratoriais faz-se necessária avaliação do fungo em ensaios no campo.

Wright et al. (2003), em estudo em campo com cabras infectadas por *Trichostrongylus*, utilizaram clamidósporos de *D. flagrans*, nas doses diárias de 5×10^7 por animal, durante 26 dias. A diferença na redução do OPG entre os animais que pastejaram após quatro semanas foi de 44% em relação aqueles que pastejaram após seis semanas.

Na Dinamarca, bovinos que receberam *D. flagrans*, diariamente, durante dois meses, apresentaram menor infecção por *Ostertagia* sp. e *Cooperia* sp., assim como propiciaram redução na infestação do pasto (LARSEN et al., 1995). Gronvold et al. (1993) administraram o fungo *Duddingtonia* sp. para bovinos e obtiveram redução de 75-85% no número de larvas infectantes na pastagem. Chartier e Pors (2003) avaliaram no campo (quatro lotes experimentais) o mesmo fungo, após infecção experimental de caprinos doadores, os quais foram artificialmente infectados com helmintos *Teladorsagia*

circumcincta e *Trichostrongylus colubriformis* ao longo das diferentes estações do ano. Os animais (n=8) foram divididos em quatro grupos: Tcir = *T. circumcincta*, TcirDf = *T. circumcincta* e ingestão do fungo *D. flagrans*, Tcol = *T. colubriformis* e TcolDf = *T. colubriformis* e ingestão do fungo. Os clamidósporos foram fornecidos ($2,5 \times 10^5$ esporos/ kg PV), uma semana antes das colheitas de amostras, as quais foram depositadas nos lotes experimentais (1m²). Os resultados foram satisfatórios: houve redução de larvas infectantes na pastagem, especialmente nos meses mais quentes.

Waller e Faedo (1996) desenvolveram formulações minerais contendo clamidósporos de *D. flagrans* com resultados positivos quando utilizados em bovinos e pequenos ruminantes.

Chandrawathani et al. (2003) realizaram na Malásia, região de clima tropical e úmido, estudo para avaliar a eficácia do fungo *D. flagrans* em duas espécies de ruminantes (ovinos e caprinos) estabulados durante 23 dias. Ambas as espécies foram infectadas artificialmente com aproximadamente 1000 larvas infectantes de *H. contortus*. Foram administradas diariamente duas doses diferentes (125.000 e 250.000 esporos/kg de peso vivo por dia) para os grupos de animais estabulados em duas formas de apresentação: granulos misturados na ração e incorporados nos blocos. Os resultados foram satisfatórios, observou-se redução entre 80 e 90% das larvas recuperadas no grupo que recebeu a menor dosagem, enquanto que nos animais tratados com 250.000 esporos/kg a redução foi de 99%.

Posteriormente, com o objetivo de avaliar a ação do fungo *D. flagrans* a campo no mesmo local, porém em longo prazo, Chandrawathani et al. (2004) realizaram ensaio experimental com duração de um ano. A pastagem de *Brachiaria humidicola* foi dividida em 10 piquetes para realização do pastejo rotacionado, nos quais 20 ovelhas permaneciam entre 3 e 4 dias. Os animais pernoitavam presos e pela manhã recebiam misturados a ração esporos na dose de 8×10^6 . O grupo controle (n=20) foi mantido nas mesmas condições, porém não recebeu suplementação com fungos. Os resultados referentes ao OPG não demonstraram diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os grupos. Entretanto, para a variável peso, o grupo que recebeu biocontrole teve significativo ganho de peso ($p = 0,054$). Já os 17 traçadores utilizados durante o

experimento, apresentaram menor média de parasitos quando mantidos com animais que receberam o fungo ($P < 0.05$).

Burke et al. (2005) testaram nos Estados Unidos a utilização de partículas de óxido de cobre em conjunto com fungo *D. flagrans* em ovinos naturalmente infectados, principalmente por *H. contortus*. Os autores sugeriram que a associação de ambos os produtos pode reduzir significativamente a infecção dos animais e o número de larvas infectantes na pastagem. Resultados estes, diferentes dos obtidos em estudo recente a campo realizado por Faessler et al. (2007) com ovelhas leiteiras, naturalmente infectadas, em três propriedades na Suíça. Os animais do grupo tratado receberam diariamente o fungo (10^6 clamidósporos de *D. flagrans*) durante quatro meses e foram avaliados quanto a taxa de infecção de nematódeos trichostrongilídeos e comparados ao grupo controle. Os resultados correspondentes à taxa de infecção dos animais tratados não foram satisfatórios.

Mainigi et al. (2006), em estudo realizado na África do Sul com caprinos, durante dois verões chuvosos, estudaram a eficácia do fungo *D. flagrans*. Além disso, trataram com anti-helmíntico os animais que se apresentaram anêmicos segundo o método FAMACHA® (VAN WYK, 1997). Os resultados referentes às variáveis avaliadas (peso dos animais, volume globular, condição corporal, opg e infestação da pastagem) não demonstraram diferenças, entretanto, os grupos que não receberam o fungo necessitaram de anti-helmíntico com maior frequência.

Resultados positivos referentes ao uso de fungos nematófagos em caprinos foram obtidos por Araújo et al. (2007) no semi-árido cearense, Brasil. Os autores acompanharam durante três meses a campo, quatro tratamentos com a espécie fúngica *Monacrosporium thaumasium*: G1 – 10 g de péletes por via oral, semanalmente; G2 – 10 g de péletes por via oral, quinzenalmente; G3 - 0,5 mL de moxidectin por 25 kg de peso vivo e G4 – controle. O G1 foi o que apresentou maior redução nos valores de OPG, menor carga parasitária e maior ganho de peso.

Já em regiões montanhosas da Espanha, ovinos tratados diariamente (5×10^5 por kg de peso vivo) com clamidósporos de *D. flagrans* nas épocas consideradas críticas (outono e primavera), causaram redução na

contaminação em 20% quando comparados ao pasto previamente pastejado pelo grupo que não recebeu o fungo (GÓMEZ-RINCÓN et al., 2006).

De acordo com Sanyal et al. (2004) e Terril et al. (2004), *D. flagrans* é utilizado com sucesso no controle biológico das helmintoses gastrintestinais de animais domésticos devido a grande produção de clamidósporos que são altamente resistentes a condições adversas, formados principalmente em condições de crescimento desfavoráveis, o que o torna um potencial controlador biológico.

3. Objetivos

Avaliar a eficácia de fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* e a frequência de administração e dosagem na profilaxia das infecções naturais por nematódeos gastrintestinais em ovinos criados a campo em Botucatu - SP.

4. Material e Métodos

4.1 Descrição do local

A parte de campo experimento foi conduzida na Área de Ovinos, do Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada na fazenda Edgardia, da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, definida pelas coordenadas geográficas 48° 24` 43`` longitude Oeste e 22° 48` 00`` de latitude Sul, solo tipo latossolo vermelho escuro, fase arenosa e a parte laboratorial no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências.

A vegetação do local, em ambos os experimentos, foi de capim Tanzânia (*Panicum maximum*). No primeiro experimento a pastagem havia sido recém-implantada, enquanto que no segundo houve pastejo prévio por ovinos.

A área total utilizada neste estudo foi subdividida em seis piquetes com 0,34 hectares cada.

4.2 Descrição dos trabalhos experimentais

O trabalho foi dividido em duas etapas, ambas com duração de seis meses. Na primeira etapa (Experimento I) foram avaliadas duas espécies de

fungos nematófagos: *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*, no período de junho a novembro de 2006. Enquanto que na segunda etapa (Experimento II), realizada entre fevereiro a julho de 2007, foi avaliado apenas o fungo *Arthrobotrys robusta*, em duas dosagens.

Em ambos os experimentos, os fungos foram administrados misturados à ração, fornecida em cocho coletivo, que comportava todos os animais lado a lado.

Foram disponibilizados para os animais durante toda fase experimental sal mineral (Nutrumin[®], Nutrumin) e água potável *ad libitum*. Nos períodos críticos do experimento, ou seja, na escassez de forragem (época seca), os animais foram suplementados com silagem de milho (2 kg/animal) e/ ou ração concentrada produzida no local (1 kg/ grupo).

Todas as Fêmeas do primeiro experimento eram vacinadas para clostridiose com vacina específica (Sintoxan[®] - Merial) e no Experimento II foi realizado a vacinação para clostridiose e pasteurelose no último mês de gestação.

4.3 Experimento I – Avaliação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*

Nesta etapa do experimento foram avaliadas duas espécies fúngicas, consideradas predadoras: *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*.

Inicialmente, foram colhidas amostras fecais de 30 borregas da raça Bergamácia, nascidas em julho de 2005, pesos similares (35 kg de peso médio) as quais permaneceram estabuladas em conjunto até o momento de início do experimento. Nessa ocasião, os animais apresentaram em média 300 ovos por grama de fezes (OPG).

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de 10 animais por piquete.

Grupo 1: controle

Grupo 2: tratado com *Duddingtonia flagrans*

Grupo 3: tratado com *Arthrobotrys robusta*.

Os péletes contendo os fungos foram misturados em 1 kg de ração e administrados duas vezes na semana, terça-feira e sexta-feira. Em trabalho anterior realizado na região, Rocha et al. (2007) utilizaram a dose de 1 g de

mistura fúngica (*D. flagrans*) para cada 10 kg de peso vivo, a qual não se mostrou eficaz. Diante desse resultado, no presente estudo optou-se por utilizar o dobro da dose: 2 g de péletes para cada 10 kg de peso vivo, tratamento administrado pela manhã. O grupo controle recebeu ração misturada com péletes similares que não continham fungo.

A área utilizada foi subdividida com cerca elétrica em seis piquetes, cada um com 0,34 hectares. Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado, mudando de piquete a cada 14 dias, conforme o esquema a seguir:

Piquete 1	Piquete 2	Piquete 3	Piquete 4	Piquete 5	Piquete 6
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3

FIGURA 1. Esquema de distribuição dos piquetes e rotação dos grupos no experimento I.

4.4 Experimento II – Avaliação de duas freqüências de administração do fungo *Arthrobotrys robusta*

Este experimento teve início em fevereiro de 2007 e foi concluído em julho de 2007. Como no experimento I, o fungo *A. robusta* foi o que apresentou os resultados mais promissores, optou-se pela escolha deste. Nesta etapa, o fungo foi avaliado, em duas dosagens. Foram utilizadas 30 ovelhas Bergamácia, com dois a cinco anos de idade. Os animais foram distribuídos em três grupos com base em contagens prévias de OPG (média 840 OPG e média de peso de 52 kg). Os péletes sem e com fungos foram misturados em 1 kg de ração e administrados duas vezes na semana (terça-feira e sexta-feira) para os grupos 1 e 2 respectivamente. Já o grupo 3 recebeu péletes com fungos diariamente. A dose fornecida para cada grupo foi de 2 g de péletes para cada 10 kg de peso vivo (Anexo 1). Neste experimento, as ovelhas foram submetidas ao manejo reprodutivo usual do local (monta controlada), com encarneamento realizado entre o final de fevereiro e durante todo mês de março com previsão de parto para julho e agosto.

A mesma área utilizada no Experimento I foi empregada neste estudo – seis piquetes com 0,34 hectares divididos com cerca elétrica. Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado, mudando de piquete a cada 14 dias, conforme esquema a seguir:

Grupo 1: controle

Grupo 2: tratado com 2 g de péletes/10 kg de peso vivo/ 2 vezes na semana (terça-feira e sexta-feira).

Grupo 3: tratado com 2 g de péletes/10 kg de peso vivo/ diariamente.

Piquete 1	Piquete 2	Piquete 3	Piquete 4	Piquete 5	Piquete 6
Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3

FIGURA 2. Esquema de distribuição dos piquetes e rotação dos grupos do experimento II.

4.5 Produção e encapsulamento de microrganismos para os dois tipos de fungos

Os isolados eram repicados periodicamente e mantidos em tubos de ensaio contendo *Corn meal agar* (CMA 2%) a 4 °C no escuro. Para induzir a massa de micélio fúngico, discos de cultura de aproximadamente 5 mm de diâmetro foram transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 150 mL de meio de cultura líquido GPY (glicose, peptona sódica e extrato de levedura), pH 6,5, sob agitação de 120 rpm, no escuro e à temperatura de 25 °C por sete dias.

O encapsulamento dos fungos seguiu a metodologia de Melo e Sanhueza (1995). Segundo os autores a formulação do tipo granulado encapsulado (pélete) do fungo nematófago mantém atividade antagônica em nível de campo e está descrita abaixo:

- Foi pesado 5 g de caulim ou bentonita esterilizados a 120⁰C por 1 hora e adicionou a este 25 mL de suspensão de conídios (10⁸ / mL) do fungo.
- Preparou-se uma solução de alginato de sódio a 1% (em água destilada, previamente aquecida a 60°C).
- Adicionou-se 75 mL da solução de alginato de sódio à mistura e agitou com um bastão de vidro.
- Misturou-se os ingredientes suavemente numa chapa de aquecimento com agitação. Nutrientes adicionais como farelo de milho, foram utilizados (0,1 a 0,2 g de farelo por litro de mistura).
- Gotejou-se a mistura, sob agitação, sobre uma solução de cloreto de cálcio (0,25M). Para homogeneizar o tamanho das gotas e, portanto, dos

grânulos, foram usadas pipetas de diâmetro semelhantes a uma bomba peristáltica.

- f) Decorridos 5 a 20 minutos, os péletes foram separados da solução através de filtração com funil de Buchner.
- g) A secagem dos péletes foi feita em estufa a 35°C, com circulação de ar (Anexo 2).
- h) Para determinar a viabilidade dos esporos encapsulados, foi plaqueado aproximadamente 20 péletes em meio batata dextrose agar 2% (BDA 2%) com gentamicina 1% e posteriormente incubou-se as culturas a 25°C por 24 horas e então quantificou-se o número de péletes germinados.
- i) Para contar o número de conídios contidos em um grânulo, procedeu-se da seguinte maneira:
 - Verteu-se 1 mL de BDA 2% com gentamicina numa lamínula que estava sobre uma lâmina de microscópio e dentro de uma placa de Petri. Todo este material foi esterilizado antes do uso.
 - Sobre o meio da lamínula cultivou um grânulo a 30°C por 48 horas.
 - Após a incubação, retirou a lamínula com o fungo germinado e a transferiu para um tubo de cultura contendo 2 mL de solução salina (0,85%).
 - Agitou-se o tubo de cultura para desagregação dos conídios e procedeu-se a contagem em hemocítômetro.

4.6 Variáveis avaliadas

As avaliações em ambos os experimentos foram realizadas a cada 14 dias. As variáveis analisadas foram: contagem de OPG, volume globular, peso dos animais, número de larvas infectantes (L₃) na pastagem, isolamento de fungos das fezes dos animais e recuperação de vermes de cordeiros traçadores.

Na segunda etapa foi acrescentada a avaliação da condição corporal dos animais (SÃNUDO e SIERRA, 1986), pois as ovelhas encontravam-se prenhas e requeriam maior atenção.

4.6.1 Exames coproparasitológicos

Amostras fecais foram colhidas em sacos plásticos 20x15 cm diretamente da ampola retal, individualmente, as quais foram posteriormente acondicionadas em caixa de isopor com gelo e transportadas para o laboratório.

A contagem de OPG foi realizada segundo a técnica de Gordon e Whitlock (1939). As coproculturas foram realizadas separadamente para cada grupo, segundo metodologia descrita por Roberts e O'Sullivan (1950). A identificação das larvas infectantes produzidas nas coproculturas foi realizada de acordo com Keith (1953).

4.6.2 Exames hematológicos

4.6.2.1 Volume globular

Amostras de sangue foram colhidas através de punção de veia jugular em seringa de 3 mL e posteriormente transferiu-se o sangue para tubos de ensaio de 5 mL contendo anti-coagulante ácido etilenodiaminotetracético potássio (EDTA), armazenados em caixa de isopor com gelo e posteriormente as amostras foram processadas em laboratório. Utilizou-se tubo capilar de hematócrito para a determinação do volume globular (VG) com a utilização de microcentrífuga (JAIN, 1986). O material foi centrifugado durante cinco minutos a 2500 rotações por minuto (RPM).

4.6.2.2 Tratamentos com anti-helmíntico

A fim de evitar mortalidade, os animais foram tratados individualmente com Fosfato de levamisol (7,5 mg/kg, Ripercol[®], Fort Dodge) sempre que apresentaram volume globular inferior a 21% (AMARANTE et al., 1999) e/ou contagem superior a 5000 OPG. Entretanto, quando o valor de OPG apresentava-se acima do estipulado, porém o VG permanecia acima de 26%, esperava-se a próxima colheita para verificar se ainda havia necessidade de tratamento com anti-helmíntico.

4.6.3 Pesagem dos animais

Os animais eram pesados em balança digital por ocasião das colheitas, com reajuste das doses fúngicas para a administração oral.

4.6.4 Quantificação de larvas infectantes (L₃) na pastagem

No dia da colheita, sempre realizada no período da manhã, eram colhidas as amostras fecais e sangüíneas e da pastagem para a determinação do número de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais por quilograma de matéria seca (L₃/kg M.S.). As amostras de capim foram colhidas de cada um dos piquetes dos módulos seguindo um traçado em forma de “W” (TAYLOR, 1939). O coletor de capim seguiu esse traçado colhendo manualmente uma amostra a cada quatro passos, aproximadamente a cada 3,5 metros de distância. O capim foi cortado rente ao solo com uma tesoura. No laboratório, as amostras foram processadas de acordo com a técnica descrita por Niezen et al. (1998). A identificação das larvas foi realizada de acordo com Keith (1953).

