

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

**Prevalência de ovos de helmintos em fezes de cães e
avaliação de extratos enzimáticos fúngicos sobre ovos
de *Ancylostoma* spp.**

Bianca Delgado Menezes Hofstätter

Bianca Delgado Menezes Hofstätter

Prevalência de ovos de helmintos em fezes de cães e avaliação de extratos
enzimáticos fúngicos sobre ovos de
Ancylostoma spp.

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia da Universidade
Federal de Pelotas, como requisito
parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas
(Área de concentração em
Parasitologia).

Orientadora: Prof^a. Dr^a Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2013

Banca Examinadora:

Profª Drª Guertrud Müller Antunes

Profª Drª Patrícia da Silva Nascente

Profº DrºLeandro Quintana Nizoli

Profª DrªDaniela Isabel Brayer Pereira(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

Aos amores da minha vida meu marido Renato e meu filho Octávio pelo apoio e compreensão de minhas ausências, momentos de humor instável e pelo apoio incondicional.

À minha mãe *in memoriam* pelo exemplo de vida e superação de obstáculos.

Ao meu filhodrasto Marcio por me ensinar a levar a vida com mais descontração.

À minha irmã Adriane pelo companheirismo.

À minha grande amiga Anelise pela descontração, apoio e principalmente pela ajuda nos momentos mais difíceis.

À amiga Mara Helena porque sem ela esse projeto não seria desenvolvido.

À minha orientadora Daniela pela orientação, dedicação, e principalmente pela confiança depositada em mim.

Aos amigos do laboratório dentre tantos, a Beatriz e Julia, sempre prontas para ajudar.

Ao meu amigo Fernando pela ajuda e momentos de descontração.

Às minhas colegas Márcia e Fabiana pelo incentivo, apoio e estudos.

Aos funcionários do Departamento de microbiologia e parasitologia, principalmente a Antonieta e ao seu Enilton, pelo bom humor e carinho de sempre.

Aos professores com os quais aprendi o conhecimento que levarei pela vida inteira.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse projeto.

À CAPES pela bolsa de estudo e recursos financeiros disponibilizados.

RESUMO

Hofstätter, Bianca Delgado Menezes– **Avaliação de diferentes extratos enzimáticos fúngicos sobre ovos de *Ancylostoma* spp.** 2013. 64f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas.

O papel dos animais de companhia como reservatórios de doenças zoonóticas tem sido reconhecido como significativo problema de saúde pública em todo o mundo. *Ancylostoma caninum* e *A. braziliense* são parasitos zoonóticos transmitidos ao homem pelo contato com solos contaminados com ovos e larvas destes ancilostomídeos. As consideráveis prevalências de contaminação ambiental por ovos de *Ancylostoma* spp., aliada as dificuldades de medidas de controle e desinfecção do solo, assim como o surgimento de resistência a terapia anti-helmíntica, evidenciam a necessidade de métodos alternativos que auxiliem no controle destes helmintos. Considerando-se o fato que os nematoides que infectam animais gastam parte do seu ciclo de vida no solo e que os fungos nematófagos, comumente encontrados nesse ecossistema, desenvolvem relações parasíticas ou predatórias com esses parasitos, desempenhando importante papel como inimigos naturais, torna-se viável e desejável o emprego destes agentes no controle eficaz de nematoides. Desta forma, os fungos nematófagos podem ser utilizados em situações em que o ambiente já está contaminado. Os objetivos do presente estudo foram verificar a prevalência de helmintos em fezes de cães coletadas em vias públicas do município de Pelotas, RS, Brasil, e avaliar a atividade ovicida *in vitro* de diferentes preparações de extratos brutos enzimáticos dos isolados fúngicos *Paecilomyces lilacinus* CG193, *P. lilacinus* MICLAB 009, *Trichoderma virens* MICLAB 008 e *Trichoderma harzianum* CG502 sobre ovos de *Ancylostoma* spp. No período de janeiro a março de 2012 foram coletadas aleatoriamente 15 amostras de fezes em 14 pontos do município, totalizando 210 amostras, as quais foram submetidas a exames coproparasitológicos. Os isolados fúngicos avaliados foram cultivados em meio mínimo líquido, em agitação, durante cinco dias a 28°C. As preparações fúngicas consistiram do meio líquido sobrenadante sem filtração (extrato bruto) e filtrado (extrato filtrado), do micélio macerado (macerado bruto) e micélio macerado submetido a filtração (macerado filtrado). Os ovos de *Ancylostoma* spp. foram obtidos a partir de fezes de cães naturalmente parasitados. Os ensaios *in vitro* consistiram em quatro tratamentos e um grupo controle. Em placas de Petri foram vertidos 4mL de cada extrato fúngico e a esse volume foi acrescido 1mL de uma suspensão contendo aproximadamente 10^3 ovos de *Ancylostoma* spp. O grupo controle consistiu de 1mL de suspensão contendo 1000 ovos de *Ancylostoma* spp. acrescido de 4mL de água destilada estéril. Todas as placas foram incubadas a 25°C, durante 24 horas. Cada ensaio foi constituído de cinco repetições. Após esse período, o número total de larvas presente em cada tratamento e no grupo controle foi contado. Os resultados obtidos demonstram que a prevalência geral de contaminação ambiental em vias públicas foi de 57,6% tanto em mono (67,8%) como em multi-infecções (32,2%). *Ancylostoma* spp. ocorreu em maior frequência (88,4%), seguido de *Trichuris vulpis*. (38,8%). Na avaliação da atividade ovicida *in vitro* foi observado que as diferentes formulações fúngicas testadas em cada fungo diferiram ($p < 0,05$) do grupo controle, evidenciando relevante efeito ovicida. Quando calculado o percentual de redução de eclosão dos ovos, evidenciou-se que o maior valor de redução ocorreu quando utilizada a preparação macerado bruto, com percentuais de redução de 68,43% e 47,05% em *P. lilacinus* MICLAB009 e CG193, respectivamente, e 56,43% em *T. harzianum*. Apenas no

isolado *T. virens* o percentual de redução do macerado bruto (52,25%) foi levemente inferior ao macerado filtrado (53,64%). O encontro de 88,4% de fezes positivas para ovos de *Ancylostoma* spp., além de evidenciar as altas taxas de contaminação ambiental no município de Pelotas, alertam para urgente implementação de programas de educação sanitária e de posse responsável dos cães, assim como para a necessidade da adoção de medidas complementares de controle. A avaliação da atividade ovicida mostrou que independente do extrato fúngico testado, as espécies de fungos avaliadas foram eficazes em reduzir a eclodibilidade de ovos de *Ancylostoma* spp. e, portanto, constituem-se em potenciais candidatos para o emprego no controle biológico deste nematoide.

ABSTRACT

Hofstätter, Bianca Delgado Menezes –**Evaluation of different fungal enzyme extract of eggs of ANCYLOSTOMA spp.** 2013.64f Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas.

The role of companion animals or pets as zoonotic disease reservoirs has been recognized as a significant public health hazard throughout the world. *Ancylostoma caninum* and *A. braziliense* are zoonotic parasites which are transmitted to man through contact with soil contaminated with both eggs and larvae of these ancylostomids. The considerable prevalence of environmental contamination by *Ancylostoma* spp. eggs, together with the difficulties of applying control measures and soil disinfection, as well as the development of resistance to anthelmintic therapy, highlights the need for alternative methods to help control these helminths. Taking into account that these nematodes spend part of their life cycle in the soil and that nematophagous fungi usually found in this ecosystem establish parasitic or predatory relationships with these parasites, thus playing an important role as natural enemies, the use of these agents in the effective control of nematodes is viable and desirable. Thus, nematophagous fungi can be used when the environment is already contaminated. This study aimed to determine helminth prevalence in dog feces collected on streets and parks in Pelotas County, Rio Grande do Sul State, Brazil, as well as to evaluate the *in vitro* ovicidal activity of different crude enzymatic extract preparations of CG193 and MICLAB 009 *Paecilomyces lilacinus*, MICLAB 008 *Trichoderma virens* and CG502 *Trichoderma harzianum* fungal isolates on *Ancylostoma* spp. eggs. Fifteen random feces samples were collected from 14 different places in town between January and March 2012, totaling 210 samples, which were submitted to coproparasitological tests. The fungal isolates evaluated were grown in minimum liquid medium under agitation at 28°C for five days. Fungal preparations consisted of supernatant liquid medium without filtration (crude extract), filtered (filtered extract), macerated mycelium (crude macerate), and macerated mycelium submitted to filtration (filtered macerate). *Ancylostoma* spp. eggs were obtained from the feces of naturally parasitized dogs. *In vitro* assays consisted of four treatments and one control group. 4mL of each fungal extract was poured into Petri dishes added with a 1 mL suspension containing approximately 10^3 *Ancylostoma* spp. eggs. The control group consisted of 1mL suspension containing 1000 *Ancylostoma* spp. eggs added with 4mL sterile distilled water. All dishes were incubated at 25° C for 24 hours. Each assay had five replicates. Following, the total number of larvae present in each treatment and in the control group was counted. The results obtained showed that the overall prevalence of environmental contamination on public streets and parks was 57,6%, including both mono (67,8%) and multi (32,2%) infections. *Ancylostoma* spp. was the most frequent occurrence (88,4%), followed by *Trichuris vulpis*. (38,8%). When evaluating the *in vitro* ovicidal activity, the different fungal formulations tested for each fungus were found to differ ($p < 0,05$) from the control group, showing a relevant ovicidal effect. When the egg hatching reduction percentage was calculated, the highest reduction occurred when the crude macerate preparation was used, showing 68,43% and 47,05% MICLAB 009 and CG193 *P. lilacinus* and 56,43% *T. harzianum* reduction percentages, respectively. The crude macerate reduction percentage for the *T. virens* isolate (52,25%) was slightly lower than that for the filtered macerate (53,64%). The finding that 88,4% of the feces were positive for *Ancylostoma* spp. eggs not only reveals the high environmental contamination rates in the municipality of Pelotas, but also warns of the urgent need to implement health education and responsible dog

ownership programs, as well as the need to adopt additional control measures. The evaluation of the ovicidal activity showed that, regardless of the fungal extract tested, the fungus species evaluated were effective in reducing *Ancylostoma* spp. egg hatchability, and thus are potential candidates for the biological control of this nematode. The role of companion animals as reservoirs of zoonotic diseases has been recognized as significant public health problem worldwide.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1- Ocorrência de ovos de helmintos em fezes de cães da área urbana de Pelotas,

Figura 1: Prevalência de ovos de helmintos encontrados em fezes de cães em vias públicas na cidade de Pelotas,RS, Brasil, no período janeiro-março 201229

Figura 2: Pontos coletados e frequência de amostras de fezes positivas para ovos de helmintos no município de Pelotas, RS, Brasil30

LISTA DE TABELAS

Artigo 2-Avaliação *in vitro* de extratos brutos enzimáticos dos fungos *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens* sobre ovos de *Ancylostoma* spp

Tabela 1: Média de Contagem de larvas e percentual de redução de eclosão de ovos de *Ancylostoma* spp. em 24 horas submetidos ao tratamento com diferentes extratos fúngicos de *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma virens* e *Trichoderma harzianum*.44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	<i>Ancylostoma</i> spp.....	13
2.1.1	Ciclo Biológico	14
2.1.2	Ancilostomose em cães.....	15
2.1.3	Larva <i>migrans</i> cutânea (LMC).....	15
2.2	Controle Biológico	17
2.2.1	Fungos nematófagos	18
3	ARTIGO 1: Ocorrência de ovos de helmintos em fezes de cães da área urbana de Pelotas, RS, Brasil	24
3.1	Resumo	26
3.2	Abstract.....	26
3.3	Introdução.....	27
3.4	Materiais e Métodos	28
3.5	Resultados	28
3.6	Discussão	30
3.7	Conclusão	32
3.8	Agradecimentos	32
3.9	Referências	33
4	ARTIGO 2: Avaliação <i>in vitro</i> de extratos brutos enzimáticos dos fungos <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> e <i>Trichoderma virens</i> sobre ovos <i>Ancylostoma</i>	35
4.1	Resumo	37
4.2	Abstract:	37
4.3	Introdução.....	38
4.4	Materiais e Métodos	40
4.4.1	Culturas fúngicas	40
4.4.2	Produção dos extratos fúngicos	40
4.4.3	Amostras fecais.....	40
4.4.4	Ensaio experimentais.....	41
4.4.5	Análise estatística	41
4.5	Resultados	43
4.6	Discussão	45
4.7	Conclusão	48
4.8	Agradecimentos:	48
4.9	Referências	48
5	CONCLUSÃO	53
6	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

Os helmintos como agentes causadores de doenças nos cães, ocupam uma posição relevante na saúde pública não só pela ação espoliativa em seus hospedeiros, como também, pelo fato de que algumas dessas helmintoses constituem-se em zoonoses (ARAÚJO, 2006). Dentre as parasitoses destacam-se as infecções causadas por *Toxocara canis* (larva *migrans* visceral), *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* (larva *migrans* cutânea), *Echinococcus granulosus* (cisto hidático), *Trichuris vulpis* e *Dipylidium caninum* (CORTÊS et al., 1988, ARAÚJO, 2006). Dos nematódeos parasitos de cães, *Ancylostoma* spp. e *T. canis* certamente são os mais ubíquos e prevalentes. A grande tolerância dos estágios de vida livre às diferentes condições ambientais é a mais provável explicação para a ampla distribuição geográfica desses parasitos (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007).