4.6.5 Isolamento de fungos das fezes dos animais

Uma vez por mês, após 48 horas do fornecimento dos péletes por via oral, foram colhidas fezes dos animais de cada grupo (subdividindo-as em duas amostras colhidas de cinco animais de cada grupo) diretamente da ampola retal. As amostras foram misturadas (1 g da amostra de cada animal) e dessa mistura foram retiradas 2 g, sendo posteriormente inseridas com auxílio de uma espátula, no centro de uma placa de Petri, com 9 cm de diâmetro, contendo Agar 1% sólido e antibiótico (Cloranfenicol 0,05 g/L). Adicionou-se sobre as placas uma suspensão com aproximadamente 3000 L₃ de *Haemonchus contortus*. Os detalhes sobre o isolamento, a manutenção e a produção de L₃ do referido isolado foram descritos por SILVA et al. (2007). Mensalmente, foram feitas coproculturas das fezes de ovinos doadores e as larvas produzidas foram armazenadas em tubos de ensaio com 20 a 25 mL de água destilada, mantidas sob refrigeração para que fossem utilizadas mensalmente para estimular o crescimento fúngico e posterior identificação. A quantidade de L₃ presente nas coproculturas foi estimada a partir da contagem de larvas em 10 alíquotas de 10 µl.

As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em estufa a 25°C e observadas semanalmente por um período mínimo de 21 dias sob microscópio estereoscópio em objetivas de 10 e 50 x. Verificou-se a presença de larvas predadas e estruturas características que permitissem identificar o

fungo utilizado em cada grupo, de acordo com as chaves de identificação (COOKE e GODFREY, 1964).

4.6.6 Cordeiros traçadores

Foram utilizados cordeiros traçadores, ou seja, livres de infecções helmínticas. No experimento I foram utilizados seis cordeiros, da raça *Ile de France*, com idade aproximada de três meses, com cerca de 20 kg de peso, adquiridos em uma propriedade localizada em Pratânia – SP, em setembro de 2006. No experimento II, foram utilizados seis animais da raça Santa Inês para todos os grupos, pois os animais misturavam-se com facilidade. Os mesmos foram adquiridos em maio de 2007 em uma propriedade localizada em Botucatu-SP, também com idade aproximada de três meses, com peso médio de 15 kg.

Ao chegarem às instalações da UNESP, os animais foram alocados em duplas, as quais foram separadas aleatoriamente, em baias cimentadas. As baias eram limpas diariamente e os animais receberam água, sal mineral e feno de Tifton (*Cynodon spp.*) *ad libitum* e uma vez por dia recebiam ração comercial (Ração Noel[®], Cafenoel 300 g/animal). Os animais também foram vacinados contra clostridioses (Sintoxan[®] Polivalente, Merial, 2 mL, via subcutânea por animal).

Os animais adquiridos das referidas propriedades eram criados no pasto e, portanto, apresentavam-se naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. Para que os mesmos eliminassem as infecções helmínticas foi administrado Ripercol[®] (Fosfato de Levamisol, 7.5 mg/Kg, Fort Dodge) e Valbazen[®] (Albendazol, 10 mg/Kg, Cobalto, Pfizer) via oral. Exames coproparasitológicos posteriores ao tratamento foram realizados para confirmação da ausência de infecções helmínticas.

Após aproximadamente 30 dias de estabulação e confirmação de que os animais encontravam-se livres de infecções helmínticas, os cordeiros foram transportados para a propriedade, onde cada dupla de cordeiros permaneceu em pastejo com os respectivos grupos (Controle, fungos *D. flagrans* e *A. robusta*), por 28 dias, tempo suficiente para a permanência nos dois piquetes de cada grupo. Após esse período de pastejo, os cordeiros foram estabulados

por 14 dias e ao final deste período, abatidos, para que as espécies de nematódeos fossem identificadas e quantificadas.

Após o abate, o abomaso de cada animal foi removido, aberto ao longo de sua curvatura maior e o conteúdo foi colhido em um balde. Após, o abomaso foi submetido à digestão em solução fisiológica por quatro horas a 37 °C para a recuperação de nematódeos imaturos presentes na mucosa. Alíquotas de 5% do conteúdo do abomaso e de 10% do material obtido na digestão foram colhidas, acondicionadas em frascos plásticos e preservadas em formol (5%). O intestino delgado foi submetido a procedimento similar ao descrito para o abomaso. O intestino grosso não foi colhido devido à ausência de *Oesophagostomum* em todas as coproculturas realizadas durante as colheitas. Todos os helmintos presentes no material preservado foram identificados e contados (UENO e GONÇALVES, 1998).

4.6.7 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos, referentes às médias das temperaturas, precipitação pluviométrica mensal e umidade relativa do ar, foram obtidos no Departamento de Ciências Ambientais – FCA – UNESP, Fazenda Lageado, Botucatu-SP.

4.7 Análise Estatística

A análise estatística foi casualizada (2 grupos tratados e um grupo controle). Os dados foram submetidos à análise de variância com a utilização do programa Minitab® (Versão 11). Os dados referentes aos valores de OPG das ovelhas foram previamente transformados ($\text{Log}(x+1)$). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Em relação ao número de $L_3/\text{kg M.S.}$, os dados de cada gênero foram classificados em presença ou ausência de larvas na pastagem dos piquetes utilizados por cada grupo (dois por grupo) e comparados pelo teste de Qui-quadrado.

5. Resultados

Em ambos os experimentos e em todos os grupos, imediatamente após o fornecimento dos péletes fúngicos misturados à ração, observou-se o consumo total de ração pelos animais de todos os grupos.

5.1 Experimento I – Avaliação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*

O peso médio dos animais teve um pequeno aumento ao longo do experimento, porém não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos (Figura 3). As médias de volume globular (VG %) foram similares, sem diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 4). Os animais 436 e 470, respectivamente dos grupos 1 e 2, apresentaram anemia (VG < 21%).

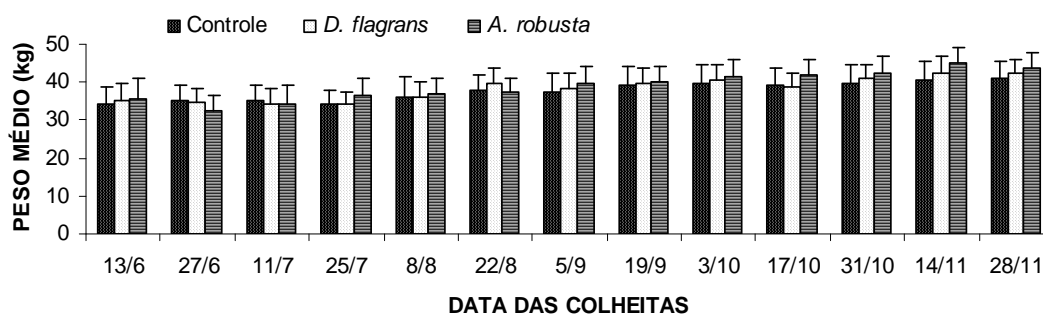


FIGURA 3. Média aritmética do peso dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*, no período de junho a novembro de 2006. Barras verticais = desvio padrão.

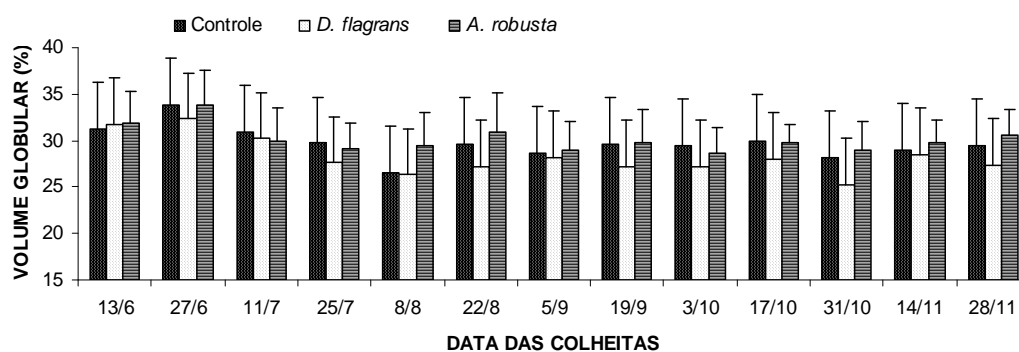


FIGURA 4. Média aritmética do volume globular dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*, no período de junho a novembro de 2006. Barras verticais = desvio padrão.

Quanto ao número médio de ovos por grama de fezes (OPG), observou-se na colheita do dia 25 de julho (Figura 5) diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo controle (2670 OPG) e o grupo tratado com o fungo *Duddingtonia flagrans* (950 OPG). Da mesma forma, nas colheitas do mês de agosto (08 e 22) o grupo controle apresentou maiores médias de OPG, 1220 e 1240 respectivamente ($P < 0,05$) do que o grupo que recebeu o fungo *Arthrobotrys robusta* (400 e 580 OPG). Na colheita do dia 17 de outubro houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos que receberam os fungos *D. flagrans* (6240 OPG) e *A. robusta* (610 OPG). Nas demais colheitas não houve diferenças significativas entre esses dois grupos em relação às contagens de OPG.

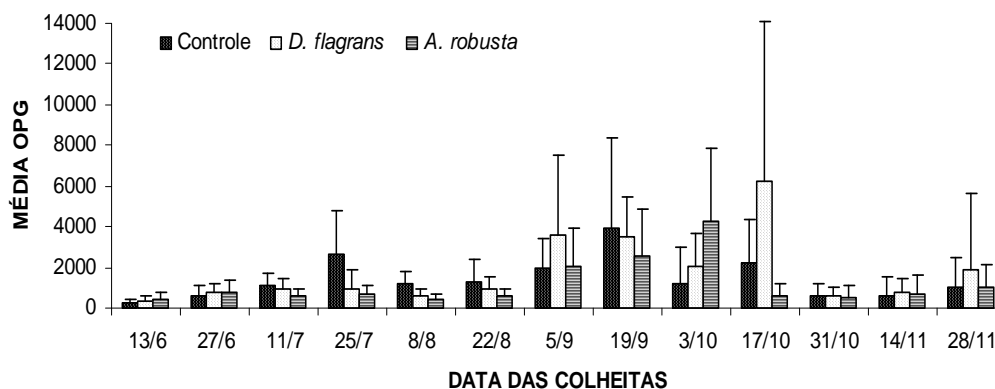


FIGURA 5. Média aritmética do número de ovos de trichostrongilídeos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio contendo *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* no período de junho a novembro de 2006. Barras verticais = desvio padrão.

Larvas infectantes de *Haemonchus* spp. predominaram nas coproculturas de todos os grupos e em todas as colheitas, exceto no dia 14 de novembro, quando o grupo tratado com o fungo *A. robusta* apresentou percentual mais elevado de *Trichostrongylus* spp. (Tabela 1).

Na tabela 2 estão apresentados os resultados das L₃ recuperadas da pastagem. Larvas infectantes de *Haemonchus* spp. foram detectadas nos piquetes pastejados pelos grupos Controle, *D. flagrans* e *A. robusta*, respectivamente, em sete, sete e nove vezes. Não foi detectada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos. Em relação a *Trichostrongylus* spp. foram recuperadas larvas infectantes dos piquetes em cinco (controle), seis (*D. flagrans*) em duas (*A. robusta*) colheitas durante a primeira fase experimental.

Em relação ao isolamento de fungos nas fezes dos animais, observou-se nos grupos que receberam os fungos, o crescimento de estruturas características correspondente a cada fungo já na primeira semana, assim como a visualização da ação dos fungos predadores sobre nematódeos presentes (Figura 6).

TABELA 1. Percentual de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais em coproculturas realizadas com amostras fecais obtidas dos ovinos do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*.

Data	Controle		<i>D. flagrans</i>		<i>A. robusta</i>	
	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>
	Spp.	spp.	spp.	spp.	spp.	spp.
13/06/06	82	18	94	6	99	1
27/06/06	92	8	94	6	91	9
11/07/06	99	1	95	5	98	2
25/07/06	99	1	98	2	98	2
08/08/06	94	6	98	2	95	5
22/08/06	95	5	96	4	94	6
05/09/06	89	11	93	7	95	5
19/09/06	88	12	92	7	94	6
03/10/06	94	6	99	1	96	4
17/10/06	85	15	91	9	85	15
31/10/06	93	7	72	28	84	16
14/11/06	95	5	70	30	46	54
28/11/06	76	24	84	16	64	36



FIGURA 6. Crescimento de estruturas fúngicas em placas de Petri visualizadas em aumento de 15X. As setas indicam L₃ e estruturas fúngicas.

Apenas as espécies *H. contortus* e *T. colubriformis* foram recuperadas dos animais traçadores, independentemente do grupo (Tabela 3).

Os animais que receberam tratamentos com anti-helmínticos estão listados na tabela 4. O grupo tratado pelo fungo *A. robusta* recebeu a menor quantidade de tratamentos com anti-helmíntico. A eficácia do tratamento foi de aproximadamente 60%.

TABELA 2. Médias aritméticas (\pm desvio padrão) do número de larvas infectantes de *Haemonchus* spp. (H) e *Trichostrongylus* spp. (T) por quilograma de matéria seca em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*.

Datas	Controle		<i>D. flagrans</i>		<i>A. robusta</i>	
	H	T	H	T	H	T
13/06/06	0	0	0	0	49,5 \pm 8,1	0
27/06/06	0	0	0	0	33,3 \pm 5,2	0
11/07/06	37,8 \pm 3,5	6,3 \pm 0,6	6,6 \pm 0,6	0	22,3 \pm 6,7	0
25/07/06	0	0	0	0	0	0
08/08/06	3,9 \pm 0,6	0	23,9 \pm 4,6	9,0 \pm 1,7	26,3 \pm 2,1	0
22/08/06	4,3 \pm 1,2	6,2 \pm 0,6	11,2 \pm 1,7	3,8 \pm 0,6	0	0
05/09/06	324 \pm 30,9	5,9 \pm 0,6	27,1 \pm 2,1	2,7 \pm 0,6	4,9 \pm 0,6	0
19/09/06	0	0	0	0	0	0
03/10/06	0	0	0	0	54,5 \pm 5,2	0
17/10/06	0	0	0	7,1 \pm 0,6	7,2 \pm 0,6	6,3 \pm 0,6
31/10/06	8,5 \pm 0,6	0	9,7 \pm 0,6	0	0	0
14/11/06	55,7 \pm 3,2	9,3 \pm 1	48,8 \pm 5,2	5,4 \pm 0,6	7,9 \pm 0,6	0
28/11/06	10,2 \pm 1,2	17,7 \pm 1	146,1 \pm 10,0	75,0 \pm 5,6	35,8 \pm 2,6	5,8 \pm 0,6

TABELA 3. Número de nematódeos em cordeiros traçadores colocados em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*. Os traçadores foram mantidos na pastagem com os grupos experimentais de 31 de outubro a 28 de novembro de 2006.

Traçadores	Grupo	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
62	Controle	650	550
01	Controle	580	1560
20	<i>D. flagrans</i>	670	1320
02	<i>D. flagrans</i>	1000	1050
33	<i>A. robusta</i>	920	2670
38	<i>A. robusta</i>	840	1610

TABELA 4. Datas em que os animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*, foram tratados individualmente com anti-helmíntico. Experimento com início em 13 de junho e término em 28 de novembro de 2006.

Grupo	Data	Nº animais tratados	Total de tratamentos
CONTROLE	11/09/06	1 (436)	6
	21/09/06	2 (483, 485)	
	05/10/06	1 (483)	
	19/10/06	2 (483, 436)	
<i>D. flagrans</i>	11/09/06	2 (460, 465)	8
	21/09/06	2 (460, 465)	
	19/10/06	4 (460, 486, 479, 470)	
<i>A. robusta</i>	21/09/06	1 (458)	2
	05/10/06	1 (458)	

A identificação numérica das ovelhas tratadas encontra-se entre parênteses.

Os animais 436 e 483 do grupo controle foram tratados mais de uma vez, assim como os 460 e 465 do grupo que recebeu o fungo *D. flagrans* e o 458 do grupo que recebeu o fungo *A. robusta*.

Oocistos de *Eimeria* spp. estiveram presentes nas amostras fecais dos animais de todos os grupos e em todas as colheitas. Ovos de *Moniezia* spp. também foram detectados em alguns dos exames realizados.

A temperatura média, em ambos trimestres, manteve-se entre 16 e 22°C, porém o primeiro trimestre foi relativamente seco (Tabela 5). Já no segundo trimestre, a partir de outubro houve aumento significativo da precipitação pluviométrica mensal e conseqüentemente da umidade relativa do ar.

TABELA 5. Médias mensais de temperatura, precipitação pluviométrica mensal total e média mensal de umidade relativa do ar de junho a novembro de 2006.

Data	Temperatura (°C)			Precipitação Pluviométrica (mm)	Umidade relativa (%)
	Mínima	Máxima	Média		
Jun/06	13,1	23,3	16,2	15,4	46,9
Jul/06	13,9	24,3	17,9	29,2	61,7
Ago/06	14,3	26,8	20,5	16	61,7
Set/06	14,2	25,5	19,8	49,2	80,2
Out/06	16,1	27,4	21,7	96,3	71,3
Nov/06	17,3	28	20,9	85,7	75,5

Fonte: Departamento de Ciências Ambientais – FCA – UNESP, Botucatu – SP.

5.2 Experimento II – Avaliação de duas freqüências de administração do fungo *Arthrobotrys robusta*

Em relação as variáveis avaliadas, observou-se que o peso médio dos animais permaneceu relativamente constante (Figura 7), sem diferença significativa entre os grupos ($P>0,05$) e que a condição corporal (CC) média dos grupos variou entre 2,3 e 2,8 em todos os meses de colheita.

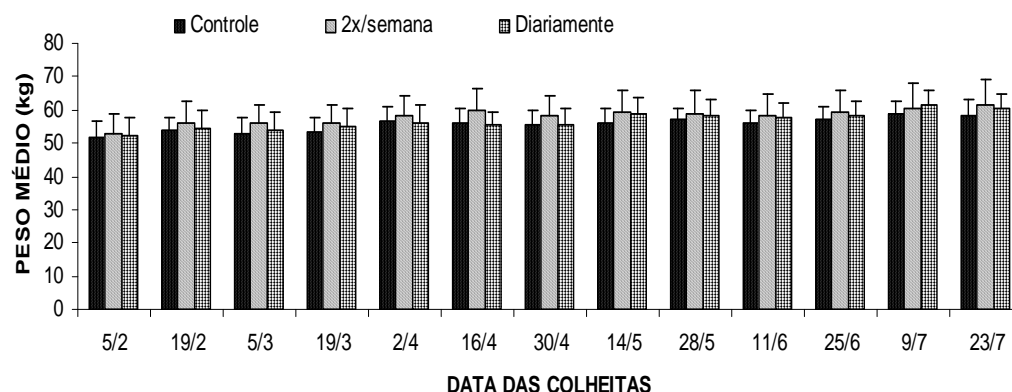


FIGURA 7. Média aritmética do peso dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta*, duas vezes por semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007. Barras verticais = desvio padrão.

Os valores de volume globular (Figura 8) foram semelhantes nos três grupos avaliados ao longo de toda fase experimental ($P>0,05$). Em relação ao grau de anemia, apresentaram-se anêmicos ($VG < 21\%$) três animais do grupo controle (323, 359, 464), somente um animal (389) do grupo que recebeu o fungo *A. robusta* duas vezes na semana e dois animais (151 e 186) tratados diariamente com o fungo *A. robusta*.

Quanto ao número médio de OPG de estrogilídeos, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os três grupos ao longo do experimento (Figura 9).

Oocistos de *Eimeria* spp. foram encontrados em todas as colheitas e em todos os grupos avaliados. Ovos de *Moniezia* spp. também foram detectados em alguns dos exames realizados.

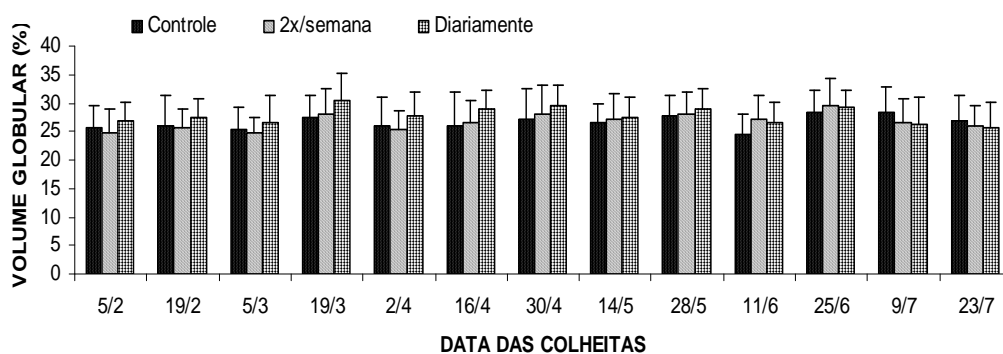


FIGURA 8. Média aritmética do volume globular dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007. Barras verticais = desvio padrão.

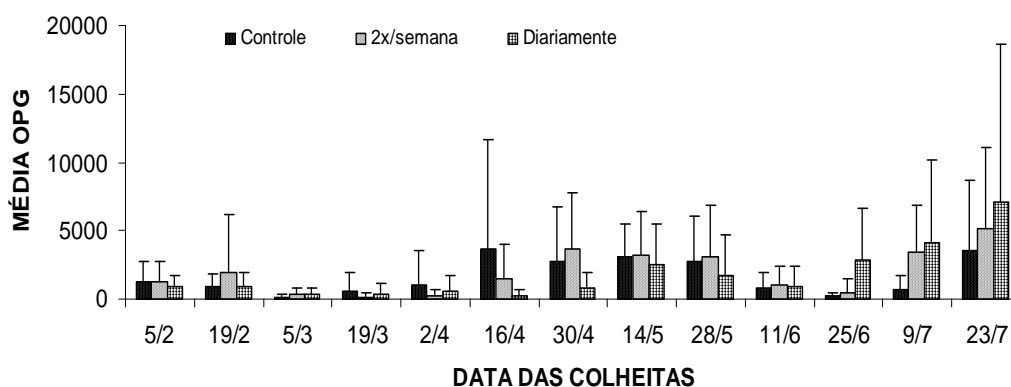


FIGURA 9. Média aritmética do número de ovos de estrongilídeos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007. Barras verticais = desvio padrão.

A exemplo do Experimento I, larvas infectantes de *Haemonchus* spp. predominaram nas colheitas (Tabela 6) exceto na terceira, quando predominaram larvas de *Trichostrongylus* spp. no grupo que recebeu fungo duas vezes por semana.

Na tabela 7 estão apresentados os resultados das L₃ recuperadas na pastagem. Houve diferença entre os grupos ($P < 0,05$) apenas em relação à recuperação de larvas infectantes de *Trichostrongylus* spp., as quais foram

encontradas em menor número no grupo tratado diariamente com fungo. Somente em duas colheitas recuperou-se número total de larvas infectantes superior a >100 L₃/kg de M.S. dos piquetes pastejados pelos animais dos grupos 1 e 2. Já nos piquetes do grupo que recebeu o fungo diariamente (Grupo 3) esta recuperação ocorreu somente em uma colheita, no mês de junho.

Os resultados referente aos parasitos recuperados dos cordeiros traçadores foram apresentados sem a identificação dos grupos, devido a dificuldade em manter os animais em seus respectivos grupos de origem, logo estão apresentados como resultados gerais. Apenas as espécies *H. contortus* e *T. colubriformis* foram recuperadas dos animais traçadores (Tabela 8).

TABELA 6. Percentual de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais em coproculturas realizadas com amostras fecais obtidas dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007.

Data	Controle		2x/semana		Diariamente	
	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.
05/02/07	98	2	93	7	97	3
19/02/07	68	32	91	9	87	13
05/03/07	91	9	43	57	89	11
19/03/07	91	9	91	9	82	18
02/04/07	92	8	87	12	88	13
16/04/07	96	4	99	1	97	3
30/04/07	98	2	98	2	95	5
14/05/07	98	2	97	3	98	2
28/05/07	95	5	99	1	97	3
11/06/07	88	12	91	9	96	4
25/06/07	85	15	95	5	94	6
09/07/07	92	8	93	7	94	6
23/07/07	95	5	98	2	96	4

TABELA 7. Médias aritméticas (\pm desvio padrão) do número de larvas infectantes de *Haemonchus* spp. (H) e *Trichostrongylus* spp. (T) por quilograma de matéria seca em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente.

Datas	Controle		2x/semana		Diariamente	
	H	T	H	T	H	T
05/02/07	19,1 \pm 27	0	6,85 \pm 9,7	6,85 \pm 9,7	32,55 \pm 26,7	0
19/02/07	9,35 \pm 13,2	13,2 \pm 7,8	257,55 \pm 364,2	99,45 \pm 132,6	73,55 \pm 104,0	0
05/03/07	5,15 \pm 7,3	13,95 \pm 5,3	255,2 \pm 360,9	101,95 \pm 126,5	52,85 \pm 74,7	0
19/03/07	109,05 \pm 90,4	10,8 \pm 15,3	88,1 \pm 124,6	0	41,8 \pm 59,1	0
02/04/07	7,3 \pm 10,3	14,55 \pm 20,6	0	0	0	0
16/04/07	10,1 \pm 14,3	0	0	0	7,75 \pm 11,0	0
30/04/07	4,1 \pm 5,8	0	6,05 \pm 8,6	0	31,75 \pm 17,9	0
14/05/07	0	0	0	0	0	0
28/05/07	29,45 \pm 18,2	0	8,8 \pm 12,4	0	82,65 \pm 116,9	0
11/06/07	0	18,85 \pm 26,7	0	8,35 \pm 11,8	100,15 \pm 141,6	7,55 \pm 10,7
25/06/07	55,95 \pm 79,1	130,5 \pm 184,6	10,9 \pm 15,4	0	25,55 \pm 36,1	0
09/07/07	0	0	0	0	0	0
23/07/07	0	0	0	0	0	0

TABELA 8. Número de nematódeos em cordeiros traçadores colocados em piquetes pastejados pelos animais experimentais. Os traçadores foram mantidos na pastagem com os grupos experimentais de 25 de junho à 23 de julho de 2007.

Traçadores	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
22	470	220
1495	790	360
B 27	310	250
C 6	440	200
C 29	1010	580
S/N	1040	600

Em relação ao isolamento de fungos nas fezes dos animais foi observado nos grupos que receberam os fungos o crescimento de estruturas características correspondente a cada fungo já na primeira semana.

Os animais que receberam tratamentos com anti-helmínticos estão listados na tabela 9. O maior número de tratamentos foram realizados nos animais do grupo que recebeu o fungo *A. robusta* 2x/semana (grupo 2).

TABELA 9. Datas em que os animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, foram tratados individualmente com anti-helmíntico. Experimento com início em 05 de fevereiro e término em 23 de julho de 2007.

Grupo	Data	Nº animais tratados	Total de tratamentos
CONTROLE	06/02/07	1 (210)	15
	19/02/07	2 (210, 464)	
	17/04/07	1 (323)	
	30/04/07	2 (416, 359)	
	14/05/07	3 (353, 416, 210)	
	29/05/07	3 (371, 416, 382)	
	23/07/07	3 (353, 416, 359)	
2X/SEMANA	06/02/07	1 (389)	22
	19/02/07	2 (316, 381)	
	17/04/07	1 (343)	
	30/04/07	3 (389, 381, 319)	
	14/05/07	3 (372, 316, 389)	
	29/05/07	3 (372, 316, 381)	
	09/07/07	4 (316, 389, 381, 343)	
	23/07/07	5 (295, 316, 343, 381, 279)	
DIARIAMENTE	14/05/07	2 (186, 430)	14
	29/05/07	2 (214, 406)	
	26/06/07	3 (186, 335, 406)	
	09/07/07	3 (151, 186, 335)	
	23/07/07	4 (302, 430, 214, 186)	

A identificação numérica das ovelhas tratadas encontra-se entre parênteses.

Os tratamentos com o anti-helmíntico, assim como no Experimento I, tiveram eficácia de aproximadamente 60%. Dentre os animais do grupo controle que receberam anti-helmíntico, os números 416, 210, 353 e 359 foram tratados respectivamente quatro, três e duas vezes. Já para o grupo que recebeu o fungo *A. robusta* duas vezes na semana os tratamentos se repetiram mais de três vezes para os animais 316, 381, 389. Para os animais do grupo 3 (diariamente) apenas os números 186 e 406 foram tratados quatro e duas vezes respectivamente.

Os dados meteorológicos apresentados na tabela 10 demonstraram que em relação à temperatura média, em ambos os trimestres mantiveram-se entre 21,3 e 24,4°C. Já em relação à precipitação pluviométrica mensal, atipicamente observou-se a maior precipitação no mês de julho (172,6 mm). A umidade relativa do ar manteve-se entre 72 e 77%.

TABELA 10. Médias mensais de temperatura, precipitação pluviométrica mensal total e média mensal de umidade relativa do ar de fevereiro a julho de 2007.

Data	Temperatura (°C)			Precipitação pluviométrica (mm)	Umidade relativa (%)
	Mínima	Máxima	Média		
Fev/07	18,9	29,3	24,1	108,9	77
Mar/07	19,2	29,7	24,4	49	73
Abr/07	18,8	29	23,9	40,3	76
Mai/07	17,5	27,5	22,5	42,1	74
Jun/07	16,9	27,1	22,0	23,4	73,2
Jul/07	16,2	26,3	21,3	172,6	72,7

Fonte: Departamento de Ciências Ambientais – FCA – UNESP, Botucatu – SP.

6. Discussão

A média aritmética do número de ovos de estrogilídeos dos animais do experimento I demonstrou que dentre as colheitas realizadas foram poucos os resultados significativos entre os grupos tratados com os fungos e o grupo controle. Porém, menor quantidade de tratamentos individuais com anti-helmínticos foi administrada aos animais que receberam o fungo *A. robusta*, indicando melhor eficácia do fornecimento desse fungo nematófago no controle dos estágios de vida livre dos nematódeos. Logo este foi o fungo escolhido para a segunda fase experimental, na qual, então, testaram-se duas formas de administração, duas vezes por semana ou diariamente. No entanto, no Experimento II, em comparação ao grupo controle, os esquemas de administração fúngica testados com o fungo *A. robusta* se mostraram pouco ou totalmente ineficientes. Estes resultados foram similares aos obtidos por Rocha et al. (2007), também em Botucatu - SP, que, somente em uma das datas de avaliação, encontraram contagem de OPG do grupo tratado pelo fungo *D. flagrans* significativamente inferior a do grupo controle. Resultados similares também foram observados por Faessler et al. (2007), em experimento realizado com ovelhas leiteiras na Suíça, em três diferentes propriedades e por Maingi et al. (2006) em estudo desenvolvido na África do Sul com cabras.

Graminha et al. (2005), no Estado de São Paulo, que testaram a eficácia de outra espécie de fungo, *Arthrobotrys musiformis*, em ovinos naturalmente infectados, também não observaram efeito do tratamento nas contagens de OPG. Da mesma maneira, Fontenot et al. (2003), nos Estados Unidos, apesar

de não terem encontrado diferença significativa para as médias de OPG, observaram redução da contaminação do pasto por L₃ e na produção de larvas infectantes em coproculturas do grupo que recebeu o fungo.

Como aparentemente não houve diferença na contaminação da pastagem, os animais de todos os grupos, independentemente do experimento (I ou II) apresentaram médias de peso similares para cada período do estudo, já que estiveram expostos à mesma carga de parasitas. Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha et al. (2007), ao testarem o fungo *D. flagrans*, durante seis meses, em cordeiras Ile de France na mesma região e por Campos (2006), que também não encontrou diferença significativa ao trabalhar com bovinos e avaliar a eficácia do fungo *Monacrosporium sinense*, durante seis meses, em experimento realizado no estado de Minas Gerais, Brasil.

Em contraste, na Malásia Chandrawathani et al. (2004) obtiveram melhor ganho de peso dos animais tratados (Santa Inês x Corriedale) com o fungo *D. flagrans* em experimento realizado em campo por aproximadamente um ano. Resultados positivos também foram observados por Araújo et al. (2007) ao testarem o fungo *Monacrosporium thaumasium* na espécie caprina, em região semi-árida do Ceará, onde os animais tratados com o fungo tiveram maior ganho de peso e a menor carga parasitária.

Um dos problemas observados no Experimento I esteve relacionado com a altura da forrageira no momento de introdução dos animais nos piquetes. A sua altura ultrapassava 60 cm e em consequência desse fato os animais restringiram o pastejo a parte periférica dos piquetes. Isto pode ter comprometido o ganho de peso dos animais, uma vez que devido ao perfil comportamental de ovinos Bergamácia, que são bastante gregários, eles procuram andar em grupo mantendo contato visual. Portanto, o pastejo não foi uniforme tendo havido excesso de forragem no centro dos piquetes.

Já no experimento II, realizado na mesma área depois de roçada, os animais, que eram adultos, pastejaram de forma uniforme os piquetes. Seus pesos mantiveram-se relativamente constantes e após o segundo mês, iniciou-se o período de coberturas, portanto ao final deste estudo, as ovelhas estavam no terceiro ou quarto mês de gestação. Vale salientar, que no segundo

trimestre desta fase as ovelhas ainda receberam ração e silagem duas a três vezes por semana para que pudessem manter a condição corporal.

As médias de volume globular também foram similares nos grupos independentemente do tratamento com o fungo. Resultados semelhantes foram encontrados por Fontenot et al. (2003), Chandrawathani et al. (2004) e Rocha et al. (2007). Embora nos dois experimentos não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos, os resultados previamente apresentados demonstraram que os valores permaneceram no geral dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie (27 a 45% para o VG) (JAIN, 1996).

Considerando-se todo o Experimento I, as temperaturas mensais médias variaram de 16,2° C a 21,7° C. Segundo Pandey (1937) e Castro et al. (2003) a temperatura ideal para o desenvolvimento dos fungos no ambiente situa-se entre 20 e 30° C. Portanto, em grande parte do experimento as temperaturas mantiveram-se a baixo do ideal para o crescimento adequado e atividade dos fungos nematófagos. Essas temperaturas observadas no local do estudo talvez não tenham propiciado o desenvolvimento ideal dos fungos testados. Vale ainda ressaltar que os fungos utilizados neste ensaio foram isolados na região de Viçosa – MG, que apresenta condições climáticas térmicas superiores às de Botucatu. É possível, que evolutivamente os fungos tenham se adaptado para proliferar em condições ambientais similares às encontradas naquela região e não em Botucatu. Quando o fungo *Monacrosporium thaumasium*, isolado de Viçosa, foi testado em Sobral, Ceará (Araújo et al., 2007), com temperaturas médias elevadas, em torno de 26,8° C, apresentou boa eficácia. Os resultados obtidos sugerem que talvez, apenas fungos adaptados a condições locais apresentem boa eficácia. Portanto, em estudos futuros, seria interessante isolar fungos na região de Botucatu para então avaliá-los quanto à eficácia como controle biológico.

Outro ponto observado foi aumento dos valores de OPG no segundo trimestre (setembro a novembro) do Experimento I, o qual coincidiu com o aumento da precipitação pluviométrica e da umidade relativa do ar. Em consequência houve aumento na quantidade de tratamentos com anti-helmíntico. Em relação à quantidade total de larvas recuperadas por grupo, somente em duas colheitas recuperou-se número superior a 100 L₃/Kg de MS, entretanto essas foram também no segundo trimestre (em setembro e

novembro para os grupos 1 e 2, respectivamente). Segundo Amarante e Barbosa (1995), o pico da contagem de OPG em ovinos ocorre nos meses de setembro e outubro, corroborando com os achados do presente experimento, justificando a maior quantidade de tratamentos realizados nos dois meses citados.

Os dados referentes às larvas correspondem aos encontrados por Campos (2006) em experimento realizado com bovinos, o qual também recuperou maior quantidade de larvas nos meses de maior precipitação pluvial e o relacionou ao maior número de amostras colhidas de áreas onde se concentravam as larvas ou estavam mais próximas dos bolos fecais. Além das possíveis justificativas para os resultados do presente estudo, os animais não pastejaram uniformemente e houve concentração de fezes em determinados locais, em especial na parte lateral dos piquetes, ou seja, as amostras colhidas do traçado em “W” não representavam a real distribuição das larvas. O comportamento de pastejo das borregas também pode ter influenciado na distribuição do fungo e conseqüentemente prejudicado sua atividade predatória no pasto, pois como já é conhecido, após passagem pelo trato gastrintestinal, os fungos nematófagos agem no ambiente, utilizando o animal como veículo carreador.

Quantidades pequenas recuperadas de larvas (0 a 44 larvas/kg de M.S.) também foram observadas em trabalho realizado por Maingi et al. (2006) com caprinos na África do Sul no verão. Os autores também atribuíram o fato, à altura da forrageira (acima de 60 cm) em alguns locais dos piquetes.