No Brasil, helmintoses intestinais provocadas por parasitos transmitidos por cães, vem sendo reconhecidas como um grande problema de saúde pública (CÔRTEZ, 1988). Nesse sentido, estudos sobre a ocorrência de *Ancylostoma* spp. em diferentes regiões do Brasil, demonstram prevalências que variam de 23,6% a 71,3% (GENNARI et al., 1999; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002; SCAINI et al., 2003; BLAZIUS et al., 2005; ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006, MORO et al., 2008). Similarmente, em países como Argentina, Venezuela, Nigéria e China observa-se prevalências de ancilostomídeos estão em torno de 37,8% (ANDRESIUK et al., 2003, RAMIREZ-BARRIOS, 2004; RUBEL; WISNIVESKY, 2005; SOMMERFELT et al., 2006; WANG et al., 2006; SOWERMIMO, 2009). Estes dados demonstram que, embora a ancilostomíase seja uma parasitose bem conhecida, problemas no controle do parasito são evidentes e medidas de prevenção são necessárias.

Os cães errantes, pelo fato de serem excluídos dos programas de controle de verminoses e por terem livre acesso às áreas públicas, assumem papel

epidemiológico importante na contaminação do ambiente, contribuindo de maneira definitiva na manutenção das formas infectantes do parasito no ambiente (CAPUANO; ROCHA, 2006, LABRUNA et al., 2006). Por outro lado, essa contaminação é incrementada por cães domiciliados que são levados para passear e cujos donos não têm como hábito o recolhimento das fezes (LABRUNA et al., 2006).

O uso de anti-helmínticos em cães e gatos tem sido o método usual para prevenir a contaminação ambiental por ovos e larvas de *Ancylostoma* spp. (CARVALHO et al., 2009). Todavia, os programas de controle parasitários devem ser baseados em informações sobre a disposição de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos e viabilidade larvar (CORDEIRO, 2008). Desta forma, medidas preventivas podem ser tomadas para diminuir a frequência dos tratamentos químicos e quando associadas a outras formas de controle podem reduzir a dependência de anti-helmínticos (STROMBERG, 1997; BARGER, 1999; STROMBERG e AVERBECK, 1999).

Nos últimos anos é evidente o aumento expressivo no número de relatos de cepas de nematoides resistentes aos diversos fármacos disponíveis. Além disso, a crescente tendência do mercado consumidor por produtos livres de resíduos químicos que não causem danos ao meio ambiente tem incrementado a procura por medidas alternativas de controle das parasitoses em animais (SUAREZ, 2002; GROONVOLD et al., 1996). Esses fatos têm influenciado o desenvolvimento de pesquisas que visam à identificação de agentes biológicos com ação antagonista sobre as fases de vida livre dos nematoides (GIROTO et al., 2008).

Vários agentes são relatados como antagonistas naturais dos helmintos (MOTA et al., 2003). Destes, os fungos nematófagos constituem-se nos principais antagonistas naturais dos nematoides nos solos contaminados. Estes fungos têm demonstrado bons resultados como agentes de biocontrole no combate a diversas espécies de parasitos de animais domésticos, podendo ser encontrados nos ambientes mais distintos, sendo capazes de apreender e digerir as formas livres dos nematoides (LARSEN, 1999; KERRY, 2000; RIBEIRO, 2003).

Embora a maioria das pesquisas desenvolvidas avalie a ação predadora de fungos nematófagos sobre larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp. (MACIEL et al., 2009; 2010), Braga et al. (2011b) evidenciaram a atividade ovicida de extrato

enzimático do fungo oportunista *Pochonia clamydosporia* sobre ovos desta espécie de nematoide. Mesmo que esses autores não tenham determinado a purificação e identificação enzimática do extrato utilizado, acreditam que a ação ovicida observada foi decorrente da presença de proteases produzidas pelo fungo e sugerem o seu emprego no controle de ovos de geo-helminthos gastrointestinais que eclodem em curto intervalo de tempo no ambiente.

Dado ao estreito convívio dos cães com o homem torna-se fundamental o controle adequado da endoparasitose canina, com o objetivo de diminuir a contaminação do meio ambiente pelas formas infectantes destes parasitos e, conseqüentemente, minimizar os riscos de infecção humana e canina (ROBERTSON et al., 2000). Desta forma, o controle biológico com fungos nematófagos poderá ser utilizado como método eficaz e complementar ao controle químico, uma vez que reduz satisfatoriamente as formas pré-parasitárias do nematoide alvo no ambiente (MACIEL, 2009).

Considerando os dados que indicam altos percentuais de contaminação ambiental por *Ancylostoma* spp. em ambientes urbanos e a promissora atuação de fungos nematófagos sobre nematoides, elaborou-se o presente estudo, cujos objetivos são:

1. Verificar a prevalência de ovos de helmintos veiculados em fezes de cães encontradas em vias públicas da cidade de Pelotas/RS;
2. Avaliar a atividade ovicida *in vitro* de diferentes extratos enzimáticos dos fungos *Trichoderma virens* (isolado MICLAB 008), *T. harzianum* (isolado CG502), *Paecilomyces lilacinus* (isolado CG193) e *P. lilacinus* (isolado MICLAB009), sobre a eclodibilidade de ovos de *Ancylostoma* spp.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Ancylostoma* spp.

Ancylostoma está classificado no Reino Metazoa, Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida, família *Ancylostomatidae* (SOULSBY, 1982).

A família *Ancylostomatidae* é caracterizada por nematoides que apresentam capsula bucal bem desenvolvida, armada com dentes ou lâminas quitinosas cortantes em sua margem ventral. Parasitos desta família apresentam um nítido dimorfismo sexual, sendo os machos possuidores de uma bolsa copuladora bem desenvolvida na região posterior. A maioria das espécies parasita o intestino delgado, alimentando-se do sangue de vários hospedeiros mamíferos, incluindo o homem e excluindo os equinos (SOULSBY, 1982).

Dentre os nematoides que parasitam o intestino delgado de cães destacam-se *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense*.

Ancylostoma caninum possui três pares de dentes na margem ventral da capsula bucal. No fundo desta estrutura há um par de dentes triangulares dorsais e um par de dentes ventro-laterais. Como todos os parasitos desta família, esta espécie apresenta dimorfismo sexual, sendo os machos possuidores de uma bolsa copuladora bem desenvolvida na região posterior (SOULSBY, 1982), gubernáculo e espículas que variam de 0,73 a 0,96 mm de comprimento. As fêmeas apresentam a abertura do aparelho genital localizada próxima à interface do segundo com o terceiro terço do corpo e os ovários encontram-se dispostos enrolados em torno do tubo digestivo. O comprimento dos machos varia de 9 a 13 mm e o das fêmeas de 14 a 20 mm. As fêmeas após a cópula realizam a oviposição de milhares de ovos por dia. Estes ovos são elípticos, de casca fina, medem 55-77 µm de comprimento por 34-44,7 µm de largura e são eliminados com um embrião contendo seis células (FORTES, 1997). Os ovos dos parasitos do filo Nematoda podem possuir de uma a

três camadas sendo a interna lipoproteica a intermediária quitinosa e a externa vitelínica (HOMERO, 1984).

Ancylostoma. braziliense é muito semelhante ao *A. caninum* podendo ser diferenciado pela capsula bucal que apresenta um par de dentes laterais bem desenvolvidos e na porção média um par de dentes rudimentares e também através da bolsa copuladora. O comprimento dos machos varia de 5 a 7,5 mm e das fêmeas de 6,5 a 10,5 mm (FORTES, 1997).

2.1.1 Ciclo Biológico

Ambas as espécies de *Ancylostoma* apresentam o ciclo biológico similar. Os vermes adultos localizam-se principalmente no intestino delgado dos hospedeiros definitivos (cães), fixados à mucosa intestinal através de suas capsulas bucais. As fêmeas, após a cópula, ovipõem milhares de ovos por dia. Os ovos são liberados para o meio exterior juntamente com as fezes dos hospedeiros. Estes, em condições favoráveis de oxigenação, umidade e temperatura originam, num período de 24 a 48 horas, uma larva rabditóide de primeiro estágio conhecida como larva L1. A larva L1 ao eclodir do ovo alimenta-se de matéria orgânica e micro-organismos e sofre posterior transformação em dois estádios larvais: larva L2 (rabditóide) e larva L3 (filaríóide e infectante). A larva filarióide não se alimenta e apresenta maior resistência que as demais formas, sendo capaz de sobreviver no ambiente por vários dias (FORTES 1997).

A infecção dos hospedeiros ocorre por via passiva ou ativa, sendo ambas as bem sucedidas (URQUHART, 1998).

Na infecção ativa por via cutânea, as larvas L3 atravessam a pele e atingem a circulação sanguínea ou linfática. Através dela migram ao coração direito e pulmões, perfuram os capilares dos alvéolos pulmonares e atingem a traqueia, laringe e faringe. Na faringe as larvas podem ser deglutidas ou expectoradas. Aquelas que forem deglutidas alcançam o trato digestório e penetram nas glândulas gástricas ou nas glândulas de Lieberkühn do intestino delgado. Após um curto período, migram para a luz do intestino onde mudam para larva L4, que atinge a maturidade 15 a 26 dias após a infecção. A evolução da capsula bucal se completa, surgindo o quinto estágio L5 (ARAÚJO, 1988; FORTES, 1997).

Quando a infecção ocorre por ingestão (infecção passiva), as larvas podem penetrar na mucosa bucal e sofrer a migração pulmonar já descrita, ou passar diretamente ao intestino e se desenvolver até L5 (FORTES, 1997).

Em cadelas infectadas uma parte das L3 de *A. caninum* que atingem os pulmões migra para os músculos esqueléticos permanecendo inativas até a cadela estar prenhe. No parto ocorre a reativação das larvas, que atravessam a barreira placentária e migram para a glândula mamária (RIBEIRO, 2004).

A eliminação de L3 no leite ocorre por um período de pelo menos três semanas após o parto. Os filhotes infectados passam a desenvolver anemia grave em sua segunda ou terceira semana de vida. A fêmea uma única vez infectada pode transmitir a doença via transmamária ao menos por três ninhadas. Esta reativação de larvas no hospedeiro definitivo também pode ocorrer em casos de estresse, enfermidades graves ou uso de grandes e repetidas doses de corticosteroides (URQUHART, 1998).

2.1.2 Ancilostomose em cães

Esta enfermidade se caracteriza por anemia hemorrágica aguda ou crônica. A perda de sangue começa aproximadamente no oitavo dia de infecção. Nesta fase o adulto imaturo desenvolve as cápsulas com dentes, o que lhe permite a fixação na mucosa e ingestão de grande quantidade de sangue (URQUHART, 1998).

Segundo Ribeiro (2004) o quadro clínico é mais severo em cães jovens, sendo caracterizado por diarreia sanguinolenta e anemia. Os animais parasitados tornam-se anoréxicos, desidratados, deprimidos e menos ativos. Em alguns casos os filhotes podem vir ao óbito.

Em infecções mais leves, comuns em cães mais velhos, a anemia não é tão grave. Entretanto, em infecções prolongadas o cão pode se tornar deficiente de ferro e desenvolver anemia hipocrômica e microcítica. Em cães que já desenvolveram imunidade podem ocorrer reações cutâneas de eczema úmido e ulcerações nos locais de infecção percutânea (URQUHART, 1998).

2.1.3 Larva *migrans* cutânea (LMC)

Além da ancilostomose, o *Ancylostoma* spp. pode causar a síndrome da larva *migrans* cutânea (LMC), também conhecida como dermatite serpiginosa linear ou

dermatite pruriginosa. O contato com solo contaminado por fezes de cães e gatos infectados com ancilostomídeos pode levar ao desenvolvimento da enfermidade, que decorre da migração de larvas nos tecidos subcutâneos de hospedeiros não habituais (ARAUJO, 2000; ROBERTSON et al., 2000). A doença apresenta distribuição mundial, porém a maior frequência é observada em regiões de clima tropical e subtropical (NEVES, 2007). Mesmo sendo uma parasitose ubiquitária, a maior prevalência é relatada em regiões menos favorecidas de países em desenvolvimento, como Brasil e Índia. A enfermidade ocorre esporadicamente em países desenvolvidos relatada em turistas que visitaram os trópicos (HEUKELBACH et al., 2004; JACKSON et al., 2006).