Todos os cultivos de fezes realizados uma vez por mês demonstraram crescimento fúngico após 48 horas. Em uma semana as armadilhas produzidas por esses agentes já eram bem visualizadas. Fato este, que comprovou a sobrevivência do fungo a passagem pelo trato gastrintestinal.

Os resultados das coproculturas e identificação dos vermes obtidos dos animais traçadores confirmam a predominância de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos da região, como já previamente relatados por Amarante et al. (2004) e Rocha et al. (2008).

Doses maiores (2 g/10 kg de peso vivo) do que as fornecidas por Graminha et al. (2005) e Rocha et al. (2007) foram utilizadas em ambos os experimentos (I e II), as quais, porém, não tiveram influência na profilaxia das

helmintoses. Araújo et al. (2006) utilizaram em cabras 20 g/animal e obtiveram boa redução (59,3%) na produção de larvas de *H. contortus* em coproculturas. Outra questão importante diz respeito à frequência de administração semanal do fungo, duas vezes por semana no experimento I, a qual talvez não tenha sido suficiente para propiciar redução na contaminação ambiental, como sugeriu Rocha et al. (2007). Entretanto, na administração diária, realizada no experimento II, também não foi observada eficácia. Já em Sobral – CE, bons resultados foram obtidos mesmo quando os fungos eram administrados apenas uma vez por semana ou quinzenalmente para caprinos (ARAÚJO et al., 2007).

De qualquer forma, trabalhos realizados em outros países demonstraram melhores resultados quando os animais ingeriram diariamente o fungo nematófago (CHANDRAWATHANI et al. 2003; FONTENOT et al. 2003; TERRIL et al., 2004).

No experimento II, em relação à quantidade total de larvas por grupo, somente em cinco colheitas recuperou-se número elevado de larvas (>100 L₃/kg de MS), independentemente do grupo avaliado ou parasito identificado. Entretanto, nos piquetes pastejados pelo grupo que recebeu o fungo diariamente foi encontrado somente em uma colheita (11/06/07), número elevado de L₃. Porém, os piquetes deste grupo apresentaram redução significativa no número de L₃ de *Trichostrongylus* spp. em comparação com os demais grupos (P<0,05).

No primeiro trimestre do Experimento II (fevereiro a abril) pode-se sugerir que a baixa quantidade de larvas recuperada foi devido à diluição das larvas no pasto na época de chuva (verão), em seguida ao iniciar o segundo trimestre (maio a julho) pode-se atribuir o fato, a época da seca ser propícia para os parasitos permanecerem dentro dos animais com o intuito de sobreviverem às condições adversas do ambiente. Entretanto, no mês de julho, último mês de experimento, ocorreu atípico aumento na precipitação pluviométrica, o que pode ter diluído as larvas presentes até então.

Apesar da baixa infestação do pasto, os animais permaneciam com alta carga parasitária, especialmente no segundo trimestre, o que coincide com a fase gestacional das ovelhas, quando aumenta a susceptibilidade à verminose (ROCHA et al. 2004).

Ao avaliar a quantidade de tratamentos realizados com anti-helmíntico, verificou-se que o grupo tratado com o fungo duas vezes na semana recebeu a maior quantidade de tratamentos com anti-helmínticos do que os outros dois grupos. Os tratamentos com anti-helmínticos tiveram baixa eficácia. Já no estudo de Maingi et al. (2006), apenas 10% dos animais do grupo que recebeu o fungo necessitaram de tratamento com anti-helmíntico, enquanto que no grupo controle 50% das cabras foram tratadas.

Vale ressaltar que em ambos os experimentos, constataram-se que alguns animais de cada grupo experimental eram os mais susceptíveis, pois receberam tratamento anti-helmíntico mais de duas vezes. No Experimento I, no grupo controle (G1), o animal 483 e no grupo que recebeu o fungo *D. flagrans* (G2) o animal 460 foram tratados três vezes, enquanto nenhum animal do grupo que recebeu o fungo *A. robusta* (G3) recebeu mais do que dois tratamentos. Já no Experimento II, no grupo que recebeu o fungo *A. robusta* diariamente (G3), foi necessário o tratamento apenas do animal 186, três vezes, enquanto no grupo controle (G1) e no grupo que recebeu o fungo duas vezes na semana (G2) foram tratados com anti-helmíntico mais de duas vezes, dois e quatro animais, respectivamente.

Considerando que a resistência à verminose é uma característica herdável e que animais susceptíveis deveriam ser retirados do rebanho, pois são os principais responsáveis pela contaminação da pastagem, é possível que uma medida eficiente para controlar as endoparasitoses, seja a identificação e eliminação dos animais susceptíveis do rebanho.

Dados correspondentes ao cultivo das fezes para isolamento e observação do fungo, assim como para as coproculturas foram semelhantes aos do Experimento I. Segundo Araújo et al. (2004b), os fungos nematófagos predadores formam armadilhas, a intervalos, ao longo da hifa. Essas armadilhas constituem a resposta do fungo à presença do nematódeo ou de substâncias derivadas destes ou de vários outros compostos de origem biológica. A diferenciação da hifa ocorre dentro de 24 horas e numerosas estruturas de captura podem ser produzidas e então visualizadas.

Nos dois experimentos, observou-se que a habilidade predatória dos fungos, assim como a presença de estruturas identificadoras foi constatada nos cultivos de fezes. Este desenvolvimento *in vitro*, porém, aparentemente, não

correspondeu à atividade similar dos fungos na pastagem. Esta observação também foi relatada por Paraud et al. (2007). Neste caso, os autores sugeriram que alguns animais não consumiram quantidade suficiente para propiciar a distribuição dos fungos no pasto. Esse não foi o caso dos Experimentos I e II, nos quais observou-se o consumo total dos péletes que eram misturados à ração.

Estudos em campo realizados com bovinos demonstraram bons resultados (LARSEN et al., 1996; ALVES et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004). Talvez a ação dos fungos predadores no pasto tenha melhor desempenho nas fezes bovinas, devido a sua consistência e estrutura, já que conservam o ambiente úmido e protegido por mais tempo, ou seja, é mais favorável ao crescimento e manutenção dos fungos nematófagos. Este fato não ocorre com as fezes dos ovinos por serem mais secas. Além disso, os cíbalos fecais que são pequenos favorecem dessecação no caso de exposição solar direta, a menos que estejam em pastagem de maior altura (CARNEIRO e AMARANTE, 2008). Esta observação também foi descrita por Gronvold et al. (1999).

A taxa elevada de lotação e o tipo de manejo utilizado nos experimentos realizados representaram a realidade da ovinocultura da região. Essas lotações elevadas favorecem a transmissão dos parasitas e por conseqüência, podem comprometer o desempenho dos animais. Nessas condições ambientais e de manejo, os fungos testados não propiciaram melhora na profilaxia da verminose.

7. Conclusões

Concluiu-se, que apesar de no experimento I, o grupo tratado com o fungo *Arthrobotrys robusta* ter recebido menor quantidade de tratamentos anti-helmínticos, o mesmo fungo ao ser avaliado no experimento II, em diferentes dosagens, não demonstrou eficácia para a profilaxia das infecções causadas por nematódeos em ovelhas, nas condições experimentais do presente estudo.

Estudos futuros, com ajuste de dose, taxa de lotação, adequação de espécies fúngicas nos diversos ambientes, regiões e viabilidade, após confecção dos péletes, são necessários, para que se possa sugerir a utilização do controle biológico, como método alternativo profilático das helmintíases de ovinos.

8. Bibliografia

- ALVES, P.H.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; ASSIS, R.C.L.; SARTI, P.; CAMPOS, A.K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, p. 568-573. 2003.
- AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. *A produção animal na visão dos brasileiros*. Piracicaba: FEALQ, p.461-473, 2001.
- AMARANTE, A. F. T. Controle integrado de helmintos de bovinos e ovinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, s.1, p.68-71, 2004.
- AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.A.G.; CARMELLO, M.J.; PADOVANI, C.R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 29, p. 31-38, 1992.
- AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A. Seasonal variations in populations of infective larvae on pasture and nematode faecal egg output in sheep. **Vet. Zoot.**, v. 7, p. 127-133, 1995.
- AMARANTE, A.F.T.; PADOVANI, C.R.; BARBOSA, M.A. Contaminação da pastagem por larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais parasitas de bovinos e ovinos em Botucatu-SP. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 5, n.2, p. 65-73, 1996.
- AMARANTE, A.F.T.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W. S.; DAVIS, S.K.; BAZER, F. W. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbred lambs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 80, p. 311-324, 1999.
- AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematodes infections. **Vet. Parasitol.**, v. 120, 91-106, 2004.
- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S.; MAGALHÃES, A.C.M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 44, n. 6, p. 521-526, 1992.

- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S. Biological control "in vitro" of infective *Haemonchus placei* larvae by predacious fungi *Arthrobotrys musiformis*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 46, n. 3, p. 197-204, 1994.
- ARAÚJO, J.V.; PATARROYO, J.H. Initial interaction between *Haemonchus placei* infective larvae and different *Arthrobotrys* isolates. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, n. 5, p. 733-738, 1995.
- ARAÚJO, J.V.; NETO, A.P.; AZEVEDO, M.H.F. Screening parasitic nematode trapping fungi *Arthrobotrys* for passage through the gastrointestinal tract of calves. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v 48, p. 543-552, 1996.
- ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southeastern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.7. n.2, p.117-122, 1998.
- ARAÚJO, J.V., Predacious activity of *Arthrobotrys* spp. isolates on infective *Cooperia punctata* larvae. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 35, p. 9-11, 1998.
- ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Effects of temperature, mineral salt and passage through the gastrointestinal tract of calves on sodium alginate formulation of *Arthrobotrys robusta*, a nematode-trapping fungus. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 9, p. 55-59, 2000.
- ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; PAIVA, F.; BRESSAN, M.C.R.V. Efeito antagonista de fungos predadores do gênero *Arthrobotrys* on infective larvae of *Oesophagostomum radiatum*, *Cooperia punctata* and *Haemonchus placei*. **Rev. Bras. Cienc. Vet.**, v.8, n. 2, p. 81-84, 2001.
- 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 nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n. 2, p. 65-71, 2004. a
- ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; CAMPOS, A.K.; SÁ, N.C.; SARTI, P.; ASSIS, R.C.L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. **Ciência Rural.**, v.34, n.2, p.457-463, 2004. b
- ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes

de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.15, n.2, p.76-79, 2006.

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

BALAN, J.; GERBER, N. Attraction and killing of the nematode *Panagrellus redivivus* by the predacious fungus *Arthrobotrys dactyloides*. **Nematology**, v.18, p. 163-173, 1972.

BARRON, G.L. The nematode destroying fungi. **Topics in microbiology**, n.1, Canadian biological publications, Guelph, Canadá. 1977, 140p.

BORAY, J.C.; MARTIN, P.J.; ROUSH, R.T. Resistance of parasites to antiparasitic drugs: The report of a Round Table Conference held at the VIIth International Congress of Parasitology. **Int. J. Parasitol.**, v. 4, p. 549-550, 1990.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; TAVELA, A.O.; MACIEL, A.S. Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, n.3, p.356-358, 2007.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A. K.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J.M.; CARVALHO, R.O.; TAVELA, A.O. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.24, p.0972- 1573, 2008^a.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; ARAÚJO, J.M., SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.O.; CORREA, D.N.; PEREIRA, C.A.A.J. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 2008^b. No prelo.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; MILANI, J.A.; CARVALHO, R.O.; SILVA, A.R.; CAMPOS, A.K.; TAVELA, A.O. Ovicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* on *Moniezia* sp. eggs. **J. Helminthol.**, 2008^c. No prelo.

- BRUNDSON, R.V. Principles of helminth control. *Vet Parasitol.*, v. 6, p.185-215, 1980.
- BURKE, J.M.; MILLER, J.E.; LARSEN, M.; TERRILL, T.H. Interaction between copper oxide wire particles and *Duddingtonia flagrans* in lambs. **Vet. Parasitol.**, v. 134, p. 141-146, 2005.
- CAMPOS, A.K. *Fungos nematófagos no controle de nematóides gastrintestinais de ruminantes*. 2006. 138f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CARNEIRO, R.D.; AMARANTE, A.F.T. Seasonal effect of three pasture plant species on the free-living stages of *Haemonchus contortus*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.4. p.864-872, 2008
- CASTRO, A.A.; OLIVEIRA, C.R.C.; ANJOS, D.H.S.; ORNELAS, E.I.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGUES, M.L.A. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda: cyathostominae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 12, n. 2, p. 53-57, 2003.
- CHARTIER, C.; PORS, I. Effect of the nematophagous fungus, *Duddingtonia flagrans*, on the larval development of goat parasitic nematodes: a plot study. **Vet. Res.**, v. 34, p. 221-230, 2003.
- CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; LARSEN, M., GILLESPIE, A.T.; ZAHARI, W.M. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.**, v.117, p. 173-183, 2003.
- CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; ADNAN, M.; WALLER, P.J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.T. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.**, v.120, p.177-187, 2004.
- CHAUHAN, J.B.; SANYAL, P.K.; SUBRAMANIAN, R.B. The nematode-trapping efficacy of two chlamydospore-forming fungi against *Haemonchus contortus* in sheep. **J. Helminthol.**, v.79, p. 315-319, 2005.
- COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key to nematode destroying fungi. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v.47, n.1, p. 61, 74, 1964.

CORDA, A.C.F. Pracht-Flora Europaeischer Schimmelbildungen. Leipzig and Dresden. G. Fleisher. 55 p. 1839.

DRECHSLER, C. Some Hyphomycetales that prey on free living terricolous nematode. **Mycology.**, v.23, p. 447-552, 1937.

ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasite of sheep in Souther Latin America: Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 62, p. 199-206, 1996.

EMERY, D.L. Vaccination against worm parasites of animals. **Int. J. Parasitol.**, v.64, p.31-45, 1996.

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. **Vet. Parasitol.**, v.130, p.263-266, 2005.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Comparison between Australian isolates of *Arthrobotrys* spp. and *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.**, v. 72, p. 149-155, 1997.

FAESSLER, H.; TORGERSON, P.R.; HERTZBERG, H. Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. **Vet. Parasitol.**, v.147, p. 96-102, 2007.

FERNANDES, L.H.; SENO, M.C.Z.; AMARANTE, A.F.T.; SOUZA, H.; BELLUZZO, C.E.C. Efeito do pastejo rotacionado e alterado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 6, p.733-740, 2004.

FLORES-CRESPO, J.; HERRERA-RODRÍGUEZ, D.; MENDONZA DE GIVES, P.; LIÉBANO-HERNANDEZ, E.; VÁZQUEZ-PRATS, V.M.; LÓPEZ-ARELLANO, M.E. The predatory capability of three nematophagous fungi in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces. **J. Helminthol.** v.77, p.297-303, 2003.

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.

- FRISCH, J.E.; VERCOE, J.E. An analysis of different cattle genotypes reared in different environments. **J. Agric. Sci.**, v.103, p.137-153, 1984.
- GOMES, A.P.S.; ARAÚJO, J.V.; RIBEIRO, R.C.F. Differential in vitro pathogenicity of predatory fungi of the genus *Monacrosporium* for *phytonematodes*, free-living nematodes and parasitic nematodes of cattle. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 79-83, 1999.
- GÓMEZ-RINCÓN, C.; URIARTE, J.; VALDERRÁBANO, J. Efficiency of *Duddingtonia flagrans* against Trichostrongyle infections of sheep on mountain pastures. **Vet. Parasitol.**, v.141, p.84-90, 2006.
- GORDON, H.M.C.L.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J. Counc. Sci. Ind. Res.**, v.12, p.103-112, 1939.
- GRAMINHA, E.B.N.; MONTEIRO, A.C.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, n. 9, p. 927-933, 2005.
- GRAY, N.F. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. **Biol. Rev.**, v.62, p. 245-304, 1987.
- GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; BRESCIANI, J. Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. **Vet. Parasitol.**, v. 48, p. 311-325, 1993.
- GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Biological control aspects of biological control – with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated animals. **Vet. Parasitol.**,v. 64, p. 47-64, 1996.
- GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S.A.; BJORN, H.; KIRCHHEINER, K.; LASSEN, K.; RAWAT, H.; KRISTIANSEN, H.L. Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. **J. Helminthol.**, v.73, p.129-136. 1999.
- KEITH, R.K. The differentiation of infective larval of some common nematode parasites of cattle. **Aust. J. Zool.**, v. 1, p. 223-35, 1953.

LARSEN, M.; FAEDO, M.; WALLER, P.J. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites sheep: Survey of the presence of fungi in fresh feces of grazing livestock in Australia. **Vet. Parasitol.**, v. 53, p. 275-281, 1994.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; ZORN, A. Biological control of *Trichostrongyles* in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. **Vet. Parasitol.**, v. 60, p. 321-330, 1995.

LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; GRONVOLD, J.; NANSEN, P. In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasite nematodes. **J. Helminthol.**, v. 66, p. 137-141, 1992.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONDAHL, C.; THAMSBORG, S.M.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; MONRAD, J. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitology.**, v.113, p.1-6. 1996.

LARSEN, M. Biological control of helminths. **Int. J. Parasitol.**, v.29, p.139-146, 1999.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de deshelmintización del suelo. **Salud Publica Mex.**, v.31, p.763-771, 1989.

LYSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamyosporium* Goddard. **Folia Parasitol.**, v.38, p.255-259, 1991.

MAINGI, N.; KRECEK, R.C.; VAN BILJON, N. Control of gastrointestinal nematodes in goats on pastures in South Africa using nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and selective anthelmintic treatments. **Vet. Parasitol.**, v.138, p.328-336, 2006.

MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 72 p. (EMBRAPA – CNPMA. Documentos, 1), 1995.

MORGAN-JONES, G.; RODRIGUES-KABANA, R. Fungal biocontrol for the management of nematodos. In: Veech, J.A. & Dickson, D.W. **Vistas on Nematology**. Maryland: Society of Nematologist, 1987. p. 94-99.

- MOTA, M.A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J.V. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.
- NANSEN, P.; LARSEN, M.; GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; ZORN, A.; HENRIKSEN, S.A. Prevention of clinical trichostrongylidosis in calves by strategic feeding with the predacious fungus *Duddingtonia flagrans*. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 371-374, 1995.
- NIEZEN, J.H.; MILLER, C.M.; ROBERTSON, H.A.; WILSON, S.R., MACKAY, A.D. Effect of topographical aspect and farm system on the population dynamic of *Trichostrongylus* larvae on a hill pasture. **Vet. Parasitol.**, v.78, p.37-48, 1998.
- PANDEY, V.S. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: a possible method of biological control. **J. Helminthol.**, v.57, p.35-48, 1937.
- PARAUD, C.; PORS, I.; CHARTIER, C. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to control nematode parasites of first-season grazing goats in France. **Vet. Res. Commun.** v.31, p. 305-315, 2007.
- PRAMER, D. Nematode trapping fungi. **Science**. v. 144, p. 382-388, 1964.
- ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, S.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Aus. J. Agric. Res.**, v. 1, p. 99-102, 1950.
- ROCHA, R. A.; AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P.A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Rumin. Res.** v.55, p.65-75, 2004.
- ROCHA, R. A.; AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P. A. Resistance of Santa Inês and Ile de France suckling lambs to gastrointestinal nematode infections. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.14, n.1, p.17 - 20, 2005.
- ROCHA, R. A.; ARAÚJO, J.V.; AMARANTE, A.F.T. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in lambs at pasture. **J. Helminthol.**, v.81, p.387-392, 2007.
- ROCHA, R.A.; BRESCIANI, K.D.S; BARROS, T.F.M.; FERNANDES, L.H.; SILVA, M.B.; AMARANTE, A.F.T. Sheep and cattle grazing alternately:

Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Rumin. Res.** v.75, p.135-143, 2008.

SAÑUDO, C.; SIERRA, I. *Calidad de la canal en la especie ovina*. Ovino, n.1, p.127-53, 1986.

SANYAL, P.K.; CHAUAN, J.B.; MUKHOPADHYAYA. Implications of fungicidal effects benzimidazole compounds of *Duddingtonia flagrans* in integrated nematode parasite management in livestock. **Vet. Res. Commun.**, v.28, n.4, p.375-385, 2004.

SAUMELL, C.A.; PADILHA, T.; SANTOS, P.de; ROQUE, M.V.C. Nematophagous fungi in fresh feces of cattle in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.82, p.217-220, 1999.

SILVA, W.W. Aspectos epidemiológicos e controle biológico pelo fungo (*Monacrosporium thaumasium*, Drechsler, 1937) de nematóides gastrintestinais de caprinos em ecossistema semi-árido do Nordeste/ Brasil. Rio de Janeiro, 2003. 52p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária, Parasitologia Veterinária) - Seropédica. UFRRJ.

SILVA, B.F. *Migração vertical das larvas infectantes de Haemonchus contortus em capim braquiária (Brachiaria decumbens)*. 2007. 41f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SKIPP, R. A.; YEATES, G. W.; CHEN, L. Y.; GLARE, T. R. Occurrence, morphological characteristics and ribotyping of New Zealand isolates of *Duddingtonia flagrans*, a candidate for biocontrol of animal parasitic nematodes. **N. Z. J. Agric. Res.**, v. 45, p. 187-196, 2002.

SUE, H.; HAO, Y.; MO, M.; ZHANG, K. The ecology of nematode-trapping hyphomycetes in cattle duna from three plateau pastures. **Vet. Parasitol.** v. 144, p. 293-298, 2007.

TAYLOR, E.L. Technique for the estimation of pasture infestation by *Strongyloid* larvae. **Parasitology**, v. 31, p. 473-8, 1939.

TERRIL, T.H.; LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HUSTED, S.; MILLER, J.H.; KAPLAN, R.M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat faeces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Vet. Parasitol.**, v.120, p. 285-296, 2004.

- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. 4 ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143p.
- WALLER P.J.; FAEDO, M., The prospects for biological control of the free-living stages of nematode parasites of livestock. **Int. J. Parasitol.**, v. 26, n. 8/9, p. 915-925, 1996.
- WALLER, P.J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARI, A.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasite of sheep in Souther Latin America: General Review. **Vet. Parasitol.**, v. 62, p. 181-187, 1996.
- WALLER, P.J.; LARSEN, M. The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. **Int. J. Parasitol.**, v.23, p.539-546, 1993.
- WALLER, P.J.; LJUNGSTROM, B-L.; SCHWAN, O.; RUDBY MARTIN, L.; MORRISON, D.A.; RYDZIK, A. Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: Trials on Commercial Farms in Sweden. **Acta Vet. Scand.**, v.47, p.23-32, 2006.
- WALLER, P.J.; SCHWAN, O.; LJUNGTROM, B-L.; RYDZIK, A.; YEATES, G.W. Evaluation of biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans* under commercial farming conditions on the esland of Gotland, Sweden. **Vet. Parasitol.**, v.126, p. 299-315, 2004.
- WHARTON, D.A.; MURRAY, D.S. Carbohydrate/lectin interactions between the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora* and the infective juveniles of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). **Parastology.**, v. 101, p. 101-106, 1990.
- WRIGHT, D.A.; MCANULTY, R.W.; NOONAN, M.J.; STANKIEWICZ, M. The effect of *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of Saanen goats on pasture. **Vet. Parasitol.**, v. 118, p. 61-69, 2003.
- VAN OORSCHOT, C.A.N. Taxonomy of the Dactylaria Complex, V. A review of *Arthrobotrys* and Allied Genera. **Stud. Mycol.**, v.26, p.61-71, 1985.
- VAN WYK, J.A.; MALAN, F.S.; BATH, G.F. Rampant anthelmintic resistance in sheep in South Africa – what are the options? In: WORKSHOP OF MANAGING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN ENDOPARASITES, 1997, Sun City, South Africa. **Proceedings...** Sun City, 1997. p.51-63.

ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L.; REN-HEN, G. A new species of *Arthrobotrys* from China. **Mycol. Res.**, v.100, p.527-530, 1996.

SEÇÃO 1

Trabalho a ser enviado para a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Avaliação dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* para o controle de nematódeos gastrintestinais parasitas de ovinos.

Evaluate of the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotrys robusta* to the gastrointestinal nematode parasites of sheep.

Resumo

O controle biológico é uma das alternativas estudadas para a profilaxia das helmintoses de ruminantes. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia dos fungos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* frente às nematodioses. Trinta borregas da raça Bergamácia, com peso e idade similares, foram aleatoriamente distribuídas em três grupos (G1: controle, G2: *Duddingtonia flagrans* e G3: *Arthrobotrys robusta*). Os animais foram mantidos em pastoreio rotacionado separadamente para cada grupo em seis piquetes de 0,34 hectares. Os péletes com e sem fungos foram misturados em 1 kg de ração e administrados duas vezes na semana na dose de 0,2 g/kg de peso vivo. A cada 14 dias avaliou-se: peso, volume globular (VG), ovos de strongilídeos por grama de fezes (OPG), coproculturas e larvas infectantes da pastagem. Não houve diferença significativa no peso médio e VG entre os grupos estudados. O número médio da contagem de OPG não diferiu significativamente entre o grupo controle e os demais, exceto em uma colheita, quando a média de OPG foi superior no grupo controle em comparação com o grupo que recebeu o fungo *D. flagrans* e em duas colheitas para o grupo tratado com o fungo *A. robusta*. *Haemonchus contortus* foi a espécie predominante recuperada de cordeiros traçadores. Não houve diferença significativa entre os grupos para L₃/kg de matéria seca de forragem. Entretanto, os animais do G3 foram os que receberam a menor quantidade de tratamentos com anti-helmíntico. O grupo que recebeu o fungo *A. robusta* foi o que recebeu menor quantidade de tratamentos anti-helmínticos.

Palavra-chave: Helmintos, Fungos nematófagos, Ovinos.

Introdução

A ovinocultura nacional tem se expandido nos últimos anos e um dos maiores problemas enfrentados pelos criadores são as helmintoses gastrintestinais, que causam retardo no desenvolvimento dos animais, gastos expressivos com tratamentos profiláticos e curativos e, em casos extremos, a morte. Os prejuízos econômicos devido à redução na produtividade, mortalidade e despesas com mão de obra e antiparasitários são as principais conseqüências das infecções (Amarante, 2001).

Alternativas para o controle de nematódeos gastrintestinais têm sido desenvolvidas e pesquisadas como controle biológico, principalmente a utilização de fungos nematófagos predadores de larvas infectantes na pastagem (Silva, 2003; Araújo et al., 2004; 2006).

No Brasil foram realizados vários estudos “in vitro” e “in vivo” com fungos nematófagos em diferentes espécies (Araújo et al., 1992; Alves et al., 2003; Castro et al., 2003; Araújo et al., 2004; 2006). Mais recentemente, alguns experimentos foram realizados a fim de avaliar a eficácia do biocontrole para pequenos ruminantes naturalmente infectados mantidos em pastagem (Graminha et al., 2005; Araújo et al., 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* na profilaxia das infecções por nematódeos gastrintestinais em ovinos criados a campo em Botucatu - SP.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Área de ovinos, do Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada na fazenda Edgardia, da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, definida pelas coordenadas geográficas 48° 24' 43" longitude Oeste e 22° 48' 00" de latitude Sul, solo tipo latossolo vermelho escuro, fase arenosa e temperatura média entre 16 e 22 °C, no período de junho a novembro de 2006. A parte laboratorial foi realizada no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências.

A vegetação do local foi de capim Tanzânia (*Panicum maximum*) e a pastagem foi recém-implantada. A área total utilizada neste estudo foi subdividida com cerca elétrica em seis piquetes com 0,34 hectares cada. Os

animais foram mantidos em sistema de pastoreio rotacionado, mudando de piquete a cada 14 dias.

Inicialmente, foram colhidas amostras fecais de 30 borregas da raça Bergamácia, nascidas em julho de 2005, as quais apresentaram em média 35 kg. Com base nos resultados das contagens de ovos por grama de fezes (OPG) (300 OPG em média), as fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos de dez animais por piquete. G1: controle, G2: tratado com *Duddingtonia flagrans* e G3: tratado com *Arthrotrys robusta*.

Todas as borregas receberam vacina específica (Sintoxan[®] - Merial) contra clostridiose antes do início do experimento.

Os péletes contendo os fungos foram confeccionados no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa – MG e cedidos para o presente estudo. Foram misturados em 1 kg de ração e administrados duas vezes na semana (terça-feira e sexta-feira) em cocho coletivo. A dose fornecida para cada grupo foi de 0,2 g de péletes para cada quilo de peso vivo. O grupo controle recebeu ração misturada com péletes que não continham fungo. Foi disponibilizado para os animais durante toda fase experimental sal mineral (Nutrumin[®], Nutrumin) e água potável *ad libitum*.

As avaliações foram realizadas a cada 14 dias. As variáveis analisadas foram: contagem de OPG, volume globular (VG), peso dos animais, número de larvas infectantes (L₃) na pastagem, isolamento de fungos das fezes dos animais e recuperação de vermes de cordeiros traçadores.

Amostras fecais foram colhidas em sacos plásticos 20x15 cm diretamente da ampola retal, individualmente. Posteriormente em caixa de isopor com gelo foram transportadas para o Laboratório.

A contagem de OPG foi realizada segundo a técnica de Gordon & Whitlock (1939). As coproculturas foram realizadas separadamente para cada grupo, segundo metodologia descrita por Roberts & O'Sullivan (1950). A identificação das larvas infectantes produzidas nas coproculturas foi realizada de acordo com Keith (1953).

Amostras de sangue foram colhidas através de punção de veia jugular em seringa de 3 mL contendo anti-coagulante (EDTA). Utilizou-se tubo capilar de hematócrito para a determinação do VG com a utilização de microcentrífuga.

A fim de evitar mortalidade, os animais foram tratados individualmente com Fosfato de levamisol (7.5 mg/kg, Ripercol[®], Fort Dodge) sempre que apresentaram VG inferior a 21% (Amarante et al., 1999) e/ou contagem superior a 5000 OPG. Entretanto, quando o valor de OPG apresentava-se acima do estipulado, porém o VG permanecia acima de 26%, esperava-se a próxima colheita para verificar se ainda havia necessidade de tratamento com anti-helmíntico.

Os animais foram pesados em uma balança digital por ocasião das colheitas. Após cada pesagem eram reajustadas as doses fúngicas para administração oral.

No dia da colheita das amostras fecais e sanguíneas, também foram colhidas amostras da pastagem para a determinação do número de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais por quilograma de matéria seca (L₃/kg M.S.). As amostras de capim foram colhidas de cada um dos piquetes dos módulos seguindo um traçado em forma de “W” (Taylor, 1939). No laboratório, as amostras foram processadas de acordo com a técnica descrita por Niezen et al. (1998). A identificação das larvas foi realizada de acordo com Keith (1953).

Uma vez por mês, 48 horas após do fornecimento dos pletes por via oral, foram colhidas fezes dos animais de cada grupo (subdividindo-as em duas amostras colhidas de cinco animais do grupo para todos os tratamentos) diretamente da ampola retal. As amostras foram misturadas (1 g da amostra de cada animal) e dessa mistura foi retirado 2 g, posteriormente colocadas com auxílio de uma espátula no centro das placas de Petri, com 9 cm de diâmetro, contendo Agar 1% sólido e antibiótico (Cloranfenicol 0,05 g/L). Adicionou-se sobre as placas uma suspensão com aproximadamente 3000 L₃ de *Haemonchus contortus*, as quais estavam armazenadas no Laboratório de Parasitologia. As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em estufa a 25 °C e observadas semanalmente por um período mínimo de 21 dias sob microscópio estereoscópio em objetivas de 10 e 50 x. Verificou-se a presença de larvas predadas e estruturas características que permitissem identificar o fungo utilizado em cada grupo, de acordo com as chaves de identificação (Cooke & Godfrey, 1964).

Foram utilizados seis cordeiros traçadores, da raça Ile de France, com idade aproximada de três meses, com cerca de 20 kg de peso, adquiridos em setembro de 2006 em uma propriedade localizada em Pratânia – SP.

Ao chegarem às instalações da UNESP, os animais foram alocados em duplas, as quais foram separadas aleatoriamente, em baias cimentadas. As baias eram limpas diariamente e os animais receberam água, sal mineral e feno de Tifton (*Cynodon* spp.) *ad libitum* e uma vez por dia recebiam ração comercial (Ração Noel[®], Cafenoel 300 g/animal). Os animais também foram vacinados contra clostridioses (Sintoxan[®] Polivalente, Merial, 2 mL, via subcutânea por animal).

Os animais adquiridos das referidas propriedades eram criados no pasto e, portanto, apresentavam-se naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. Para que os mesmos eliminassem as infecções helmínticas foi administrado Ripercol[®] (Fosfato de Levamisol, 7.5 mg/Kg, Fort Dodge) e Valbazen[®] (Albendazol, 10 mg/Kg, Cobalto, Pfizer) via oral. Exames coproparasitológicos posteriores ao tratamento foram realizados para confirmação da ausência de infecções helmínticas.

Após aproximadamente 30 dias de estabulação e confirmação de que os animais encontravam-se livres de infecções helmínticas, os cordeiros foram transportados para a propriedade, onde cada dupla de cordeiros permaneceu em pastejo com os respectivos grupos (Controle, fungos *D. flagrans* e *A. robusta*), por 28 dias, tempo suficiente para a permanência nos dois piquetes de cada grupo. Após esse período de pastejo, os cordeiros foram estabulados por 14 dias e ao final deste período, abatidos, para que as espécies de nematódeos fossem identificadas e quantificadas.

A análise estatística foi casualizada (2 grupos tratados e um grupo controle). Os dados foram submetidos à análise variância com a utilização do programa Minitab (Versão 11)[®]. Os dados referentes aos valores de OPG das ovelhas foram previamente transformados ($\text{Log}(x+1)$). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Em relação ao número de L₃/kg M.S., os dados de cada gênero foram classificados em presença ou ausência de larvas na pastagem dos piquetes

utilizados por cada grupo (dois por grupo) e comparados pelo teste de Qui-quadrado.

Resultados

O peso médio dos animais teve um pequeno aumento ao longo do experimento, porém não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os grupos (Figura 1). As médias de volume globular (VG %) foram similares, sem diferença significativa entre os grupos avaliados (Figura 2).

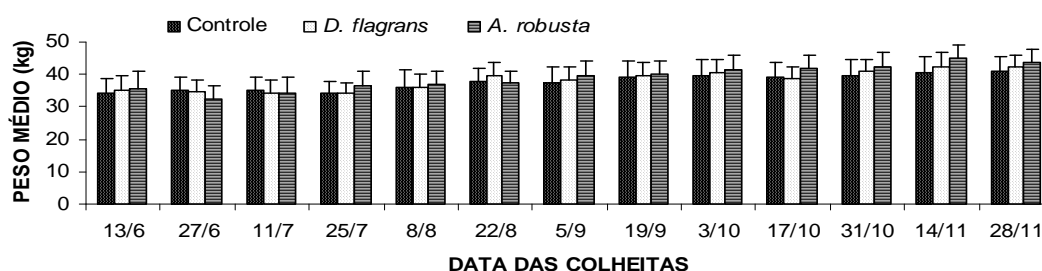


FIGURA 1. Média aritmética do peso dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*, no período de junho a novembro de 2006. Barras verticais = desvio padrão.

Quanto ao número médio de ovos por grama de fezes (OPG), observou-se na colheita do dia 25 de julho (Figura 3) diferença significativa ($P<0,05$) entre o grupo controle (2670 OPG) e o grupo tratado com o fungo *Duddingtonia flagrans* (950 OPG). Da mesma forma, nas colheitas do mês de agosto (08 e 22) o grupo controle apresentou maiores médias de OPG, 1220 e 1240 respectivamente ($P<0,05$) do que o grupo que recebeu o fungo *Arthrobotrys robusta* (400 e 580 OPG). Na colheita do dia 17 de outubro houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os grupos que receberam os fungos *D. flagrans* (6240 OPG) e *A. robusta* (610 OPG). Nas demais colheitas não houve diferenças significativas entre esses dois grupos em relação as contagens de OPG.