A larva de terceiro estágio dos ancilostomídeos penetra ativamente na pele do homem e migra pelo tecido subcutâneo durante semanas ou meses. A medida que as larvas progridem ocasionam reações inflamatórias caracterizadas por prurido intenso e erupções observadas mais frequentemente nos membros inferiores, principalmente pés, nádegas e mãos (ALMEIDA, 2007) e menos comumente em outras regiões como couro cabeludo (GUIMARÃES et al., 1999). O padrão de lesão é conhecido por bicho geográfico ou bicho das praias (NEVES, 2007).

Embora não ocorra distinção quanto à raça, sexo ou idade para a síndrome de LMC, seu potencial zoonótico é maior para crianças, uma vez que são mais expostas por brincarem em solo de locais que podem estar contaminados, como praças e caixas de areia de parques de recreação (ACHA; SZYFRES, 1986). Nesse contexto, dados de levantamento que abordam os índices de contaminação ambiental por *Ancylostoma* spp. demonstram que em diferentes regiões do Brasil (GENNARI et al., 1999; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2002, BAZIUS et al., 2002; SCAINI et al., 2003; CAPUANO; ROCHA, 2006; MORO et al., 2008) e do mundo (ANDRESIUK et al., 2003; RAMIREZ-BARRIOS, 2004; RUBEL; WISNIVESKY, 2005; SOMMERFELT et al., 2006; WANG et al., 2006; SOWERMIMO, 2009) as taxas de contaminação dos ambientes são elevadas.

No Brasil não há dados exatos sobre a prevalência de LMC e os poucos dados disponíveis se restringem ao relato de casos com apresentação clínica excepcional (VELHO et al., 2003) ou surtos em grupos populacionais específicos como escolas e creches (ARAÚJO et al., 2000).

Alternativamente as larvas de terceiro estágio podem ser ingeridas e ao atingirem o intestino migram através das vísceras provocando a larva *migrans*

visceral (LMV). Também podem ganhar acesso à circulação sanguínea, sendo transportadas aos pulmões. Assim, podem ser eliminadas em escarros ou deglutidas completando o ciclo (NEVES, 2007).

2.2 Controle Biológico

Como regra geral, todas as espécies de animais são reguladas por outros organismos vivos (antagonistas) que ocorrem naturalmente e não estão sob a manipulação pelo homem (GRONVOLD et al., 1996). Assim, o termo controle biológico se aplica à utilização de antagonistas naturais disponíveis no ambiente, cujo objetivo é reduzir a um limiar subclínico e economicamente aceitável a população de um agente causador de perdas produtivas à atividade pecuária ou agrícola (GRONVOLD et al., 1996). Na prática, o controle biológico não atua sobre estágios internos de parasitos, contudo, concentra suas ações sobre os hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores e estágios larvais de vida livre presentes nas fezes e pastagens, diminuindo a fonte de infecção para os hospedeiros definitivos. Além disso, causam menores efeitos negativos no ambiente que os métodos químicos (Graminha et al., 2001; Mota et al., 2003), uma vez que não deixam resíduos e não são tóxicos aos animais e ao ambiente (FREITAS et al., 2006, NAIME, 2009). Desta forma, suas vantagens incluem: fácil aplicação, boa dispersão ambiental, menor custo, efeito prolongado (poderá afetar populações subsequentes de parasitos), diminuição do aparecimento de resistência e possibilidade de associação com outros métodos de controle (ARAÚJO et al., 2006a; FREITAS et al., 2006; BRAGA et al., 2008).

Comumente o controle de nematoides é realizado por meio da utilização de produtos químicos nos hospedeiros. Entretanto, a ocorrência de resistência dos parasitos aos princípios ativos, o alto custo dos fármacos e a possibilidade de ocorrência de resíduos químicos no ambiente e nos produtos animais tem estimulado o desenvolvimento de métodos alternativos e integrados de controle das parasitoses (GRAMINHA et al., 2001).

A utilização de agentes biológicos com atuação sobre ovos e larvas de nematoides tem sido intensificada nos últimos anos, tendo por finalidade o sinergismo com o controle químico (BRAGA et al., 2008). Esses agentes constituem

alternativa viável para reduzir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo, sem trazer danos ao meio ambiente (MELLO et al., 2007).

Na literatura cita-se uma grande abundância de antagonistas naturais dos helmintos, entre eles protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos. Destes, os fungos nematófagos têm demonstrando bons resultados como agentes de biocontrole, podendo ser encontrados nos ambientes mais distintos (KERRY, 2000; MOTA et al., 2003; RIBEIRO, 2003). Esses fungos vivem na matéria orgânica do solo, onde desenvolvem relações parasíticas ou predatórias com os nematoides, sendo classificados como ovicidas, endoparasitas e predadores (GRAMINHA et al., 2005). Os mesmos se comportam como antagonistas naturais promovendo a captura, a morte ou mesmo a destruição do parasito (BRAGA et al., 2008).

A utilização de fungos no biocontrole de nematoides auxilia o controle químico pelo fato de menores quantidades de ovos e larvas se encontrarem infectando o ambiente, diminuindo assim a infecção dos animais (ARAÚJO, 1996). Desta forma, o agente químico atua sobre os helmintos adultos que estão parasitando o animal e o agente biológico proporciona maior e abrangente atuação sobre as formas infectantes presentes nas fezes.

2.2.1 Fungos nematófagos

Fungos antagonistas de nematoides constituem uma grande variedade de microrganismos que estabelecem relações predadoras, parasitas e bioquímicas com estes organismos (MANKAU, 1980), estando catalogados em mais de 150 espécies e classificados no filo Ascomycota (MOTA et al., 2003; ARAÚJO, 2008).

Embora muitos fungos predadores tenham sido isolados e identificados durante o fim do século XIX, somente em 2003, Mota et al., relataram informações sobre as características ecológicas, nutricionais e fisiológicas destes organismos. Estes fungos têm como principal fonte de nutrientes os nematoides, sendo encontrados em todo o mundo em diferentes habitats ricos em matéria orgânica (FERNANDES, 2011).

Conforme a estratégia e o modo de ação sobre os nematoides, os fungos podem ser divididos em predadores, endoparasitas e oportunistas (ovicidas) (KERRY, 2000; MOTA et al., 2003; RIBEIRO, 2003).

Os fungos predadores formam estruturas especiais de captura, adesivas ou não, sobre o micélio e através delas os nematoides são eficientemente capturados.

Se constituem em estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas. O aprisionamento à armadilha é seguido pela penetração das hifas na cutícula do nematoide. Dentro do mesmo, ocorre o crescimento das hifas e a digestão dos conteúdos internos. A formação de armadilhas é uma resposta dos fungos predadores à presença e migração de nematoides ou de substâncias deles derivadas (GRONVOLD et al., 1996). Nesse grupo de fungos destacam-se os gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium*. A espécie *D. flagrans*, considerada a mais promissora, devido à abundância de clamidósporos, é também a mais estudada no controle das helmintoses dos animais domésticos. Possui ação predatória formando um tipo de armadilha que se caracteriza por um sistema de hifas adesivas simples. Além disso, a presença de conídios e clamidósporos, intercalados por hifas maduras facilita a sua manutenção no ambiente e permite seu uso como agente biológico (BRAGA et al., 2008).

Dimander et al., (2003) e Araújo et al., (2004) mencionaram os gêneros predadores *Duddingtonia* e *Monacrosporium* como os mais estudados e utilizados no controle biológico de helmintos. Inúmeras pesquisas têm demonstrado resultados promissores com o uso desses fungos no controle de helmintos em animais (WALLER et al., 1994; MELO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2004a; BRAGA et al., 2007). Dentre os helmintos, larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. têm sido eficientemente predadas quando expostas aos fungos *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* em experimentos *in vitro* e *in vivo* (MACIEL et al., 2006, 2010, FERNANDES, 2011).

De acordo com Mota et al., (2003), um segundo grupo de fungos, denominado fungos endoparasitas, é capaz de infectar os nematoides através de esporos, que uma vez ingeridos desenvolvem hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematoide. Grande parte dos fungos endoparasitas são parasitos obrigatórios e por isso possuem uma faixa restrita de hospedeiros. Devido a esse fato, a sua utilização e produção *in vitro* é menor. Além disso, não possuem capacidade de crescimento no solo, o que torna impossível ser proposto como inóculo para o controle ambiental de nematoides (RIBEIRO, 2003).

Por último, os fungos oportunistas desempenham sua função ovicida pela penetração das hifas à casca do ovo, através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e

atravessa a camada adjacente quitínica e lipídica (BRAGA et al., 2008). Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina se torna vacuolizada e a camada de lipídios se torna dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes fungos colonizam o conteúdo do ovo ou a larva em desenvolvimento no seu interior (MORGAN-JONES; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 1988).

De acordo com Braga et al. (2008), as espécies de fungos ovicidas ou oportunistas têm sido utilizadas com sucesso no controle *in vitro* de ovos de helmintos parasitos gastrintestinais de animais, podendo ser potenciais agentes de controle biológico de geohelmintos, principalmente pelo fato de serem saprofíticos (não dependem da presença do nematóide) e por seu fácil crescimento *in vitro* (NUNES et al., 2010). O efeito que o fungo causa sobre o ovo é classificado segundo os parâmetros estabelecidos por Lysek (1978), os quais são: tipo 1, efeito fisiológico, bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas são observadas aderidas à casca; tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração de hifas através da casca; e tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. Um fungo é caracterizado como ovicida se durante o processo de infecção dos ovos apresentar o efeito do tipo 3 (BRAGA et al., 2007).

Dentre os fungos oportunistas destaca-se a atividade ovicida *in vitro* as espécies, *Pochonia clamydospora* e *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*, *Ascaris summ*, *Eurytrema coelomaticum* e *Toxocara canis* (BRAGA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2008; BRAGA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009).

Estudos sugerem que o mecanismo de infecção dos fungos ovicidas pode ser mecânico, enzimático ou ambos (BONANTS et al., 1995).

Segundo Dackman et al. (1989), a habilidade de uma espécie para parasitar ovos está diretamente relacionada com sua atividade enzimática lítica, podendo ser de natureza quitinolítica e proteolítica. Já, Basualdo et al. (2000) acreditam que o mecanismo de atuação desses fungos esteja baseado na decomposição enzimática e biossíntese de toxinas. Segundo Araújo et al. (2004a), a hifa penetra no ovo através de pequenos poros existentes na camada vitelínica da casca, provocando com isso uma alteração na sua permeabilidade e, em consequência disso, uma expansão em seu volume com colonização do conteúdo do ovo.

Estudos ultraestruturais em ovos e juvenis de *Meloidogyne arenaria* demonstraram que o fungo ovicida penetra no ovo de forma direta, através de pequenos poros (aberturas) existentes na sua camada vitelínica (FREIRE; BRIDGE, 1985). Estas aberturas são produzidas pela pressão das hifas intumescidas, uma vez que em ovos de helmintos não existem aberturas naturais.

A espécie *P. chlamydosporia* produz enzimas extracelulares do tipo proteases que desempenham um importante papel na infecção e destruição dos ovos de geohelmintos (ARAÚJO et al., 2009). De maneira similar, foi comprovado que o fungo *P. lilacinus* foi capaz de degradar a casca do ovo do fitonematoide *Meloidogyne* spp. por meio de sua ação enzimática (DUNN et al., 1982).

Ciarmela et al. (2000) demonstraram o quão promissor é esse grupo de fungos no controle biológico de helmintos, principalmente porque reduzem em cerca de 70 a 90% os níveis de ovos viáveis no solo. Todavia, muitas vezes o que impede sua plena eficácia é a estratégia desenvolvida pelos parasitos. A maioria desses helmintos parasitos gastrintestinais produz ovos que rapidamente originam larvas, o que dificulta o processo de interação com os ovos (JANSSON; NORDBRINGHERTZ, 1988).

Paecylomyces lilacinus (Thom, 1910) é um anamorfo de ascomiceto da ordem Eurotiales, encontrado em diferentes regiões do mundo, com maior frequência em regiões quentes (FREITAS et al., 1999). No Brasil, existem registros de *P. lilacinus* em diferentes tipos de hospedeiros e solo, cultivados ou não, em profundidades variáveis de 0-40cm (CARNEIRO, 1986). Este fungo tem se mostrado efetivo no biocontrole de espécies de *Meloidogyne*. (KERRY, 1990) e sua ação caracteriza-se por penetrar nos ovos dos nematoides destruindo o embrião (DUNN et al., 1982).