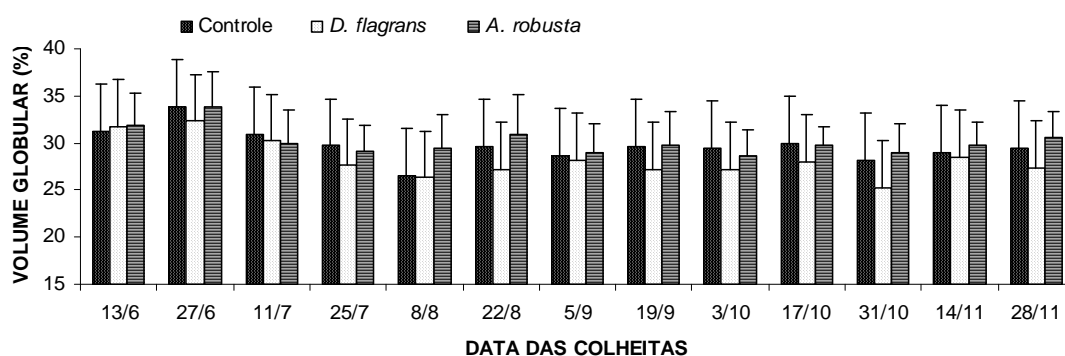


FIGURA 2. Média aritmética do volume globular dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta*, no período de junho a novembro de 2006. Barras verticais = desvio padrão.

Larvas infectantes de *Haemonchus* spp. predominaram nas coproculturas de todos os grupos e em todas as colheitas (Tabela 1), exceto no dia 14 de novembro, quando o grupo tratado com o fungo *A. robusta*, apresentou percentual mais elevado de *Trichostrongylus* spp..

Larvas infectantes de *Haemonchus* spp. foram detectadas nos piquetes pastejados pelos grupos Controle, *D. flagrans* e *A. robusta*, respectivamente, sete, sete e nove vezes. Não foi detectada diferença ($P > 0,05$) entre os grupos. Em relação a *Trichostrongylus* spp. foram recuperadas L₃ dos piquetes em cinco (controle), seis (*D. flagrans*) e duas (*A. robusta*) colheitas (Tabela 2).

Em relação ao isolamento de fungos nas fezes dos animais, observou-se nos grupos que receberam os fungos, o crescimento de estruturas características correspondente a cada fungo já na primeira semana.

Apenas as espécies *H. contortus* e *T. colubriformis* foram recuperadas dos animais traçadores, independentemente do grupo (Tabela 3).

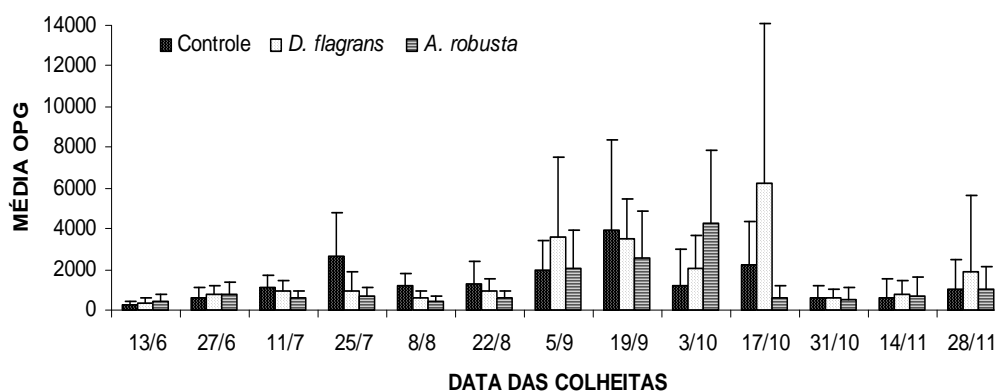


FIGURA 3. Média aritmética do número de ovos de trichostrongilídeos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio *Duddingtonia flagrans* e *Arthrobotrys robusta* no período de junho a novembro de 2006. Barras verticais = desvio padrão.

TABELA 1. Percentual de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais em coproculturas realizadas com amostras fecais obtidas dos ovinos do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*.

Data	Controle		<i>D. flagrans</i>		<i>A. robusta</i>	
	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>	<i>Haemonchus</i>	<i>Trichostrongylus</i>
	Spp.	spp.	spp.	spp.	spp.	spp.
13/06/06	82	18	94	6	99	1
27/06/06	92	8	94	6	91	9
11/07/06	99	1	95	5	98	2
25/07/06	99	1	98	2	98	2
08/08/06	94	6	98	2	95	5
22/08/06	95	5	96	4	94	6
05/09/06	89	11	93	7	95	5
19/09/06	88	12	92	7	94	6
03/10/06	94	6	99	1	96	4
17/10/06	85	15	91	9	85	15
31/10/06	93	7	72	28	84	16
14/11/06	95	5	70	30	46	54
28/11/06	76	24	84	16	64	36

TABELA 2. Médias aritméticas (\pm desvio padrão) do número de larvas infectantes de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. por quilograma de matéria seca em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*.

Datas	Controle		<i>D. flagrans</i>		<i>A. robusta</i>	
	H	T	H	T	H	T
13/06/06	0	0	0	0	49,5 \pm 8,1	0
27/06/06	0	0	0	0	33,3 \pm 5,2	0
11/07/06	37,8 \pm 3,5	6,3 \pm 0,6	6,6 \pm 0,6	0	22,3 \pm 6,7	0
25/07/06	0	0	0	0	0	0
08/08/06	3,9 \pm 0,6	0	23,9 \pm 4,6	9,0 \pm 1,7	26,3 \pm 2,1	0
22/08/06	4,3 \pm 1,2	6,2 \pm 0,6	11,2 \pm 1,7	3,8 \pm 0,6	0	0
05/09/06	324 \pm 30,9	5,9 \pm 0,6	27,1 \pm 2,1	2,7 \pm 0,6	4,9 \pm 0,6	0
19/09/06	0	0	0	0	0	0
03/10/06	0	0	0	0	54,5 \pm 5,2	0
17/10/06	0	0	0	7,1 \pm 0,6	7,2 \pm 0,6	6,3 \pm 0,6
31/10/06	8,5 \pm 0,6	0	9,7 \pm 0,6	0	0	0
14/11/06	55,7 \pm 3,2	9,3 \pm 1	48,8 \pm 5,2	5,4 \pm 0,6	7,9 \pm 0,6	0
28/11/06	10,2 \pm 1,2	17,7 \pm 1	146,1 \pm 10,0	75,0 \pm 5,6	35,8 \pm 2,6	5,8 \pm 0,6

H = *Haemonchus* spp.; T = *Trichostrongylus* spp.

A eficácia dos tratamentos com anti-helmíntico foi de aproximadamente 60%. O grupo tratado pelo fungo *A. robusta* recebeu a menor quantidade de tratamentos (Tabela 4).

Oocistos de *Eimeria* spp. estiveram presentes nas amostras fecais dos animais de todos os grupos e em todas as colheitas. Ovos de *Moniezia* spp. também foram detectados em alguns dos exames realizados.

TABELA 3. Número de nematódeos em cordeiros traçadores colocados em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*. Os traçadores foram mantidos na pastagem com os grupos experimentais de 31 de outubro à 28 de novembro de 2006.

Taçadores	Grupo	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
62	Controle	650	550
01	Controle	580	1560
20	<i>D. flagrans</i>	670	1320
02	<i>D. flagrans</i>	1000	1050
33	<i>A. robusta</i>	920	2670
38	<i>A. robusta</i>	840	1610

TABELA 4. Datas em que os animais do grupo controle e dos grupos que receberam, duas vezes por semana, micélio de *Duddingtonia flagrans* ou de *Arthrobotrys robusta*, foram tratados individualmente com anti-helmíntico. Experimento com início em 13 de junho e término em 28 de novembro de 2006.

Grupo	Data	Nº animais tratados	Total de tratamentos
CONTROLE	11/09/06	1 (436)	6
	21/09/06	2 (483, 485)	
	05/10/06	1 (483)	
	19/10/06	2 (483, 436)	
<i>D. flagrans</i>	11/09/06	2 (460, 465)	8
	21/09/06	2 (460, 465)	
	19/10/06	4 (460, 486, 479, 470)	
<i>A. robusta</i>	21/09/06	1 (458)	2
	05/10/06	1 (458)	

O número das ovelhas encontra-se entre parênteses.

Discussão

A média aritmética das contagens de OPG demonstrou que dentre as colheitas realizadas foram poucos os resultados significativos entre os grupos tratados com os fungos e o grupo controle. Porém, a menor quantidade de tratamentos individuais com anti-helmínticos foi administrada aos animais que recebeu o fungo *A. robusta*. Estes resultados foram similares aos obtidos por Rocha et al. (2007), também em Botucatu - SP, que, em somente uma colheita, encontraram contagem de OPG do grupo tratado pelo fungo *D. flagrans* significativamente inferior a do grupo controle. Resultados similares também foram observados por Faessler et al. (2007), em experimento realizado com ovelhas leiteiras na Suíça, em três diferentes propriedades e por Maingi et al. (2006) em estudo desenvolvido na África do Sul com cabras.

Graminha et al. (2005), no Estado de São Paulo, que testaram a eficácia de outra espécie do fungo *Arthrobotrys musiformis*, em ovinos naturalmente infectados, também não observaram efeito do tratamento nas contagens de OPG, porém constataram que cordeiros traçadores colocados com o grupo tratado apresentaram redução de aproximadamente 50% no número de *T. colubriformis*, observações não encontradas neste estudo. Da mesma maneira, Fontenot et al. (2003), nos Estados Unidos, apesar de não terem encontrado diferença significativa para as médias de OPG, observaram redução da contaminação do pasto por L₃ e na produção de larvas infectantes em coproculturas.

Como aparentemente não houve diferença na contaminação da pastagem, os animais de todos os grupos, apresentaram médias de peso similares já que estiveram expostos à mesma carga de parasitas. Resultados similares foram encontrados por Rocha et al. (2007), ao testarem o fungo *D. flagrans*, durante seis meses, em cordeiras Ile de France na mesma região e por Campos (2006), o qual também não encontrou diferença significativa ao trabalhar com bovinos e avaliar a eficácia do fungo *Monacrosporium sinense*, durante seis meses, em experimento realizado no estado de Minas Gerais, Brasil.

Em contraste, na Malásia Chandrawathani et al. (2004) obtiveram melhor ganho de peso para os animais tratados (Santa Inês x Corriedale) com o fungo *D. flagrans* em experimento realizado a campo por aproximadamente um ano. Resultados positivos também foram observados por Araújo et al. (2007) ao testarem o fungo *Monacrosporium thaumasium* na espécie caprina em região semi-árida do Ceará. Neste experimento os animais tratados com o fungo tiveram maior ganho de peso e menor carga parasitária.

A altura da forrageira no momento de introdução dos animais nos piquetes ultrapassava 60 cm e em conseqüência desse fato os animais restringiram o pastejo a parte periférica dos piquetes. Isto pode ter comprometido o ganho de peso dos animais, uma vez que devido ao perfil comportamental de ovinos Bergamácia, que são bastante gregários, eles procuram andar em grupo mantendo contato visual. Portanto, o pastejo não foi uniforme tendo havido excesso de forragem no centro dos piquetes.

As médias de VG também foram similares nos grupos independentemente do tratamento com o fungo. Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha et al. (2007), Chandrawathani et al. (2004) e Fontenot et al. (2003). Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos no presente trabalho, os resultados previamente apresentados demonstraram que os valores permaneceram no geral dentro da normalidade para a espécie (27 a 45% para o VG) (Jain, 1996).

As temperaturas mensais médias variaram de 16,2 °C a 21,7 °C. Segundo Pandey (1937) e Castro et al. (2003) a temperatura ideal situa-se entre 20 e 30 °C. Portanto, em grande parte do experimento as temperaturas foram desfavoráveis ao bom crescimento e atividade dos fungos nematófagos.

Portanto, as temperaturas mais baixas observadas no local do estudo talvez não tenham sido adequadas para o desenvolvimento ideal dos fungos testados. Vale ainda ressaltar que os fungos utilizados neste experimento foram isolados na região de Viçosa – MG, que apresenta temperaturas superiores às de Botucatu. É possível que evolutivamente os fungos tenham se adaptado para proliferar em condições ambientais similares às encontradas naquela região e não em Botucatu. Quando o fungo *Monacrosporium thaumasium*, isolado de Viçosa, foi testado em Sobral, Ceará (Araújo et al., 2007), com temperaturas médias elevadas, em torno de 26,8 °C apresentou boa eficácia. Os resultados obtidos sugerem que talvez, apenas fungos adaptados a condições locais apresentem boa eficácia. Portanto, em estudos futuros, seria interessante isolar fungos na região de Botucatu para então avaliá-los quanto à eficácia como controle biológico.

Outro ponto observado foi aumento do OPG no segundo trimestre (setembro a novembro), o qual coincidiu com o aumento da precipitação pluviométrica, da umidade relativa do ar. Em consequência maior quantidade de tratamentos com anti-helmínticos foi administrada aos animais. Em relação à quantidade total de larvas recuperadas por grupo, somente em duas colheitas recuperou-se número elevado de larvas (>100 L₃/Kg de MS), entretanto essas foram também no segundo trimestre (Em setembro e novembro para os grupos 1 e 2 respectivamente). Segundo Amarante & Barbosa (1995) o pico da contagem de OPG em ovinos ocorre nos meses de setembro e outubro, o que está de acordo no presente experimento e justifica a maior quantidade de tratamentos realizados nos dois meses citados.

Os dados referentes às larvas correspondem aos encontrados por Campos (2006) em experimento realizado com bovinos, o qual também recuperou maior quantidade de larvas nos meses de maior precipitação pluvial e o relacionou a um maior número de amostras colhidas de áreas onde se concentravam as larvas ou colhidas mais próximas dos bolos fecais. Além das possíveis justificativas para os resultados do presente estudo, os animais não pastejaram uniformemente e houve concentração de fezes em determinados locais, em especial na parte lateral dos piquetes, ou seja, as amostras colhidas do traçado em W não representavam a real distribuição das larvas. O comportamento de pastejo das borregas também pode ter influenciado na

distribuição do fungo e conseqüentemente prejudicado sua atividade predatória no pasto, pois como já é conhecido, após passagem pelo trato gastrointestinal, os fungos nematófagos agem no ambiente, utilizando o animal somente como veículo carreador.

Quantidades pequenas de larvas (0 a 44 larvas/kg de matéria seca) também foram observadas em trabalho realizado por Maingi et al. (2006) com caprinos na África do Sul no verão. Os autores atribuíram o fato à altura da forrageira (acima de 60 cm) em alguns locais dos piquetes.

Todos os cultivos de fezes realizados uma vez por mês demonstraram crescimento fúngico após 48 horas. Em uma semana as armadilhas produzidas por esses agentes já eram bem visualizadas. Fato este que comprova a sobrevivência do fungo a passagem do trato gastrointestinal.

Os resultados das coproculturas e dos vermes obtidos dos animais traçadores confirmam a predominância de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos da região, como já previamente relatados por Amarante et al (2004) e Rocha et al. (2008).

Doses maiores (2 g/10 kg de peso vivo) do que as fornecidas por Graminha et al. (2005) e Rocha et al. (2007) foram utilizadas, porém, não tiveram influência na profilaxia das helmintoses. Araújo et al. (2006). Outra questão importante diz respeito à freqüência de administração semanal do fungo, a qual talvez não tenha sido suficiente para propiciar redução na contaminação ambiental, como sugeriu Rocha et al. (2007).

De qualquer forma, trabalhos realizados em outros países demonstraram melhores resultados quando os animais ingeriram diariamente o fungo nematófago (Chandrawathani et al. 2003; Fontenot et al. 2003; Terril et al., 2004).

A taxa de lotação elevada e o tipo de manejo utilizado no estudo representaram a realidade da ovinocultura da região, porém as lotações elevadas favorecem a transmissão dos parasitas e por conseqüência, podem comprometer o desempenho dos animais. Nessas condições ambientais e de manejo, os fungos testados não propiciaram melhora na profilaxia da verminose.

Referências

- ALVES, P.H.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; ASSIS, R.C.L.; SARTI, P.; CAMPOS, A.K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55, p. 568-573. 2003.
- AMARANTE, A.F.T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. *A produção animal na visão dos brasileiros*. Piracicaba: FEALQ, p.461-473, 2001.
- AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A. Seasonal variations in populations of infective larvae on pasture and nematode faecal egg output in sheep. **Vet. Zoot.**, v. 7, p. 127-133, 1995.
- AMARANTE, A.F.T.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W. S.; DAVIS, S.K.; BAZER, F. W. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbred lambs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 80, p. 311-324, 1999.
- AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematodes infections. **Vet. Parasitol.** v. 120, 91-106, 2004.
- ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S.; MAIA, A.S.; MAGALHÃES, A.C.M. Controle de larvas infectantes de *Haemonchus placei* por fungos predadores da espécie *Monacrosporium ellypsosporum* em condições de laboratório. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 44, n. 6, p. 521-526, 1992.
- 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 nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n. 2, p. 65-71, 2004.
- ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.15, n.2, p.76-79, 2006.
- ARAÚJO, J.V.; RODRIGUES, M.L.A.; SILVA, W.W.; VIEIRA, L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo

fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesq. Agropec. Bras.** v.42, n.8, p.000-000, ago., 2007.

CAMPOS, A.K. *Fungos nematófagos no controle de nematóides gastrintestinais de ruminantes*. 2006. 138f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CASTRO, A.A.; OLIVEIRA, C.R.C.; ANJOS, D.H.S.; ORNELAS, E.I.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ARAÚJO, J.V.; SAMPAIO, I.B.M.; RODRIGUES, M.L.A. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de eqüinos (Nematoda: cyathostominae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 12, n. 2, p. 53-57, 2003.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; LARSEN, M., GILLESPIE, A.T.; ZAHARI, W.M. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.** v.117, p. 173-183, 2003.

CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; ADNAN, M.; WALLER, P.J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.T. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.** v.120, p.177-187, 2004.

COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key to nematode destroying fungi. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v.47, n.1, p. 61, 74, 1964.

FAESSLER, H.; TORGERSON, P.R.; HERTZBERG, H. Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. **Vet. Parasitol.** v.147, p. 96-102, 2007.

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.