Bonants et al. (1995) realizaram um trabalho onde foi caracterizada e purificada uma protease de serina de *P. lilacinus* que age sobre ovos do fitonematóide *Meloidogyne hapla*. Neste estudo ficou demonstrado que quando os ovos de *M. hapla* eram infectados pelo fungo a casca dos mesmos era parcialmente dissolvida formando vacúolos, o que sugere ação de enzimas líticas na patogênese de infecção pelo fungo.

As espécies de *Trichoderma* correspondem a fase anamórfica do gênero *Hypocrea*, filo *Ascomycota* (AGRIOS, 1997). Estes fungos são de grande importância econômica para a agricultura, uma vez que são capazes de atuarem como agentes

de controle de doenças de várias plantas cultivadas, promotores de crescimento e indutores de resistência de plantas às doenças (MOHAMED; HAGGAG, 2006).

Trichoderma harzianum é um fungo de solo que atua impedindo o desenvolvimento de fitopatógenos através de um ou mais mecanismos, que são basicamente a antibiose (antibióticos, toxinas e enzimas que afetam o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos), parasitismo e competição (LOHMANN et al., 2009). É um agente de controle biológico eficaz sobre *Fusarium* spp. em várias culturas como tomate, algodão, melão e trigo (SIVAN, 1987; DANTOFF et al., 1995; SIVAN; CHET, 1996).

De La Cruz et al. (1992) descreveram pela primeira vez a caracterização e purificação de três quitinases de *T. harzianum* demonstrando a atividade lítica destas enzimas no antagonismo de fungos patogênicos. Estudos realizados por Inbar e Chet, (1995) e Schickler et al. (1998) demonstraram que a produção de quitinase por *T. harzianum* pode ser induzida no momento do reconhecimento do hospedeiro.

Trichoderma virens, previamente *Gliocladium virens*, possui grande arsenal de mecanismos de ação e produção de compostos antimicrobianos que permitem ação contra diferentes patógenos e o controle de várias doenças de plantas (HOWELL, 2006).

A contribuição de enzimas quitinolíticas para a atividade de *T. virens* é menos compreendida, todavia, estas enzimas são consideradas como componentes-chave de controle biológico realizado por espécies de *Trichoderma*. (ROMÃO-DUMARESQ et al., 2012).

Embora o mecanismo exato da patogenicidade dos fungos nematófagos contra nematoides não esteja completamente elucidado, observa-se que maior atenção tem sido dispensada à compreensão dos aspectos de infecção e identificação de fatores de virulência dos fungos nematófagos, dentre eles as enzimas extracelulares, incluindo as proteases de serina, quitinases e collagenases (YANG et al., 2007).

Evidências demonstram que enzimas hidrolíticas extracelulares (proteases de serina, quitinases e collagenases) podem estar envolvidas na penetração tanto da casca do ovo, como na cutícula do nematoide. Através de microscopia eletrônica foi evidenciado que a ação das proteases de serina provocou a esfoliação das camadas externas do ovo ou da cutícula dos nematoides. Desta forma, a ocorrência de falhas nestas estruturas, após o tratamento com proteases de serina, comprovou que

essas enzimas podem destruir a integridade tanto da casca do ovo, quanto da cutícula do nematoide, auxiliando na penetração dos fungos (HUANG, 2004).

Pesquisas demonstraram que proteases e quitinases quando aplicadas individualmente ou em combinação alteram drasticamente as estruturas da casca do ovo de nematoides. Além disso, estudos ultraestruturais evidenciam a produção de quitinases em fungos patogênicos (TIKHNOV et al., 2002., KHAN et al., 2004). Ovos tratados com quitinase a camada vitelínica se divide e perde a integridade, o que leva ao desenvolvimento de vacúolos na camada de quitina (KHAN, 2004).

Estudos sobre a produção de collagenases por fungos nematófagos ainda são raros (SCHENCK et al., 1980; TOSI et al., 2001). Como estas enzimas catalisam a hidrólise de colágeno (MACLENNAN et al., 1953) acredita-se que podem desempenhar importante função na infecção por parasitos, uma vez que o colágeno é o principal componente estrutural da cutícula dos nematoides.

Na última década, alguns estudos têm avaliado a atividade enzimática de extratos de fungos nematófagos sobre larvas e ovos de helmintos gastrointestinais de animais domésticos. Nesse sentido, Braga et al. (2011a) obtiveram 71,3% de redução de L1 de *Angiostrongylus vasorum* utilizando extrato enzimático do fungo *Duddigtonia flagrans*. Quando avaliada a atividade enzimática de uma serina protease proveniente de *Monacrosporium thaumasium* a redução do número de larvas desse mesmo nematoide foi de 23,9% (SOARES et al., 2012). Já a ação de extratos enzimáticos do fungo *P. clamydosporia* sobre ovos de *ciastostomíneos* (BRAGA et al., 2010) e *Ancylostoma* spp. (BRAGA et al., 2011b) reduziu em 72,8% e 76,8%, respectivamente, a eclodibilidade dos ovos em 24 horas.

Estas informações fornecem novas abordagens, estimulam novas linhas de estudo e incrementam a eficácia dos fungos nematófagos no controle biológico de helmintos (YANG et al., 2007).

3 ARTIGO 1: Ocorrência de ovos de helmintos em fezes de cães da área urbana de Pelotas, RS, Brasil

Submetido a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

**Ocorrência de ovos de helmintos em fezes de cães da área urbana de Pelotas,
RS, Brasil**

Occurrence of helminth eggs in dog feces of urban area of Pelotas, RS, Brazil

Bianca Delgado Menezes Hofstätter¹, Anelise Oliveira da Silva Fonseca², Fernando de Souza Maia Filho¹, Sônia de Avila Botton³, Daniela Isabel Brayer Pereira^{1*}

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

2Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPeI, RS, Brasil.

3Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

a*Autor para correspondência: Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. CEP: 96010-900. Brasil. E-mail: danielabrayer@gmail.com.

3.1 Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência de ovos helmintos em fezes de cães coletadas em vias públicas de Pelotas, RS. No período de janeiro a março de 2012 foram coletadas aleatoriamente 15 amostras em 14 pontos da cidade, totalizando 210 amostras, submetidas a exames coproparasitológicos. A prevalência geral foi 57,6% tanto em mono (67,8%) como em multi-infecções (32,2%). *Ancylostoma* spp. apareceu em maior frequência (88,4%), seguido de *Trichuris vulpis* (38,8%). As infecções enteroparasitárias em cães enfatizam o risco de zoonoses e a necessidade de ações educativas para conscientização da população e adoção de medidas de controle e prevenção.

Palavras-chave: cães, *Ancylostoma* spp., zoonoses, nematoide

3.2 Abstract

The aim of this study was to determine the prevalence of helminthes in dog feces collected in public areas in Pelotas, RS, Brazil. From January to March of 2012, 15 samples were randomly collected from each of 14 locations in this county. A total of 210 samples were submitted to fecal examinations. The overall prevalence was 57.6%, including both single (67.8%) and multi-infections (32.2%). *Ancylostoma* spp. had the highest frequency (88.4%), followed by *Trichuris vulpis*. (38.8%). The infection of dogs with intestinal parasites emphasizes the potential risk of zoonotic diseases and the need for educational, control and prevention programs for at-risk populations. Keywords: dogs, *Ancylostoma* spp., zoonoses, nematodes

3.3 Introdução

Os cães, como animais de companhia, desempenham relevante papel na vida do homem, uma vez que proporcionam inúmeros benefícios de natureza psicológica e social. Por outro lado, podem constituir risco à saúde humana, por transmitir agentes infecciosos como parasitos, bactérias, fungos e vírus (ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006).

O papel do cão como um hospedeiro definitivo de várias parasitoses com potencial zoonótico tem sido amplamente estudado e reconhecido como importante problema de saúde pública. Dentre as parasitoses destacam-se as infecções causadas por *Toxocara canis* (larva *migrans* visceral), *Ancylostoma caninum* e *Ancylostoma braziliense* (larva *migrans* cutânea), *Echinococcus granulosus* (cisto hidático), *Trichuris vulpis* e *Dipylidium caninum* (GUIMARÃES et al., 2005; ARAÚJO, 2006; LABRUNA et al., 2006).

O aumento da população de cães de estimação, assim como de cães errantes, é o fator determinante da contaminação ambiental por ovos e larvas de parasitos patogênicos em centros urbanos (CAPUANO; ROCHA, 2006). Os cães errantes, pelo fato de serem excluídos dos programas de controle de verminoses e por terem livre acesso a áreas públicas, assumem papel epidemiológico importante na contaminação do ambiente. Por outro lado, essa contaminação é incrementada por cães domiciliados que são levados para passear e cujos donos não têm como hábito o recolhimento das fezes (CAPUANO; ROCHA, 2006; LABRUNA et al., 2006). Estudos avaliando a contaminação ambiental e/ou a infecção de parasitos intestinais em cães domiciliados e errantes em diversas cidades do Brasil, demonstram que os animais encontram-se parasitados por várias espécies de parasitos com potencial zoonótico. Entre eles, *Ancylostoma*, tem sido o gênero mais frequente, com prevalências em torno de 73,7% (CÔRTEZ et al., 1988; SCAINI et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2005; ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006; LABRUNA et al., 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; COELHO et al., 2011).

Considerando-se o número de cães existentes no município de Pelotas, a falta de recolhimento das fezes em vias públicas e a carência de trabalhos que avaliem o grau de contaminação ambiental do município, o presente estudo teve como objetivo realizar um levantamento da prevalência de parasitos veiculados em fezes de cães encontradas nas vias públicas.

3.4 Materiais e Métodos

O este trabalho foi realizado em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. O município corresponde a uma área territorial de 1.610,091 km², com população de 328.275 habitantes (www.ibge.gov.br). Está localizado na latitude 31°46'19"S e longitude 52°20'33"O. Encontra-se a sete metros acima do nível do mar, com clima subtropical úmido, temperatura média anual de 17,5°C, 1.379 mm de chuvas/ano e umidade relativa do ar de 80%. A população estimada de cães é de 66.842 animais, sendo 46.789 semidomiciados (70%), 6.684 errantes (20%) e 13.368 domiciliados (10%). A relação população canina e humana é de um cão para, aproximadamente, cinco habitantes, segundo Secretaria Municipal da Saúde, 2011.

No período de janeiro a março de 2012 foram selecionados 14 pontos da cidade, que incluíram o centro da cidade (n=4), bairros da periferia (n=8), balneário do laranjal (n=1) e canil municipal (n=1). De cada ponto foram coletadas aleatoriamente 15 amostras de fezes de cães, não ressecadas, que se encontravam nas vias públicas, totalizando 210 amostras.

As fezes foram processadas de acordo com método de flutuação de Willis com algumas modificações (SCAINI et al., 2003) e posteriormente avaliadas ao microscópio óptico. A identificação dos ovos foi baseada nas suas características morfométricas (ANDERSON et. al., 2009).

3.5 Resultados

Das 210 amostras analisadas, 57,6% (121/210) apresentaram-se positivas para um gênero de parasito ou associações. Foi observada mono-infecção em 67,8% (82/121) e multi -infecção em 32,2% (39/121) das fezes avaliadas. Em 36 (29,7%) a presença de ovos de dois gêneros de parasito foi evidente, sendo a associação *Ancylostoma* .e *Trichuris*. a mais frequentemente encontrada (25,6%). Já a associação de três parasitos foi observada em apenas 2,5% das fezes. *Ancylostoma*. foi o gênero que apareceu em maior frequência perfazendo 88,4% (107/121) das amostras, seguido de *Trichuris* (38,8%; 47/121) e *Toxocara* (7,4%; 9/121) (Figura 1).