GORDON, H.M.C.L.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J. Counc. Sci. Ind. Res.** v.12, p.103-112, 1939.

GRAMINHA, E.B.N.; MONTEIRO, A.C.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys*

musiformis em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 40, n. 9, p. 927-933, 2005.

KEITH, R.K. The differentiation of infective larval of some common nematode parasites of cattle. **Aust. J. Zool.**, v. 1, p. 223-35, 1953.

MAINGI, N.; KRECEK, R.C.; VAN BILJON, N. Control of gastrointestinal nematodes in goats on pastures in South Africa using nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and selective anthelmintic treatments. **Vet. Parasitol.** v.138, p.328-336, 2006.

NIEZEN, J.H.; MILLER, C.M.; ROBERTSON, H.A.; WILSON, S.R., MACKAY, A.D. Effect of topographical aspect and farm system on the population dynamic of *Trichostrongylus* larvae on a hill pasture. **Vet. Parasitol.** 78, p.37-48, 1998.

PANDEY, V.S. Predatory activity of nematode trapping fungi against the larvae of *Trichostrongylus axei* and *Ostertagia ostertagi*: a possible method of biological control. **J. Helminthol.**, v.57, p.35-48, 1937.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, S.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Aus. J. Agric. Res.**, v. 1, p. 99-102, 1950.

ROCHA, R. A.; ARAÚJO, J.V.; AMARANTE, A.F.T. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in lambs at pasture. **J. Helminthol.**, v.81, p.387-392, 2007.

ROCHA, R.A.; BRESCIANI, K.D.S; BARROS, T.F.M.; FERNANDES, L.H.; SILVA, M.B.; AMARANTE, A.F.T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Rumin. Res.**, v.75, p.135-143, 2008.

SILVA, W.W. Aspectos epidemiológicos e controle biológico pelo fungo (*Monacrosporium thaumasium*, Drechsler, 1937) de nematóides gastrintestinais de caprinos em ecossistema semi-árido do Nordeste/ Brasil. Rio de Janeiro, 2003. 52p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária, Parasitologia Veterinária) - Seropédica. UFRRJ.

TAYLOR, E.L. Technique for the estimation of pasture infestation by *Strongyloid* larvae. **Parasitology**, v. 31, p. 473-8, 1939.

TERRIL, T.H.; LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HUSTED, S.; MILLER, J.H.; KAPLAN, R.M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat faeces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Vet. Parasitol.**,v.120, p. 285-296, 2004.

SEÇÃO 2

Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Helminthology

Eficácia do fungo *Arthrobotrys robusta* administrado em diferentes dosagens na profilaxia das verminoses em ovelhas criadas em pastagem.

Resumo

O principal problema sanitário da ovinocultura é a verminose, a qual muitas vezes inviabiliza a criação. Alternativas para controle de endoparasitas, como os fungos nematófagos, são pesquisadas em diversos países do mundo. No Brasil após bons resultados para a espécie bovina, iniciou-se estudos a campo com ovinos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do fungo *Arthrobotrys robusta* em diferentes dosagens em ovelhas Bergamácia adultas, com peso e idades similares, criadas a campo em pastoreio rotacionado. As ovelhas foram aleatoriamente distribuídas em três grupos (n=10) onde, o grupo 1 recebeu péletes sem fungo, o grupo 2 recebeu o fungo duas vezes na semana e o grupo 3 recebeu o fungo diariamente. A dose administrada foi de 2g de péletes para 10 kg de peso vivo misturados em 1 kg de ração em cocho coletivo. Avaliou-se quinzenalmente o peso, volume globular e ovos de strongilídeos por grama de fezes, coproculturas e larvas infectantes recuperadas da pastagem. Não houve diferença significativa para o peso, volume globular e ovos de strongilídeos por grama de fezes. *Haemonchus contortus* foi a espécie predominante recuperada dos cordeiros traçadores no experimento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos na recuperação de larvas infectantes de *Haemonchus contortus* por quilo de matéria seca. Já para o *Trichostrongylus colubriformis* o grupo que recebeu o fungo diariamente foi significativamente melhor. Concluiu-se que o fungo *Arthrobotrys robusta* administrado diariamente foi eficaz na redução de L₃ recuperadas da pastagem.

Palavra-chave: Helmintos, Fungos nematófagos, Ovinos.

Introdução

O uso indiscriminado de anti-helmínticos teve como consequência a seleção de populações de helmintos resistentes aos diferentes grupos químicos utilizados no tratamento dos ovinos (Boray et al., 1990; Amarante et al., 1992; Echevarria et al., 1996; Mota et al., 2003). Além disso, os resíduos químicos destes produtos causam impacto negativo sob o ponto vista ambiental e de saúde pública (Boray et al., 1990).

Frente a esse problema pesquisadores têm estudado métodos alternativos de controle das endoparasitoses de ovinos, como os fungos nematófagos predadores, como o *Arthrobotrys robusta*. Em geral, as espécies pertencentes ao gênero formam conídios blásticos com ramificações em até três septos, de aproximadamente 300 nm de comprimento, formato ovóide e proliferação na extremidade dos conidióforos (Zhang et al., 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do fungo nematófago *A. robusta* em diferentes dosagens na profilaxia das infecções por nematódeos gastrintestinais em ovinos criados a campo em Botucatu - SP.

Material e métodos

O experimento foi conduzido na Área de ovinos, do Departamento de Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, localizada na fazenda Edgardia, da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, definida pelas coordenadas geográficas 48° 24' 43" longitude Oeste e 22° 48' 00" de latitude Sul, solo tipo latossolo vermelho escuro, fase arenosa e temperatura média entre 21 e 24,4 °C, no período de fevereiro a junho de 2007. A parte laboratorial foi realizada no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biociências.

A vegetação do local foi de capim Tanzânia (*Panicum maximum*) e houve pastejo prévio por ovinos. A área total utilizada neste estudo foi subdividida com cerca elétrica em seis piquetes com 0,34 hectares cada. Os animais foram mantidos em sistema de pastoreio rotacionado, mudando de piquete a cada 14 dias.

Os fungos foram confeccionados no Laboratório de Parasitologia, da Universidade Federal de Viçosa - MG e cedidos para este experimento.

Os fungos foram administrados misturados à ração, fornecida em cocho coletivo, que comportava todos os animais lado a lado. Nos períodos críticos (abril a julho), ou seja, na escassez de forragem, os animais foram suplementados com silagem de milho (2 kg/ animal) e ou ração concentrada produzida no local (1 kg/ grupo).

Foram utilizadas 30 ovelhas, com 2 a 5 anos de idade com peso médio de 52 kg. Os animais foram distribuídos em três grupos com base em contagens prévias de OPG (média de 840 OPG). G1: controle, G2: tratado com 2 g de péletes/10 kg de peso vivo/ 2 vezes na semana (terça-feira e sexta-feira) e G3: tratado com 2 g de péletes/10 kg de peso vivo/ diariamente. Foi disponibilizado para os animais durante toda fase experimental sal mineral (Nutrumin[®], Nutrumin) e água potável *ad libitum*.

Todas as ovelhas foram vacinadas contra clostridiose e pasteurelose no final do período experimental com vacina específica.

Os péletes sem e com fungos foram misturados em 1 kg de ração e administrados duas vezes na semana (terça-feira e sexta-feira) para os grupos 1 e 2 respectivamente. Já o grupo 3 recebeu péletes com fungos diariamente. A dose fornecida para cada grupo foi de 2 g de péletes para cada 10 kg de peso vivo. As ovelhas foram mantidas em sistema de pastoreio rotacionado, mudando de piquete a cada 14 dias e submetidas ao manejo reprodutivo usual do local (monta controlada), com encarneamento realizado em final de fevereiro e durante o mês de março de 2007 com previsão de parto para agosto e setembro.

As avaliações foram realizadas a cada 14 dias. As variáveis analisadas foram: contagem de OPG, volume globular (VG), peso dos animais, número de L₃ na pastagem, isolamento de fungos das fezes dos animais, recuperação de vermes dos cordeiros traçadores e condição corporal dos animais (Sanudo & Sierra, 1986).

Amostras fecais foram colhidas diretamente da ampola retal, individualmente, acondicionadas e transportadas para o Laboratório. A contagem de OPG foi realizada segundo a técnica de Gordon & Whitlock (1939). As coproculturas foram realizadas separadamente para cada grupo,

segundo metodologia descrita por Roberts & O'Sullivan (1950). A identificação das larvas infectantes produzidas nas coproculturas foi realizada de acordo com Keith (1953).

Amostras de sangue foram colhidas através de punção de veia jugular em seringa de 3 mL contendo anti-coagulante (EDTA) e posteriormente processadas em laboratório. Utilizou-se tubo capilar de hematócrito para a determinação do VG com a utilização de microcentrífuga.

Os animais foram tratados individualmente com Fosfato de levamisol (7.5 mg/kg, Ripercol[®], Fort Dodge) sempre que apresentaram volume globular inferior a 21% (Amarante et al., 1999) e/ou contagem superior a 5000 OPG. Entretanto, quando o valor de OPG apresentava-se acima do estipulado, porém o VG permanecia acima de 26%, esperava-se a próxima colheita para verificar se ainda havia necessidade de tratamento com anti-helmíntico.

Os animais foram pesados em balança digital por ocasião das colheitas. Após cada pesagem eram reajustadas as doses fúngicas para administração oral.

No dia da colheita das amostras fecais e sanguíneas, também foram colhidas amostras da pastagem para a determinação do número de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais por quilograma de matéria seca (L₃/kg M.S.). As amostras de capim foram colhidas segundo metodologia de Taylor (1939). E processadas de acordo com a técnica descrita por Niezen et al. (1998). A identificação das larvas foi realizada de acordo com Keith (1953).

Uma vez por mês, após 48 horas do fornecimento dos péletes por via oral, foram colhidas fezes dos animais de cada grupo (subdividindo-as em duas amostras colhidas de cinco animais do grupo para todos os tratamentos) diretamente da ampola retal. As amostras foram misturadas (1 g da amostra de cada animal) e dessa mistura foi retirado 2 g, posteriormente colocadas com auxílio de uma espátula no centro das placas de Petri, com 9 cm de diâmetro, contendo Agar 1% sólido e antibiótico (Cloranfenicol 0,05 g/L). Adicionou-se sobre as placas uma suspensão com aproximadamente 3000 L₃ de *Haemonchus contortus* as quais estavam armazenadas no Laboratório de Parasitologia (Instituto de Biociências). As placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em estufa a 25°C e observadas semanalmente por um período mínimo de 21 dias sob microscópio estereoscópio em objetivas de 10 e

50 x. Verificou-se a presença de larvas predadas e estruturas características que permitissem identificar o fungo utilizado em cada grupo, de acordo com as chaves de identificação (Cooke & Godfrey, 1964).

Foram utilizados seis cordeiros traçadores, da raça Santa Inês, com idade aproximada de três meses, com peso médio de 15 kg, adquiridos em uma propriedade de Botucatu-SP em maio de 2007. Ao chegarem às instalações da UNESP, os animais foram alocados em duplas, as quais foram separadas aleatoriamente, em baias cimentadas. As baias eram limpas diariamente e os animais receberam água, sal mineral e feno de Tifton (*Cynodon spp.*) *ad libitum* e uma vez por dia recebiam ração comercial (Ração Noel[®], Cafenoel 300 g/animal). Os animais também foram vacinados contra clostridioses (Sintoxan[®] Polivalente, Merial, 2 mL, via subcutânea por animal).

Os animais adquiridos da referida propriedade eram criados no pasto e, portanto, apresentavam-se naturalmente infectados com nematódeos gastrintestinais. Para que os mesmos eliminassem as infecções helmínticas foi administrado Ripercol[®] (Fosfato de Levamisol, 7.5 mg/Kg, Fort Dodge) e Valbazen[®] (Albendazol, 10 mg/Kg, Cobalto, Pfizer) via oral. Exames coproparasitológicos posteriores ao tratamento foram realizados para confirmação da ausência de infecções helmínticas.

Após aproximadamente 30 dias de estabulação e confirmação de que os animais encontravam-se livres de infecções helmínticas, os cordeiros foram transportados para a propriedade, onde cada dupla de cordeiros permaneceu em pastejo com os respectivos grupos (Controle, fungos *D. flagrans* e *A. robusta*), por 28 dias, tempo suficiente para a permanência nos dois piquetes de cada grupo. Após esse período de pastejo, os cordeiros foram estabulados por 14 dias e ao final deste período, abatidos, para que as espécies de nematódeos fossem identificadas e quantificadas.

A análise estatística foi casualizada (2 grupos tratados e um grupo controle). Os dados foram submetidos à análise variância com a utilização do programa Minitab (Versão 11). Os dados referentes aos valores de OPG das ovelhas foram previamente transformados ($\log(x+1)$). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey e consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Em relação ao número de L_3 /kg M.S., os dados de cada gênero foram classificados em presença ou ausência de larvas na pastagem dos piquetes utilizados por cada grupo (dois por grupo) e comparados pelo teste de Qui-quadrado.

Resultados

Em relação as variáveis avaliadas observou-se que o peso médio dos animais permaneceu constante ($P>0,05$) (Figura 1) e que a condição corporal (CC) média do grupo variou entre 2,3 e 2,8 em todos os meses de colheita. Os valores de volume globular (Figura 2) também foram similares nos três grupos avaliados ao longo de toda fase experimental ($P>0,05$).

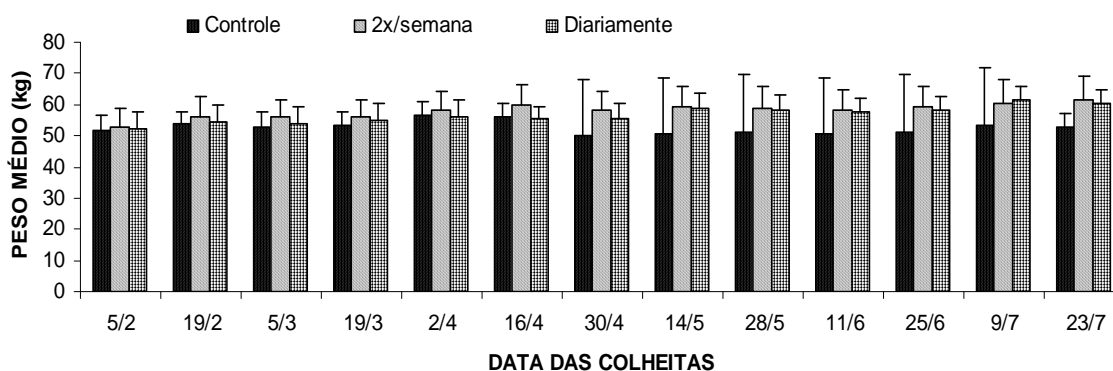


FIGURA 1. Média aritmética do peso dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007. Barras verticais = desvio padrão.

Não houve diferença significativa ($P>0,05$) do número médio de OPG entre os grupos (Figura 3). Oocistos de *Eimeria* spp. foram encontrados em todas as colheitas e em todos os grupos avaliados. Ovos de *Moniezia* spp. também foram detectados em alguns dos exames realizados.

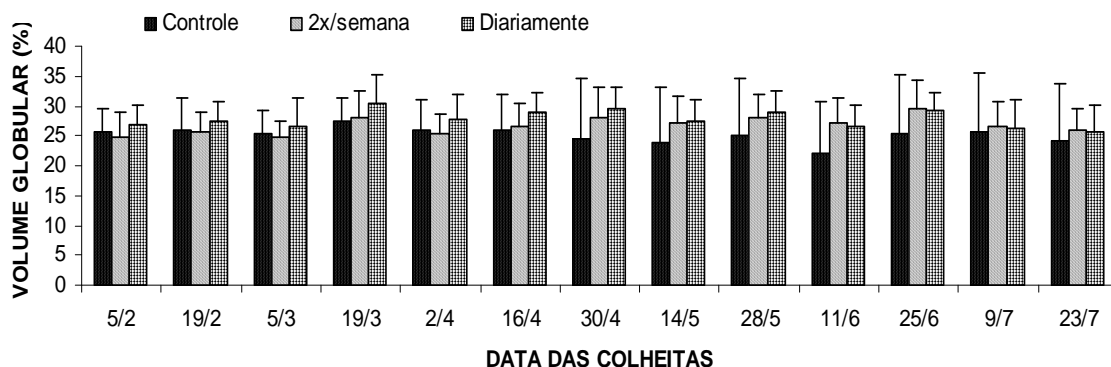


FIGURA 2. Média aritmética do volume globular dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro à julho de 2007. Barras verticais = desvio padrão.

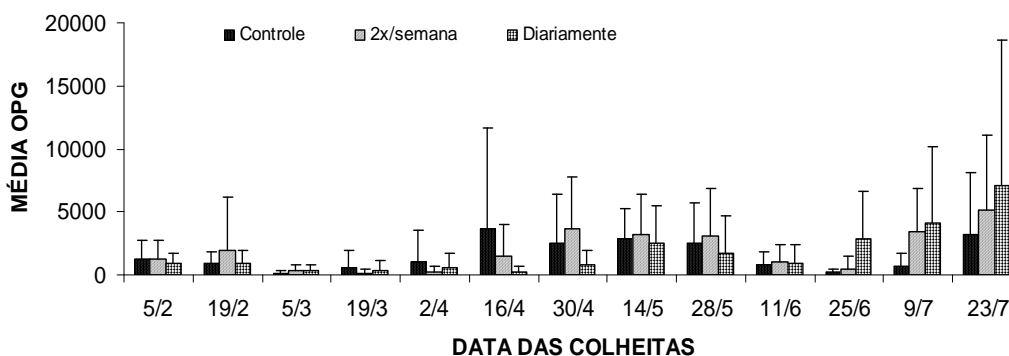


FIGURA 3. Média aritmética do número de ovos de estrongilídeos por grama de fezes (OPG) dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007. Barras verticais = desvio padrão.

Em todas as coproculturas realizadas verificou-se que predominara os gêneros *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp (Tabela 1).

Em relação as L₃ recuperadas na pastagem, houve diferença entre os grupos (P<0,05) apenas em relação a recuperação de larvas infectantes de *Trichostrongylus* spp., as quais foram recuperadas em menor número no grupo tratado diariamente com fungo. Somente em duas colheitas para o grupo 1 e 2 recuperou-se grande quantidade de larvas infectantes (>100 L₃/kg de matéria seca), enquanto que o grupo que recebeu o fungo diariamente (Grupo 3) esta recuperação ocorreu somente em uma colheita do mês de junho (Tabela 2).