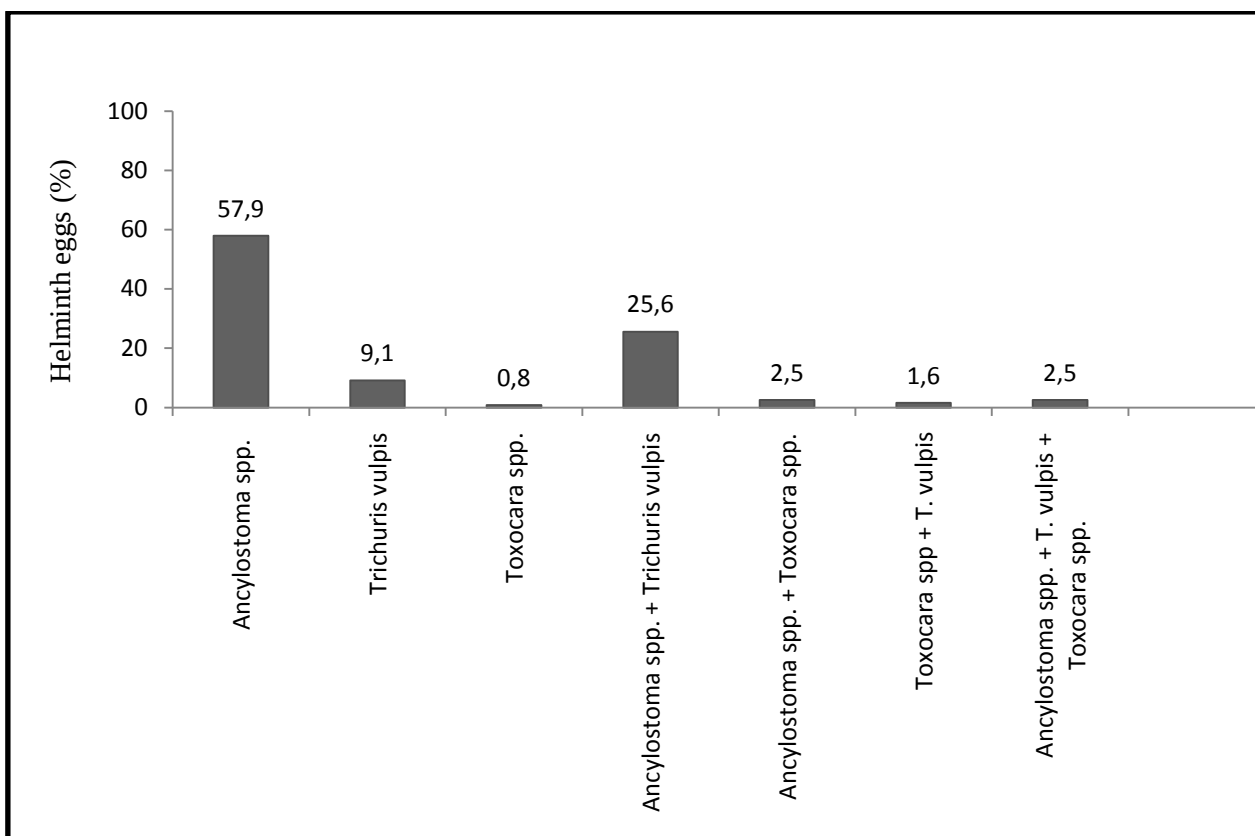


Figura 1:Prevalência de ovos de helmintos encontrados em fezes de cães em vias públicas na cidade de Pelotas, Brasil, no período janeiro-março 2012

Dentre as áreas selecionadas para o estudo, em cinco pontos, que abrangeram o centro (ponto 1), bairros (pontos 2, 3 e 4) e balneário do laranjal(ponto 5), a frequência de positividade das fezes foi de 33,3% a 40%. Já nos demais pontos, com exceção do canil municipal, essa frequência variou de 53,3 a 80%. Coincidentemente, essas áreas corresponderam a bairros de baixa condição sócio-econômica. No canil municipal 100% das fezes analisadas continham ovos de elmintos (Figura 2).

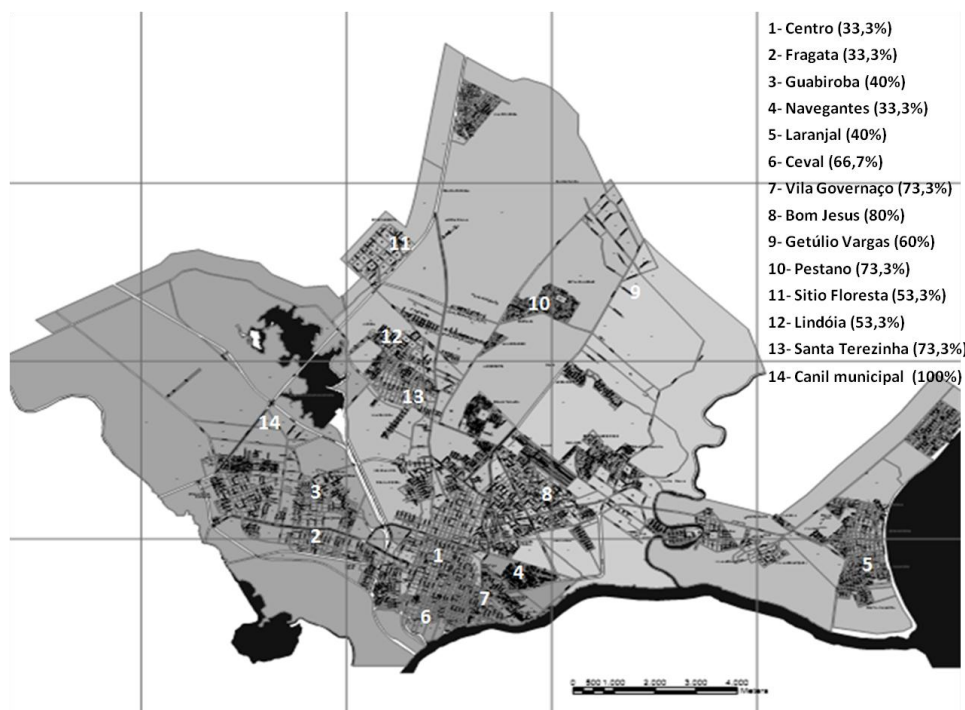


Figura 2: Pontos coletados e frequência de amostras de fezes positivas para ovos de helmintos na cidade de Pelotas, RS, Brasil

3.6 Discussão

A amostragem do presente trabalho foi determinada de modo aleatório, priorizando a coleta de fezes nas vias públicas. Desta forma, não houve tendências para busca de animais positivos ou negativos e tampouco para idade, raça, sexo e origem dos cães. A prevalência global foi de 57,6%, o que é similar aos demais estudos realizados nos últimos 20 anos no Brasil (CÔRTES et al., 1988; SCAINI et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2005; ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006; LABRUNA et al., 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; COELHO et al., 2011). A prevalência de 88,4% para *Ancylostoma* spp. em cães de Pelotas está entre as mais altas relatadas no País (CÔRTES et al., 1988; SCAINI et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2005; ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006; LABRUNA et al., 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008; COELHO et al., 2011), indicando grande contaminação ambiental na área urbana estudada. Este helminto tem sérias implicações em saúde pública, uma vez que causa larva *migrans* cutânea no homem, uma importante zoonose que decorre da penetração de larvas, presentes

no solo contaminado por fezes de cães, na epiderme de hospedeiros suscetíveis (DAMANTE et al., 2011; CRIADO et al., 2012).

Diferente de outros autores (CÔRTEZ et al, 1988; GUIMARÃES et al., 2005; ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006; LABRUNA et al., 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008), no presente relato, *Trichuris vulpis*. foi detectado em 38,8% das amostras de fezes analisadas. Entretanto, resultado similar foi descrito no Balneário do Cassino/RS (SCAINI et al., 2003), distante 54 Km da cidade de Pelotas. Estas similaridades podem ser atribuídas ao tipo de metodologia adotada e a região geográfica onde foram desenvolvidos ambos os estudos. Fatores como protocolo de amostragem, técnica de diagnóstico, distribuição geográfica e idade dos animais podem explicar os resultados entre as pesquisas realizadas (GUIMARÃES et al., 2005). É possível que as frequências mais elevadas para *Trichuris vulpis*. estejam relacionadas às condições de vida de cães de rua, que são excluídos de tratamentos antihelmínticos. Desta forma, esses animais tornam-se importantes fontes de infecção para os cães domiciliados, uma vez que ovos de *T.vulpis* se mantêm infectantes por vários meses no ambiente (LABRUNA et al., 2006). Além disso, esse parasito também assume importância em saúde pública, já que foi identificado como agente de infecção entérica e larva *migrans* visceral no homem (SAKANO et al., 1980 DUNN et al., 2002).

É provável que o encontro de baixos índices de *Toxocara* spp. (7,4%), o que difere de outros estudos (CÔRTEZ et al., 1988; GUIMARÃES et al., 2005; ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006; LABRUNA et al, 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008), tenha ocorrido porque a maioria das fezes examinadas foi proveniente de cães adultos. Embora, não tenha sido levado em consideração a idade dos animais, foi observada a predominância de cães adultos com livre acesso as áreas estudadas.

Verificou-se uma maior prevalência de ovos de helmintos em fezes de cães provenientes dos bairros localizado na periferia da cidade, onde estão localizados conjuntos habitacionais destinados à população de baixo poder aquisitivo. Dados similares foram previamente relatados (CAPUANO; ROCHA, 2006). Entretanto, chama-se atenção para as frequências encontradas nos pontos do centro da cidade (33,3% a 40%), onde há melhor padrão sócio-econômico. Nessas áreas observou-se que grande número de cães circulava livremente pelas vias públicas, sendo a maioria deles acompanhados por pessoas, provavelmente seus donos. Além disso,

notou-se a presença de fezes no ambiente, pois grande parte dos indivíduos não tem o hábito de recolher os dejetos de seus animais. Assim, contaminam o solo com vários tipos e formas parasitárias potencialmente causadoras de zoonoses. Estas observações são corroboradas tanto pelo número de cães vadios como semi domiciliados, que representam 90% de todos os cães do município. Essas observações sugerem que a população desconhece ou negligencia os riscos de transmissão de doenças, bem como as medidas de controle e prevenção das parasitoses. Katagiri e Oliveira-Sequeira (2008) afirmaram que a principal razão para a aparente negligência na desvermifugação dos cães em Ribeirão Preto, SP, é a falta de conhecimento sobre o potencial zoonótico dos parasitos intestinais de cães. O alto índice de positividade das amostras provenientes do canil municipal pode ser explicado pelo fato deste estabelecimento albergar cães oriundos de diferentes regiões da cidade.

A alta frequência de infecções enteroparasitárias em cães neste trabalho e em prévios estudos (CÔRTES et al., 1988; SCAINI et al., 2003; GUIMARÃES et al., 2005; ARAÚJO, 2006; CAPUANO; ROCHA, 2006; LABRUNA et al., 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA- SEQUEIRA, 2008; COELHO et al., 2011) aliada a falta de conhecimento ou negligência da população sobre o potencial zoonótico dos parasitos intestinais, bem como dos métodos para o seu controle e profilaxia (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2008), enfatizam o risco de disseminação de zoonoses e sugerem a necessidade de ações educativas urgentes para a conscientização dos responsáveis pelos cães e adoção de medidas de prevenção dessas enfermidades.

3.7 Conclusão

A contaminação do ambiente urbano da cidade de Pelotas, particularmente por *Ancylostoma* spp., que apresentou uma prevalência de 88,4% demonstra que o padrão de contaminação ambiental por parasitos com potencial zoonótico é similar ao encontrado em outros estudos realizados no Brasil. Espera-se que as informações geradas sirvam de subsídios para auxiliar as autoridades governamentais na implementação de programas de educação sanitária e de posse responsável dos cães.

3.8 Agradecimentos

Os autores agradecem as agências brasileiras de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

3.9 Referências

Anderson RC, Chabaut AG, Willmott S. Keys to the nematode parasites of vertebrates .ed Cabi Press 2009, 53-56.

Araujo JV. Helmintoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. Rev Ceres 2006; 53(307): 363-365.

Capuano DM , Rocha GM. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Rev Bras de Epidemiol 2006; 9(1): 81-86.

Coelho WMD, Amarante AFT, Apolinário JC, Coelho NMD, Bresciani KDS. Occurrence of *Ancylostoma* in dogs, cats and public places from Andradina city, São Paulo state, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2011; 53(4): 181-184.

Côrtes VA, Pain GV, Filho RAA. Infestação por ancilostomídeos e toxocarídeos em cães e gatos apreendidos em vias públicas, São Paulo (Brasil). Rev Saúde Públ 1988; 22(4): 341-343.

Criado PR, Junior WB, Vasconcellos C, Silva CS. Cutaneous larva *migrans*: A bad souvenir from the vacation. Dermatol Online J 2012; 18(6): 11.

Damante JH, Chinellato LEM, Oliveira FT, Soares CT, Fleury RN. Larva *migrans* in the oral mucosa: Report of two cases. Braz Dent J 2011; 22(2): 166-170.

Dunn JJ, Columbus ST, Aldeen WE, Davis M, Carroll KC. *Trichuris vulpis* recovered from a patient with chronic diarrhea and five dogs. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2703-2704.