TABELA 1. Percentual de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais em coproculturas realizadas com amostras fecais obtidas dos animais do grupo controle e dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente, no período de fevereiro a julho de 2007.

Data	Controle		2x/semana		Diariamente	
	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.	<i>Haemonchus</i> spp.	<i>Trichostrongylus</i> spp.
05/02/07	98	2	93	7	97	3
19/02/07	68	32	91	9	87	13
05/03/07	91	9	43	57	89	11
19/03/07	91	9	91	9	82	18
02/04/07	92	8	87	12	88	13
16/04/07	96	4	99	1	97	3
30/04/07	98	2	98	2	95	5
14/05/07	98	2	97	3	98	2
28/05/07	95	5	99	1	97	3
11/06/07	88	12	91	9	96	4
25/06/07	85	15	95	5	94	6
09/07/07	92	8	93	7	94	6
23/07/07	95	5	98	2	96	4

TABELA 2. Médias aritméticas (\pm desvio padrão) do número de larvas infectantes de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp. por quilograma de matéria seca em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente.

Datas	Controle		2x/semana		Diariamente	
	H	T	H	T	H	T
05/02/07	19,1 \pm 27	0	6,85 \pm 9,7	6,85 \pm 9,7	32,55 \pm 26,7	0
19/02/07	9,35 \pm 13,2	13,2 \pm 7,8	257,55 \pm 364,2	99,45 \pm 132,6	73,55 \pm 104,0	0
05/03/07	5,15 \pm 7,3	13,95 \pm 5,3	255,2 \pm 360,9	101,95 \pm 126,5	52,85 \pm 74,7	0
19/03/07	109,05 \pm 90,4	10,8 \pm 15,3	88,1 \pm 124,6	0	41,8 \pm 59,1	0
02/04/07	7,3 \pm 10,3	14,55 \pm 20,6	0	0	0	0
16/04/07	10,1 \pm 14,3	0	0	0	7,75 \pm 11,0	0
30/04/07	4,1 \pm 5,8	0	6,05 \pm 8,6	0	31,75 \pm 17,9	0
14/05/07	0	0	0	0	0	0
28/05/07	29,45 \pm 18,2	0	8,8 \pm 12,4	0	82,65 \pm 116,9	0
11/06/07	0	18,85 \pm 26,7	0	8,35 \pm 11,8	100,15 \pm 141,6	7,55 \pm 10,7
25/06/07	55,95 \pm 79,1	130,5 \pm 184,6	10,9 \pm 15,4	0	25,55 \pm 36,1	0
09/07/07	0	0	0	0	0	0
23/07/07	0	0	0	0	0	0

H = *Haemonchus* spp., T = *Trichostrongylus* spp.

Apenas as espécies *H. contortus* e *T. colubriformis* foram recuperadas dos animais traçadores, independentemente do grupo com o qual os animais foram colocados (Tabela 3).

TABELA 3. Número de nematódeos em cordeiros traçadores colocados em piquetes pastejados pelos animais do grupo controle e pelos animais dos grupos que receberam micélio de *Arthrobotrys robusta* duas vezes na semana ou diariamente. Os traçadores foram mantidos na pastagem com os grupos experimentais de 25 de junho à 23 de julho de 2007.

Traçadores	Grupo	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus colubriformis</i>
22	Controle	470	220
1495	Controle	790	360
B 27	2x/semana	310	250
C 6	2x/semana	440	200
C 29	Diariamente	1010	580
S/N	Diariamente	1040	600

Estruturas características correspondente ao fungo foram visualizadas já na primeira semana em relação ao isolamento de fungos nas fezes dos animais. Os animais do grupo que recebeu o fungo *A. robusta* 2x/semana foram os tratados mais vezes.

Os tratamentos com o anti-helmíntico tiveram eficácia de aproximadamente 60%. Dentre os animais do grupo controle que receberam anti-helmíntico, quatro deles foram tratados mais de duas vezes. Já para o grupo que recebeu o fungo *A. robusta* duas vezes na semana os tratamentos se repetiram mais de três vezes para trás dos animais. Para os animais do grupo 3 (diariamente) apenas dois animais foram tratados de mais de duas vezes.

Discussão

Ao comparar as diferentes dosagens do fungo *A. robusta* observou-se pouca ou total ineficácia. Estes resultados foram similares aos obtidos por Rocha et al. (2007), também em Botucatu - SP, que, em somente uma colheita, encontraram contagem de OPG do grupo tratado pelo fungo *D. flagrans* significativamente inferior a do grupo controle. Resultados similares também

foram observados por Faessler et al. (2007), em experimento realizado com ovelhas leiteiras na Suíça, em três diferentes propriedades e por Maingi et al. (2006) em estudo desenvolvido na África do Sul com cabras.

Graminha et al. (2005), no Estado de São Paulo, que testaram a eficácia de outra espécie do fungo *Arthrobotrys musiformis*, em ovinos naturalmente infectados, também não observaram efeito do tratamento nas contagens de OPG, porém constataram que cordeiros traçadores colocados com o grupo tratado apresentaram redução de aproximadamente 50% no número de *T. colubriformis*. Da mesma maneira, Fontenot et al. (2003), nos Estados Unidos, apesar de não ter encontrado diferença significativa para as médias de OPG, observaram a redução da contaminação do pasto por L₃ e na produção de larvas infectantes em coproculturas.

Como aparentemente não houve diferença na contaminação da pastagem, os animais de todos os grupos, apresentaram médias de peso similares já que estiveram expostos à mesma carga de parasitas. Resultados similares foram encontrados por Rocha et al. (2007), ao testarem o fungo *Duddingtonia flagrans*, durante seis meses, em cordeiras Ile de France na mesma região e por Campos (2006), o qual também não encontrou diferença significativa ao trabalhar com bovinos e avaliar a eficácia do fungo *Monacrosporium sinense*, durante seis meses, em experimento realizado no estado de Minas Gerais, Brasil.

Em contraste, na Malásia Chandrawathani et al. (2004) obtiveram melhor ganho de peso para os animais tratados (Santa Inês x Corriedale) com o fungo *D. flagrans* em experimento realizado a campo por aproximadamente um ano. Resultados positivos também foram observados por Araújo et al. (2007) ao testarem o fungo *Monacrosporium thaumasium* na espécie caprina em região semi-árida do Ceará. Neste experimento os animais tratados com o fungo tiveram maior ganho de peso e a menor carga parasitária.

Os animais, que eram adultos, mantiveram o peso constante e após o segundo mês, iniciou-se o período de coberturas, portanto ao final deste estudo, as ovelhas estavam no terceiro ou quarto mês de gestação. Vale salientar que no segundo trimestre desta fase as ovelhas ainda receberam ração e silagem de duas a três vezes por semana para que pudessem manter uma melhor condição corporal.

As médias de VG também foram similares nos grupos independentemente do tratamento com o fungo. Resultados semelhantes foram encontrados por Rocha et al. (2007), Chandrawathani et al. (2004) e Fontenot et al. (2003).

Todos os cultivos de fezes realizados uma vez por mês demonstraram crescimento fúngico após 48 horas. Em uma semana as armadilhas produzidas por esses agentes já eram bem visualizadas. Fato este que comprova a sobrevivência do fungo a passagem do trato gastrointestinal.

Os resultados das coproculturas e dos vermes obtidos dos animais traçadores confirmam a predominância de *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus colubriformis* em ovinos da região, como já previamente relatados por Amarante et al. (2004) e Rocha et al. (2008).

Doses maiores (2 g/10 kg de peso vivo) do que as fornecidas por Graminha et al. (2005) e Rocha et al. (2007) foram utilizadas, porém, não tiveram influência na profilaxia das helmintoses. Araújo et al. (2006) utilizou em cabras 20 g/animal e obteve boa redução (59,3%) na produção de larvas de *H. contortus* em coproculturas. Nem mesmo a administração diária realizada no experimento II foi eficaz. Porém, em Sobral – CE, bons resultados foram obtidos mesmo quando os fungos eram administrados apenas uma vez por semana ou quinzenalmente para caprinos (Araújo et al., 2007).

De qualquer forma, trabalhos realizados em outros países demonstraram melhores resultados quando os animais ingeriram diariamente o fungo nematófago (Chandrawathani et al. 2003; Fontenot et al. 2003; Terril et al., 2004).

Em relação à quantidade total de larvas por grupo, somente em cinco colheitas recuperou-se número elevado de larvas (>100 L₃/kg de MS), independentemente do grupo avaliado ou parasito identificado, entretanto nos piquetes pastejados pelo grupo que recebeu o fungo diariamente foi encontrado somente em uma colheita (11/06/07) número elevado de L₃ durante os seis meses experimentais. Para este mesmo grupo também foi observado diferença significativa (P<0,05) na redução de L₃ de *Trichostrongylus* spp. quando comparados aos demais.

No primeiro trimestre (fevereiro a abril) pode-se sugerir que a baixa quantidade recuperada foi devido à diluição das larvas no pasto na época de

chuva (verão), em seguida ao iniciar o segundo trimestre (maio a julho) pode-se atribuir o fato, a época da seca ser propícia para os parasitos permanecerem dentro dos animais com o intuito de sobreviverem às condições adversas do ambiente. Entretanto no mês de julho, último mês de experimento, ocorreu atípico aumento na precipitação pluviométrica, o que pode ter diluído as larvas presentes até então.

Apesar da baixa infestação do pasto, os animais permaneciam com alta carga parasitária, especialmente no segundo trimestre, o que coincide com a fase gestacional das ovelhas, quando aumenta a susceptibilidade à verminose (Rocha et al. 2004).

A exemplo dos experimentos realizados, no Quênia, Maingi et al. (2006) também observou ineficácia do fungo nematófago (*D. flagrans*) em cabras.

Ao avaliar a quantidade de tratamentos realizados com anti-helmíntico, verificou-se que o grupo tratado com o fungo duas vezes na semana recebeu a maior quantidade e que os outros dois grupos, apesar de terem recebido menor quantidade de tratamentos com anti-helmíntico, não diferiram entre si. Já no estudo de Maingi et al. (2006), apenas 10% dos animais do grupo que recebeu o fungo necessitou de tratamento com anti-helmíntico, enquanto que no grupo controle 50% das cabras foram tratadas.

Observou-se que a habilidade predatória dos fungos, assim como a presença de estruturas identificadoras foi constatada nos cultivos de fezes. Este desenvolvimento *in vitro*, porém, aparentemente não correspondeu à atividade similar dos fungos na pastagem. Esta observação também foi relatada por Paraud et al. (2007). Neste caso, os autores sugeriram que alguns animais não consumiram quantidade suficiente para propiciar a distribuição dos fungos no pasto. Esse não foi o caso do presente estudo no qual observou-se o consumo total dos péletes que eram misturados à ração.

Estudos a campo realizados com bovinos demonstraram bons resultados (Larsen et al., 1996; Alves et al., 2003; Araújo et al., 2004). Talvez a ação dos fungos predadores no pasto tenha um melhor desempenho nas fezes bovinas, devido a sua consistência e estrutura, já que conservam o ambiente úmido e protegido por mais tempo, ou seja, é mais favorável ao crescimento e manutenção dos fungos nematófagos. Este fato não ocorre com as fezes dos ovinos que são mais secas. Além disso, os cíbalos fecais que são pequenos

favorecem a exposição solar direta e a conseqüente dessecação, a menos que estejam em uma pastagem alta (Silva, 2007). Esta observação também foi descrita por Gronvold et al. (1999).

Conclui-se que nas condições experimentais avaliadas não houve diferença significativa entre os grupos testados.

Referências

- ALVES, P.H.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; ASSIS, R.C.L.; SARTI, P.; CAMPOS, A.K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.55, p. 568-573. 2003.
- AMARANTE, A.F.T.; BARBOSA, M.A.; OLIVEIRA, M.A.G.; CARMELLO, M.J.; PADOVANI, C.R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 29, p. 31-38, 1992.
- AMARANTE, A.F.T.; CRAIG, T.M.; RAMSEY, W.S.; DAVIS, S.K.; BAZER, F. W. Nematode burdens and cellular responses in the abomasal mucosa and blood of Florida Native, Rambouillet and crossbred lambs. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 80, p. 311-324, 1999.
- AMARANTE, A.F.T.; BRICARELLO, P.A.; ROCHA, R.A.; GENNARI, S.M. Resistance of Santa Ines, Suffolk and Ile de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematodes infections. **Vet. Parasitol.**, v. 120, 91-106, 2004.
- ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.15, n.2, p.76-79, 2006.
- ARAÚJO, J.V.; RODRIGUES, M.L.A.; SILVA, W.W.; VIEIRA, L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. **Pesq. Agropec. Bras.** v.42, n.8, p.000-000, ago., 2007.
- BORAY, J.C.; MARTIN, P.J.; ROUSH, R.T. Resistance of parasites to antiparasitic drugs: The report of a Round Table Conference held at the VIIth International Congress of Parasitology. **Int. Jour. Parasitol.**, v. 4, p. 549-550, 1990.

- CAMPOS, A.K. *Fungos nematófagos no controle de nematóides gastrintestinais de ruminantes*. 2006. 138f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; WALLER, P.J.; LARSEN, M., GILLESPIE, A.T.; ZAHARI, W.M. Biological control of nematode parasites of small ruminants in Malaysia using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.**, v.117, p. 173-183, 2003.
- CHANDRAWATHANI, P.; JAMNAH, O.; ADNAN, M.; WALLER, P.J.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A.T. Field studies on the biological control of nematode parasites of sheep in the tropics, using the microfungus *Duddingtonia flagrans*. **Vet. Parasitol.**, v.120, p.177-187, 2004.
- COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S. A key to nematode destroying fungi. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, v.47, n.1, p. 61, 74, 1964.
- ECHEVARRIA, F.; BORBA, M.F.S.; PINHEIRO, A.C.; WALLER, P.J.; HANSEN, J.W. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasite of sheep in Southern Latin America: Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 62, p. 199-206, 1996.
- FAESSLER, H.; TORGERSON, P.R.; HERTZBERG, H. Failure of *Duddingtonia flagrans* to reduce gastrointestinal nematode infections in dairy ewes. **Vet. Parasitol.**, v.147, p. 96-102, 2007.
- FONTENOT, M.E.; MILLER, J.E.; PEÑA, M.T.; LARSEN, M.; GILLESPIE, A. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydozoospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Vet. Parasitol.**, v. 118, p.203-213, 2003.
- GORDON, H.M.C.L.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **J. Counc. Sci. Ind. Res.**, v.12, p.103-112, 1939.
- GRAMINHA, E.B.N.; MONTEIRO, A.C.; SILVA, H.C.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, n. 9, p. 927-933, 2005.
- GRONVOLD, J.; WOLSTRUP, J.; NANSEN, P.; LARSEN, M.; HENRIKSEN, S.A.; BJORN, H.; KIRCHHEINER, K.; LASSEN, K.; RAWAT, H.; KRISTIANSEN, H.L. Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*

when induced by *Cooperia oncophora* larvae. **J. Helminthol.**, v.73, p.129-136. 1999.

KEITH, R.K. The differentiation of infective larval of some common nematode parasites of cattle. **Aust. J. Zool.**, v. 1, p. 223-35, 1953.

LARSEN, M.; NANSEN, P.; GRONDAHL, C.; THAMSBORG, S.M.; GRONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; MONRAD, J. The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. **Parasitol.**, v.113, p.1-6.1996.

MAINGI, N.; KRECEK, R.C.; VAN BILJON, N. Control of gastrointestinal nematodes in goats on pastures in South Africa using nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* and selective anthelmintic treatments. **Vet. Parasitol.**, v.138, p.328-336, 2006.

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

NIEZEN, J.H.; MILLER, C.M.; ROBERTSON, H.A.; WILSON, S.R., MACKAY, A.D. Effect of topographical aspect and farm system on the population dynamic of *Trichostrongylus* larvae on a hill pasture. **Vet. Parasitol.**, 78, p.37-48, 1998.

PARAUD, C.; PORS, I.; CHARTIER, C. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to control nematode parasites of first-season grazing goats in France. **Vet. Res. Commun.**,v.31, p.305-315, 2007.

ROBERTS, F.H.S.; O'SULLIVAN, S.P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Aus. J. Agric. Res.**,v.1,p.99-102,1950.

ROCHA, R. A.; AMARANTE, A. F. T.; BRICARELLO, P.A. Comparison of the susceptibility of Santa Inês and Ile de France ewes to nematode parasitism around parturition and during lactation. **Small Rumin. Res.**, v.55, p.65-75, 2004.

ROCHA, R. A.; ARAÚJO, J.V.; AMARANTE, A.F.T. Efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against infections by *Haemonchus* and *Trichostrongylus* species in lambs at pasture. **J. Helminthol.**, v.81, p.387-392, 2007.

ROCHA, R.A.; BRESCIANI, K.D.S.; BARROS, T.F.M.; FERNANDES, L.H.; SILVA, M.B.; AMARANTE, A.F.T. Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination. **Small Rumin. Res.**, v.75, p.135-143, 2008.

SAÑUDO, C.; SIERRA, I. *Calidad de la canal en la especie ovina*. Ovino. n.1, p.127-53, 1986.

SILVA, B.F. *Migração vertical das larvas infectantes de Haemonchus contortus em capim braquiária (Brachiaria decumbens)*. 2007. 41f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

TAYLOR, E.L. Technique for the estimation of pasture infestation by *Strongyloid* larvae. **Parasitology.**, v. 31, p. 473-8, 1939.

TERRIL, T.H.; LARSEN, M.; SAMPLES, O.; HUSTED, S.; MILLER, J.H.; KAPLAN, R.M.; GELAYE, S. Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat faeces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. **Vet. Parasitol.**, v.120, p. 285-296, 2004.

ZHANG, K.; LIU, X.; CAO, L.; REN-HEN, G. A new species of *Arthrobotrys* from China. **Mycol. Res.**, v.100, p. 527-530, 1996.

ANEXOS



Anexo 1. Ração misturada com os péletes.



Anexo 2. Secagem dos péletes na estufa.