Guimarães AM, Alves EGL, Rezende GF, Rodrigues MC. Ovos de *Toxocara* spp. e larvas de *Ancylostoma* spp. em praça pública de Lavras, MG. Rev Saúde Públ. 2005; 39(2): 293-295.

Katagiri S, Oliveira-Sequeira TCG. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. Zoonoses Public Health 2008; 55: 406-413.

Labruna MB, Pena HFJ, Souza SLP, Pinter A, Silva JCR, Ragozo AMA, Camargo LM, Gennari SM. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. Arq Inst Bio 2006; 73(2): 183-93.

Scaini CJ, Toledo R, Lovatel R, Dionello MA, Gatti FA, Susin L, Signorini VRM. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central de Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36(5): 617-619.

Sakano T, Hamamoto K, Kobayashi Y, Sakata Y, Tsuji M, Usui T. Visceral larva *migrans* caused by *Trichuris vulpis*. Arch Dis in Child. 1980; 55: 631-633.

4 ARTIGO 2: Avaliação *in vitro* do efeito ovicida de extratos brutos enzimáticos dos fungos *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens* sobre *Ancylostoma*.

Para submissão a Revista Veterinary Parasitology

**Avaliação *in vitro* do efeito de extratos brutos enzimáticos dos fungos
Paecilomyces lilacinus, *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma virens* sobre ovos de
Ancylostoma spp**

***In vitro* evaluation of the effect of enzymatic extracts of fungi
Paecilomyces lilacinus, *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* on eggs of
Ancylostoma spp**

Bianca Delgado Menezes Hofstätter¹, Anelise Oliveira da Silva Fonseca²,
Fernando de Souza Maia Filho¹, Julia de Souza Silveira Valente³, Beatriz Maroneze
Persici³, Luciana Potter⁴, Andressa Silveira⁵, Daniela Isabel Brayer Pereira^{1*}

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

²Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPEL, RS, Brasil.

³Bolsista de Iniciação Científica, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), RS, Brasil.

⁴Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

⁵ Departamento de Solos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

^{1*} Autor correspondente: Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. CEP: 96010-900. Brasil. E-mail: danielabrayer@gmail.com.

4.1 Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ação *in vitro* de quatro diferentes preparações de extratos enzimáticos dos isolados fúngicos *Paecilomyces lilacinus* CG193; *P. lilacinus* MICLAB009; *Trichoderma harzianum* CG502 e *T. virens* MICLAB008 na eclodibilidade de ovos do geohelminto *Ancylostoma*. Os fungos foram cultivados em meio mínimo líquido. As preparações fúngicas consistiram do meio líquido sobrenadante sem filtração (extrato bruto) e filtrado (extrato filtrado), do micélio macerado (macerado bruto) e micélio macerado submetido a filtração (macerado filtrado). Os ovos de *Ancylostoma* foram obtidos a partir de fezes de cães naturalmente parasitados. Os ensaios *in vitro* consistiram em quatro tratamentos e um grupo controle. Todas as placas foram 25°C, durante 24 horas incubadas a. Cada ensaio foi constituído de cinco repetições. Observou-se que as diferentes formulações fúngicas avaliadas em cada fungo diferiram ($p < 0,05$) do grupo controle, evidenciando relevante atividade ovicida. Quando calculado o percentual de redução de eclosão dos ovos, foi observado que o maior valor de redução ocorreu quando utilizada a preparação macerado bruto, com percentual de redução de 68,43% e 47,05% em *P. lilacinus* MICLAB009 e CG193, respectivamente, e 56,43% em *T. harzianum*. Apenas no isolado *T. virens* o percentual de redução do macerado bruto (52,25%) foi levemente inferior ao macerado filtrado (53,64%). Os resultados mostram que independente do extrato fúngico testado, as espécies de fungos avaliadas foram eficazes em reduzir a eclodibilidade de ovos de *Ancylostoma*. É provável que o efeito ovicida tenha sido causado pela ação de enzimas hidrolíticas secretadas pelos fungos.

Palavras-chave; ovicida, nematoide, controle biológico, fungos nematofagos, enzimas.

4.2 Abstract:

The objective of this research was to evaluate the *in vitro* effect of four different preparations of enzyme extract of fungal isolates *Paecilomyces lilacinus* CG193; *P. lilacinus* MICLAB009, *Trichoderma harzianum* CG502 and *T. virens* MICLAB008 in hatchability of eggs geohelminth *Ancylostoma*. The fungi were grown in minimal medium liquid. The preparations consisted of fungal supernatant liquid medium without filtration (crude extract) and filtered extract (filtered extract), the mycelium macerated (crude macerate) and macerated mycelium subjected to filtration (filtered macerate). The eggs of *Ancylostoma* were obtained from naturally infected dog faeces.

The in vitro tests consisted of four treatments and a control group. All plates were incubated at 25°C for 24 hours. Each test consisted of five replicates. It was observed that the different formulations fungal evaluated of each fungus differ ($p < 0,05$) in the control group, showing significant ovicidal activity. When we calculated the percentage reduction of hatching eggs, it was noted that the higher value of reduction occurred when used the crude macerate, with percentage reduction of 68.43% and 47.05% by *P. lilacinus* MICLAB009 and CG193, respectively, and 56.43% for *T. harzianum*. Only in isolated *T. virens* the percentage of reduction of crude macerate (52.25%) was slightly lower than the filtered macerate (53.64%). The results show that regardless of fungal extract tested the fungi species evaluated were effective in reducing the hatchability of eggs from *Ancylostoma*. It is likely that the ovicidal effect was caused by the action of hydrolytic enzymes secreted by fungi.

Keywords: Ovicidal, nematodes, biological control, nematophagous fungi, enzymes.

4.3 Introdução

Os caninos são hospedeiros de uma ampla variedade de helmintos. Entre eles, *Ancylostoma* spp. e *Toxocara canis* certamente são os mais ubíquos e prevalentes. A grande tolerância dos estágios de vida livre às diferentes condições ambientais é a mais provável explicação para a ampla distribuição geográfica desses parasitos (KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007).

Ancylostoma caninum e *Ancylostoma braziliense* tem requerido considerável atenção devido o seu potencial zoonótico que está diretamente relacionado à contaminação dos solos com fezes de animais parasitados (CARVALHO et al., 2009; BRAGA et al., 2011a). Estudos de prevalência realizados em diversos países apontaram taxas consideráveis de contaminação ambiental por formas infectantes desses parasitos (LABRUNA et al., 2006; SOMMERFELT et al., 2006; WANG et al., 2006; KATAGIRI; OLIVEIRA-SEQUEIRA, 2007; HOLYOAKE, 2008; SOWERMIMO 2009; MAHDY et al., 2012).

Em cães e gatos pode causar anemia, perda de peso, enterite hemorrágica, depressão e mesmo a morte (ROBERTSON et al., 2000). A estreita convivência entre esses animais e o homem tem aumentado o risco de aquisição de helmintoses e zoonoses, assim como larva *migrans* cutânea. Essa enfermidade caracteriza-se pela migração de larvas (L3) . nos tecidos subcutâneos, adquirida pelo contato com

solo contaminado por fezes de cães e gatos infectados com ancilostomídeos (ROBERTSON et al., 2000).

Embora, o uso de anti-helmínticos nos animais seja o método usual para prevenir a contaminação ambiental por ovos e larvas de *Ancylostoma* spp., o desenvolvimento e implementação de medidas alternativas para prevenção e controle de geohelmintos são cruciais para reduzir a contaminação ambiental por formas infectantes do parasito (CARVALHO et al., 2009). Além disso, o aumento expressivo no número de relatos de nematoides resistentes aos diversos fármacos disponíveis e a crescente tendência por produtos que não agridam o meio ambiente incrementam a procura por métodos alternativos (GRONVOLD et al., 1996).

Neste contexto, os fungos nematófagos, um dos principais inimigos naturais de nematoides, têm sido amplamente empregados no controle biológico devido à sua capacidade em apreender e digerir as formas livres (HUANG et al., 2004). Assim, estes fungos podem ser utilizados em associação em situações em que o ambiente já está contaminado. Com isso auxiliam na redução das re-infecções, evitam parasitismo clínico mantendo o grau de infecção (CARVALHO et al., 2009).

Fungos ovicidas ou oportunistas, assim como *Paecilomyces lilacinus* e *Pochonia clamydosporia*, têm sido utilizados com sucesso no controle *in vitro* de ovos de helmintos gastrointestinais de animais (ARAUJO et al., 1995; ARAUJO, 2008; BRAGA et al., 2008; CARVALHO et al., 2010; FRASSY et al., 2010). Estudos mostram que o mecanismo de infecção por esses fungos ovicidas pode ser mecânico, enzimático ou ambos (BONANTS et al., 1995). No entanto, na última década, a identificação de numerosas enzimas extracelulares tem confirmado o seu envolvimento como um importante fator de virulência associado ao processo de infecção (HUANG et al., 2004). Expressiva atividade enzimática foi relatada quando culturas filtradas de *P. lilacinus* e *Trichoderma* spp. foram utilizadas sobre fitonematóides (BONANTS et al., 1995; KHAN et al., 2004; SHARON et al., 2007; SANTIN, 2008; FREITAS et al., 2012) e quando extrato bruto enzimático de *P. clamydosporia* e *Duddingtonia flagrans* foi empregado em ovos e larvas de nematoides de animais (BRAGA et al., 2010; BRAGA et al., 2011a,b).

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

brutos enzimáticos dos fungos *P. lilacinus*, *T. harzianum* e *T. virens* sobre ovos do geohelminto *Ancylostoma* spp.

4.4 Materiais e Métodos

4.4.1 Culturas fúngicas

Foram utilizados quatro isolados fúngicos: *P. lilacinus* CG193 e *Trichoderma harzianum* CG502, gentilmente cedidos pelo Cenargen (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia) e *P. lilacinus* MICLAB009 e *Trichoderma virens* MICLAB 008 obtidos da coleção de fungos do Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil, devidamente identificados por sequenciamento de DNA.

As culturas mantidas em tubos de ensaio contendo ágar batata (PDA) a 4°C, foram subcultivadas para placas de Petri com PDA e incubadas a 25°C, durante 10 dias. A seguir, discos de 4mm de cultura de cada isolado fúngico foram transferidos para frascos tipo Erlenmeyer contendo 150 mL de meio mínimo líquido [glicose(1,8g/L); NH_4NO_3 (0,4g/L); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,12g/L); $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,18g/L), KH_2PO_4 (0,26g/L), extrato de levedura (0,3g/L) e gelatina bacteriológica (2g/L)]. A gelatina foi filtrada por meio de filtro Millipore (45µm) e adicionada ao meio autoclavado. Os frascos foram incubados a 28°C em agitador rotatório a 120 rpm, durante cinco dias.

4.4.2 Produção dos extratos fúngicos

A partir das culturas em meio mínimo líquido, quatro diferentes extratos dos fungos foram obtidos, os quais foram denominados: extrato bruto (EB), constituído pelo líquido sobrenadante; extrato filtrado (EF), obtido pela passagem do sobrenadante através de papel filtro Whatman nº1. Para obtenção do macerado bruto (MB), primeiramente o micélio foi separado do meio sobrenadante através de tamis. Em seguida o micélio fúngico foi macerado em 3 banhos de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó, o qual foi ressuspenso no meio líquido sobrenadante. Por último, o macerado filtrado (MF) foi obtido da mesma maneira que o macerado bruto, porém, foi submetido a filtração em papel filtro Whatman nº1. Todos os extratos foram preparados e utilizados no mesmo dia.

4.4.3 Amostras fecais

As amostras de fezes foram coletadas no canil municipal da cidade de Pelotas, RS, Brasil e no canil da Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de

Pelotas. Para obtenção dos ovos de *Ancylostoma* spp., um pool de aproximadamente 500g de fezes frescas de cães naturalmente infectados eram coletadas a cada dia de experimento. Imediatamente após coleta, os ovos eram obtidos seguindo o protocolo de recuperação de ovos de nematoídeos gastrointestinais preconizado pela Embrapa Pecuária Sudeste, Brasil (2009). Inicialmente, as fezes foram diluídas e maceradas em água morna, filtradas em peneiras com reticulações de 1mm, 105µm, 55µm e 25µm. O resíduo da peneira de 25µm foi lavado com água destilada e a suspensão obtida foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em solução salina supersaturada, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições. Posteriormente, o sobrenadante foi filtrado em peneira de 25µm, a qual foi lavada com água destilada para obtenção dos ovos que ficaram retidos. Os ovos foram suspensos em água destilada estéril, contados em câmara de Neubauer e utilizados no mesmo dia.

4.4.4 Ensaios experimentais

Os ensaios *in vitro* consistiram em quatro tratamentos e um grupo controle. Em placas de Petri de 60x15mm foram vertidos 4 mL dos extratos fúngicos, EB, EF, MB e MF, preparados conforme item 4.4.2. A esse volume foi acrescido 1 mL de uma suspensão contendo aproximadamente 10^3 ovos de *Ancylostoma* spp. Esses grupos constituíram-se nos tratamentos. Nas placas correspondentes ao grupo controle verteu-se 1 mL de uma suspensão contendo aproximadamente 10^3 ovos de *Ancylostoma* spp. acrescido de 4 mL de água destilada estéril. Todas as placas foram incubadas a 25°C, durante 24 horas. Cada tratamento foi constituído de cinco repetições.

Após 24 horas, a leitura foi realizada em lupa estereoscópica e considerando o número total de larvas de *Ancylostoma* spp. presentes em cada placa dos grupos tratados e controle.

4.4.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e cinco repetições. Como a variável resposta não apresentou normalidade, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Quando encontradas diferenças entre os tratamentos as médias foram comparadas pelo teste de Bonferroni. As análises foram efetuadas com auxílio do programa estatístico SAS (SAS, 2001) considerando uma probabilidade de 5%.

Também foi calculado o percentual de redução da média de larvas utilizando-se a seguinte equação, conforme citado por Braga et al. (2010, 2011):

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

4.5 Resultados

Após 24 horas de interação observou-se que as diferentes formulações fúngicas avaliadas (EB, EF, MB e MF) de *P. lilacinus* CG193, *P. lilacinus* MICLAB009, *T. harzianum* e *T. virens* foram capazes de reduzir, em algum percentual, a eclodibilidade dos ovos de *Ancylostoma* spp. quando comparados ao controle (Tabela 1). A análise estatística mostrou diferença ($p < 0,05$) no número de larvas entre as formulações fúngicas de cada fungo e o grupo controle. Além disso, evidenciou que EB, EF, MB e MF não tiveram o mesmo comportamento em cada fungo testado (tabela 1). Entretanto, quando analisado o percentual de redução na eclosão dos ovos de *Ancylostoma* spp. foi evidenciado que o maior valor de redução de eclodibilidade ocorreu quando utilizado MB, observando-se um percentual de redução de 68,43% e 47,05% em *P. lilacinus* MICLAB009 e CG193, respectivamente, e 56,43% em *T. harzianum* CG502. Apenas no isolado *T. virens* o percentual de redução do MB (52,25%) foi levemente inferior ao MF (53,64%) (Tabela 1).

Tabela 1: Média de Contagem de larvas e percentual de redução de eclosão de ovos de *Ancylostoma* spp. em 24 horas submetidos ao tratamento com diferentes extratos fúngicos de *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma virens* e *Trichoderma harzianum*.

Extrato fúngico	Média de larvas	Percentual de redução (%)
<i>P. lilacinus</i> (CG 193)		
MB	369,2 ^C	47,03
MF	524,2 ^B	24,79
EB	522,2 ^B	25,07
EF	385,2 ^C	44,73
Controle	697 ^A	
<i>P. lilacinus</i> (MICLAB 009)		
MB	119,4 ^C	68,32
MF	208,2 ^B	44,77
EB	152,6 ^B	59,52
EF	215,2 ^B	42,91
Controle	377 ^A	
<i>T. virens</i> (MICLAB 008)		
MB	446,0 ^C	52,24
MF	433,6 ^C	53,57
EB	472,0 ^C	49,46
EF	527,0 ^B	43,57
Controle	934 ^A	
<i>T. harzianum</i> (CG 502)		
MB	159,4 ^C	56,35
MF	204,8 ^C	43,92
EB	269,8 ^B	26,12
EF	199,8 ^C	45,29
Controle	365,2 ^A	

MB= macerado bruto; MF=macerado filtrado; EB= extrato bruto; EF=extrato filtrado.
Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferiram estatisticamente (p<0,05)

4.6 Discussão

Nos últimos anos fungos nematófagos vem sendo amplamente empregados no controle biológico devido a sua capacidade para capturar e infectar nematoides utilizando sua ação enzimática (HUANG et al., 2004; KHAN et al., 2004.). Embora os mecanismos de patogenicidade dos fungos nematófagos não estejam completamente elucidados, evidências mostram que enzimas hidrolíticas extracelulares, incluindo proteases, collagenases e quitinases podem estar envolvidas na penetração e digestão da cutícula dos nematoides (HUANG et al., 2004.; MORTON et al., 2004; YANG et al., 2007).

Os resultados obtidos no presente estudo permitem sugerir que a atividade ovicida dos fungos avaliados sobre ovos de *Ancylostoma* spp. foi decorrente da ação de enzimas hidrolíticas. *P. lilacinus* tem sido amplamente estudado e tem se mostrado efetivo no biocontrole de espécies do fitonematóide *Meloidogyne* (BONANTS et al., 1995; KHAN et al., 2004). Kahn et al. (2004) ao avaliar o efeito deste fungo sobre ovos de *Meloidogyne javanica* mostraram que a desintegração da camada vitelínica, quitínica e lipídica dos ovos foi causado unicamente pela degradação enzimática de proteases e quitinases. Além disso, concluíram que as enzimas podem facilitar a penetração física do fungo e melhorar a eficiência da infecção. Similarmente, Bonants et al. (1995), demonstraram que uma serina protease de *P. lilacinus* foi responsável pela lesão à casca e vacuolização de ovos de *M. hapla*, desempenhando papel fundamental na patogenicidade do fungo. Além de serina protease, atividade de quitinase também foi observada em sobrenadantes de cultura de *P. lilacinus* (KHAN et al., 2004). Neste estudo, os dois isolados de *P. lilacinus* avaliados foram capazes de reduzir a eclosão dos ovos de *Ancylostoma* spp. evidenciando atividade ovicida. Estudos prévios demonstraram o efeito ovicida desta espécie de fungo sobre ovos de *Toxocara canis* (Araújo et al., 1995), *Taenia saginata* (Braga et al., 2008), e capsulas ovígeras de *Dipilidium caninum* (Araujo, 2008). Entretanto, nesses experimentos, não foram utilizados extratos enzimáticos, mas o fungo crescido em placas de Petri sobre ovos dos geohelmintos.

Espécies do fungo *Trichoderma* são extensivamente utilizadas no controle biológico de inúmeros fungos fitopatógenos (ETHUR et al., 2005; PATRÍCIO et al., 2007) e, na última década, estudos tem relatado o seu potencial no controle de diferentes espécies do fitonematóide *Meloidogyne* (SHARON et al., 2007, FERREIRA et al., 2008, SANTIN, 2008). Em 2013, Filho et al. ao avaliar a capacidade ovicida de

fungos isolados de solo brasileiro sobre ovos de *T. canis* identificaram um isolado de *Trichoderma* spp. com promissora atividade ovicida. A utilização de diferentes extratos brutos enzimáticos de *T. harzianum* e *T. virens* no presente estudo comprovam o potencial ovicida destas espécies fúngicas sobre ovos de *Ancylostoma* spp. Segundo Santin (2008) o potencial de *Trichoderma* spp. no controle de fitonematóide deve-se a produção de metabólitos voláteis inibitórios e produção de enzimas líticas que degradam a quitina dos ovos. Similarmente, Morton et al. (2004) e Romão-Dumaresq et al. (2012) afirmam que a atividade quitinolítica destes fungos é provavelmente a mais relevante para a lesão da bainha do ovo.

Embora os autores não tenham identificado e purificado as enzimas presentes nos extratos dos fungos avaliados neste estudo, acreditam que o efeito ovicida observado tenha sido decorrente da degradação enzimática de proteases e quitinases secretadas. Como os ovos dos parasitos do filo Nematoda podem apresentar de uma a três camadas, uma interna lipoproteica, uma intermediária quitinosa e uma externa vitelínica (Homero, 1984), é possível que sejam suscetíveis a essas enzimas. Em estudos prévios foi demonstrado o efeito lítico de proteases e quitinases purificadas sobre ovos de *Haemonchus contortus* (MANSFIELD et al., 1992). Porém, o desenvolvimento de estudos futuros que visem a identificação e caracterização das enzimas e suas respectivas atividades sobre ovos de helmintos patógenos de animais são imprescindíveis para a continuidade das pesquisas e utilização desses fungos no controle biológico de parasitos.

Mesmo que a maioria dos estudos tenha avaliado culturas filtradas de fungos sobre ovos de fitonematóides e nematoides gastrointestinais de animais domésticos (BONANTS et al., 1995; KHAN et al., 2004; SHARON et al., 2007; SANTIN, 2008; BRAGA et al., 2010; BRAGA et al., 2011a, b; FREITAS et al., 2012), optou-se por testar diferentes formulações de extratos fúngicos, envolvendo culturas filtradas e maceradas, no intuito de verificar possíveis diferenças na presença de enzimas dependente da maneira de preparação do extrato. Foi observado que, independente da forma como os extratos fúngicos foram preparados, sempre houve algum grau de atividade ovicida, a qual foi evidenciada pelos percentuais de redução na eclosão dos ovos e pelas diferenças observadas com o grupo controle ($p < 0,05$). Embora, as formulações utilizadas tenham se comportado de maneira diferente em cada fungo testado, cabe chamar atenção aos maiores percentuais de redução de eclodibilidade observados com a preparação macerado bruto, particularmente no

isolado *P. lilacinus* MICLAB009, que mostrou diferença ($p < 0,05$) com as demais preparações fúngicas. Os autores sugerem que tal atividade poderia ser decorrente da presença de enzimas intracelulares liberadas durante o processo de maceração e que somadas à ação das enzimas extracelulares incrementariam a eficácia do fungo. Todavia, não podem afirmar tal achado sem o desenvolvimento de estudos que avaliem a ação isolada e combinada das enzimas envolvidas. Por outro lado, na última década, alguns trabalhos têm avaliado a atividade enzimática de culturas filtradas ou enzimas purificadas de fungos nematófagos sobre larvas e ovos de helmintos gastrointestinais de animais. Avaliando os resultados dessas pesquisas observa-se que quando testada a atividade enzimática isolada de uma serina protease proveniente de *Monacrosporium haumasium* a redução do número de larvas de *Angiostrongylus vasorum* foi de apenas 23,9% (SOARES et al., 2012). Já, quando utilizado o extrato bruto enzimático do fungo *D. flagrans* sobre larvas do mesmo nematoide, os percentuais de redução foram de 71,3% (BRAGA et al., 2011b), o que sugere que a combinação de enzimas hidrolíticas incrementa a atividade ovicida. Similarmente, outros estudos que utilizaram extratos brutos enzimáticos do fungo *P. clamydosporia* sobre ovos de ciastostomíneos (BRAGA et al., 2010) e *Ancylostoma* spp. (BRAGA et al., 2011b) reduziram em 72,8% e 76,8%, respectivamente, a eclodibilidade dos ovos em 24 horas. Em estudos prévios, Huang et al. (2004) detectaram que o sinergismo de proteases e quitinases de *P. lilacinus* foram capazes de reduzir significativamente o desenvolvimento e a eclosão de ovos de *M. javanica*. Da mesma forma, Tikhonov et al. (2002) afirmaram que a ação combinada de proteases e quitinases destrói as camadas lipídicas do ovo, provoca hidrólise da quitina e altera a camada vitelínica.

Os percentuais de redução de eclodibilidade encontrados com o macerado bruto de *P. lilacinus* MICLAB009 no presente estudo foram similares aos relatados por Braga et al. (2010, 2011a). Por outro lado, os demais isolados testados também apresentaram significativa atividade ovicida sobre ovos de *Ancylostoma* spp.

As características do ciclo de vida de *Ancylostoma* spp. com o desenvolvimento de ovos que eclodem em curto intervalo de tempo no ambiente, faz com que a maioria dos trabalhos que avaliam a ação de fungos nematófagos sobre este parasito sejam desenvolvidos com fungos predadores sobre larvas infectantes de terceiro estágio (CARVALHO et al., 2009; MACIEL et al., 2009; MACIEL et al., 2010). Concordando com Braga et al., (2011a), que indicam o uso de *P. clamydosporia*

no controle de ovos de *Ancylostoma* spp., os resultados aqui apresentados permitem sugerir o emprego de *P. lilacinus*, *T. harzinum* e *T. virens* no controle de ovos deste parasito no ambiente.

4.7 Conclusão

O emprego de extratos brutos enzimáticos dos fungos *P. lilacinus*, *T. harzinum* e *T. virens* reduz significativamente a eclosão de ovos de *Ancylostoma* spp. em 24 horas de exposição. Contudo, posteriores investigações são requeridas para identificar e caracterizar as moléculas responsáveis pelos efeitos observados. Este é o primeiro relato de utilização de extratos enzimáticos dessas espécies fúngicas sobre nematoides de animais. Assim, os isolados de *P. lilacinus*, *T. harzinum* e *T. virens* testados se somam aos demais fungos nematófagos já conhecidos e se constituem em promissores agentes de controle biológico de ovos de geohelminthos no ambiente.

4.8 Agradecimentos:

Os autores gostariam de agradecerem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

4.9 Referências

- Araújo, J. V., Santos, M. A., Ferraz, S., 1995. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. Arq.Bras. Med. Vet.Zootec.47, 37-42.
- Araújo, J. M., 2008. Ação in vitro dos fungos das espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Pochonia clamydosporea* (syn. *Verticillium clamydosporium*) e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas ovígeras de *Dipylidium caninum* e ovos de *Taenia saginata*. Dissertação Mestrado em Parasitologia Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 63fl.
- Bonants, P. J. M., Fitters, P. F. L., Thijs, H., Den Belder, E., Waalwijk, C., Henfling, J. W. D. M., 1995. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against *Meloidogyne hapla* eggs. Microbiol.141, 775–784.
- Braga, F. R., Araújo, J. V., Araújo, J. M., Carvalho, R. O. Silva, A. R., 2008. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. Rev. Soc. Bras. Med Trop. 41, 1559-1564.
- Braga, F. R., Araújo, J. V., Carvalho, R. O., Silva, A. R., Araújo, J. M., Soares, F. E. F., Geniêr, H. L. A., Ferreira, R. S., Queroz, H.J., 2010. Ovicidal action of a crude

enzimatic extract of the fungus *Pochonia clamydosporia* against *cyathostomin* eggs
Vet. Parasitol. 172, 264-268.

Braga, F. R., Araujo, J. M., Tavela, A. O., Araújo, J. V., Soares, F. E. F., Geniêr, H. L. A., Lima, W. S., Mozzer, L. R., Queiroz, J. H., 2011a. Atividade larvívica do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*, Rev. Soc. Bras. de Med. Trop. 44, 383-385.

Braga, F. R., Araujo, J. M., Silva, A. R., Araújo, J. V., Carvalho, R. O., Soares, F. E. F., Queiroz, J. H., Geniêr, H. L. A., 2011b. Ação do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia clamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* spp. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 44, 234-238.

Carvalho, R. O., Araujo, J. V., Braga, F. R., Araujo, J. M., Silva, A. R., Tavela, A. O., 2009. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* spp. evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. J. Helminthol. 83, 231-236.

Carvalho, R. O., Araújo, J. V., Braga, F. R., Araújo, J. M., Alves, C. D., 2010. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. Vet. Parasitol. 169, 123-127.

Embrapa, pecuária, sudeste., 2009., Protocolo de recuperação de ovos de nematóides gastrointestinais. Protocolo laboratório sanidade animal-n 9.

Ethur, L. Z., Blume, E., Muniz, M., Silva, A. C. F., Stefanelo, D. R., Rocha, E. K., 2005. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. Fitopatol. bras. 30, 127-133.

Ferreira, P. A., Ferraz, S., Lopes E. A., Freitas, L.G., 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. Rev. trop. Cie. Ag. Biol. 2, 15-21.

Filho, F. S. M., Pereira, D. I. B., Vieira, J. N., Berne, M. E. A., Stoll, F. E., Nascente, P. S., Pötter, L. 2013 in press Ovicidal activity on *toxocara canis* eggs. Rev. Iberoam. Micol.

Frassy, L. N., Braga, F. R., Silva, A. R., Araújo, J. V., Ferreira, S. R., Freitas, L.G., 2010. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. Ver. Soc. Bras. Med. Trop. 43, 102-104.

Freitas, M. A., Pedroza, E. M. R., Mariano, R. L. R., Maranhão, S. R. V. L., 2012. Seleção de *Trichoderma* spp como potenciais agentes de *Meloidogyne incognita* em cana-de-açúcar Nema. 42, 115-122.

- Grønkvold, J., Henriksen, S. A., Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., 1996. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet. Parasitol.* 64, 47-64.
- Holyoake, C. S., 2008. A national study of gastrointestinal parasites infecting dogs and cats in Australia. Ph.D. Thesis, school of Veterinary and Biomedical Sciences, Murdoch University, Western Australia, Australia. 184pp (thesis in english)
- Homero, H. Q. 1 (1 ed), 1984. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*-Limusa.
- Huang, X., Zhao, N., Zhang, K., 2004. Extracellular enzymes serving as factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Res. Microbiol.* 155, 811–816.
- Katagiri, S. & Oliveira-sequeira, T. C. G., 2007. Zoonoses causadas por parasitas intestinais de cães e o problema do diagnóstico. In: *Arq. Inst. Biol.* 74, 175-184.
- Khan, A., Williams, K. L., Nevalainen, H. K. M., 2004. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Meloidogyne javanica juveniles*. *Biol. Control.* 31, 346–352.
- Labruna, M. B., Pena, H. F. J., Souza, S. L. P., Pinter, A., Silva, J. C. R., Ragozo, A. M. A., Camargo, L. M., Gennari, S. M., 2006. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arq. Inst. Biol.* 73, 183-93.
- Maciel, A. S., Araújo, J. V., Campos, A. K., Lopes, E. A., Freitas, L. G., 2009. Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. *Vet. Parasitol.* 161, 239-247.
- Maciel, A. S., Freitas, L. G., Campos, A. K., Lopes, E. A., Araújo, J. V., 2010. The Biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm, *Vet. Parasitol.* 173, 262-270.
- Mahdy, M. AK., Lim, Y. AL., Ngui, R., Fatimah, MR. S., Choy, S. H., Yap, N. J., AL. Mekhhaf, H. M., Ibraim, J., Junin, J., 2012. Prevalence and zoonotic potencial of canine hookworms in Malásia. *Biomed.* 5, 1-7.
- Mansfield, L. S., Gamble, H. R., Fetterer, R. H., 1992. Characterization of the eggshell of *Haemonchus contortus* I. Structural components. *Comp. Biochem and Physiology.* 103, 681–686.
- Morton, C. O., Hirsch, P. R., Kerry, B. R., 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi –a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematol.* 6, 161-170.

- Patrício, F. R. A., Kimati, H., Neto, J. T., Petenatti, A., Barros, B. C., 2007. Efeito da solarização do solo, seguida pela aplicação de *Trichoderma* spp. ou de fungicidas, sobre o controle de *Pythium aphanidermatum* e de *Rhizoctonia solani* AG-4. Summa Phytopathol., Botucatu. 33, 142-146.
- Robertson, I. D., Irwin., P. G., Lymbery, A. J., Thompson, P. C., 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. Int. J. Parasitol. 30, 1369-1377.
- Romão-Dumaresq, A. S., De Araújo, W. L., Talbot, N. J., Thornton, C. R., 2012. RNA Interference of Endochitinases in the Endophyte *Trichoderma virens* Reduces Its Fitness as a Biocontrol Agent of Pineapple Disease Sugarcane. Am. J. Exp. 7, 1-10.
- Santin, R. C. M., 2008. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris*. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 91pp. (thesis in portuguese).
- Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G. J., Spiegel, Y., 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. Eur J Plant Pathol. 118, 247–258.
- Soares, F. E. F., Braga, F. R., Araujo, J. V., Lima, W. S., Lanuse, R. M., Queiroz, J. H. Q., 2012. In vitro from of a serine protease *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*. Parasitol Research. 110, 2423-2427.
- Sommerfelt, I. E., Cardillo, N., López., Cribicich, M., Gallo, C., Franco, A., 2006. Prevalence of *Toxocara cati* and other parasites in cats faeces collected from the open spaces of public institutions: Buenos Aires, Argentina. Vet Parasitol. 140, 296-301.
- Sowermimo, O. A., 2009. The prevalence and intensity of gastrointestinal parasites of dogs in Ile-Ife, Nigeria. J. Helminthol. 83, 27–31.
- Tikhonov, V. E., López-Illorca, L. V., Salinas, J., Jansson, H. B., 2002. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. Fungal Genet. and Biol. 35, 67–78.
- Wang, C. R., Qiu, J. H., Zhao, J. P., Xu, L. M., Yu, W. C., Zhu, X. Q., 2006. People's Republic of. Prevalence of helminthes in adult dogs in Heilongjiang Province, the

China. Parasitol. Res.99, 627–630.

Yang, J., Tian, B., Liang ,L., Zhang, K., 2007. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi .Appl. Microbiol Biotechnol.75, 21-31.

5 CONCLUSÃO GERAL

Diante das condições experimentais do presente estudo, conclui-se que:

O padrão de contaminação ambiental por parasitos com potencial zoonótico na cidade de Pelotas/RS evidencia uma prevalência geral de 57,6%. *Ancylostoma* spp. é o parasito de maior prevalência (88,4%), sendo seguido por *Trichuris vulpis* (38,8%). O grau de infecções enteroparasitárias em cães observado neste estudo enfatiza o risco de zoonoses e a necessidade de ações educativas para conscientização da população e adoção de medidas de controle e prevenção.

O emprego dos extratos enzimáticos (macerado bruto, macerado filtrado, extrato bruto e extrato filtrado) dos fungos *P. lilacinus*, *T. harzinum* e *T. virens* reduz significativamente a eclosão de ovos de *Ancylostoma* spp. em 24 horas de exposição. Assim, os isolados fúngicos testados se constituem em promissores agentes de controle biológico de ovos de geohelmintos no ambiente.

6 REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Washington: Organizacion Panamericana de La Salud; 1986.

AGRIOS, G. N. Plant Pathology. San Diego: Academic Press, p.635, 1997.

ALMEIDA, A. B. F.; SOUSA, V. R. F.; DALCIN, L.; JUSTINO, C. H. S. Contaminação por fezes caninas das praças públicas de Cuiabá, Mato Grosso. Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science, v.44, n.2, p.132-136, 2007.

ANDRESIUK, M. V.; DENEGRI, G. M.; ESARDELLA, N. H.; HOLLMANN, P. Encuesta coproparasitológico canina realizado em plazas publicas de La ciudad de Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Parasitologia Latino americana, v. 58, p.17-22, 2003.

ARAÚJO, A. Origem dos ancilostomídeos parasitos do homem. In: Paleoparasitologia no Brasil. Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, p.138-143, 1988.

ARAÚJO, J. V. Interação entre larvas infectantes de *Cooperia punctata* e fungos predadores do gênero *Arthrobotrys*, caracterização de isolados de *Arthrobotrys* e seu uso no controle biológico de nematódeos parasitos gastrintestinais de bovinos. 1996. 110f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ARAÚJO, F. R.; ARAÚJO, C. P.; WERNECK, M. R.; GÓRSKI, A. Larva *migrans* cutânea em crianças de uma escola em área do Centro-Oeste do Brasil. Revista de Saúde Pública, v.34, n.1, p.84-85, 2000.

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. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.13, n.2, p.65-71, 2004a.

ARAÚJO, J. V.; MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.13, n.0, p.165-169, 2004b.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. A. Efeito antagônico de fungos predadores dos gêneros *Monacrosporium*, *Arthrobotrys* e *Duddingtonia* sobre larvas infectantes do *Cooperia* sp. e *Oesophagostomum* sp. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.58, n.3, p.373-380, 2006.

ARAÚJO, V. J. Helmintoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. Revista Ceres, Viçosa, v.53, n.307, p.363-365, 2006.

ARAUJO, J. V.; BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. M.; TAVELA, A. O. In vitro evaluation of the nematophagous fungi *Duddigtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris sunn*. Parasitology Research, v.102, p.787-790, 2008.

ARAUJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R.; CAMPOS, A. K. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. Experimental Parasitology, v.121, p.338-341, 2009.

BARGER, I. A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. International Journal Parasitology, v.29, p.41-47, 1999.

BASUALDO, J. A.; CIARMELA, M. L.; SARMIENTO, P.L.; MINVIELLE, M. C. Biological activity of *Paecilomyces* genus against *Toxocara canis* eggs. Parasitology Research, v.86, p.854-859, 2000.

BLAZIUS, R. D.; EMERICK, S.; PROPHIRO, J. S.; ROMÃO, P. R. T.; SILVA, O. S. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de cães errantes da cidade de Itapema, SC. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Uberaba, v.38, n.1, p.73-74, 2005.

BONANTS, P. J. M., FITTERS, P. F. L., THIJS, H.; DEN BELDER, E.; WAALWIJK, C.; HENFLING, J. W. D. M. A basic serine protease from *Paecilomyces lilacinus* with biological activity against Meloidogyne hapla eggs. Microbiology, v.141, p.775-784, 1995.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K. Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, p. 356-358, 2007.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; ARAÚJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; SILVA, A. R. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.41, n.6, 2008.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. M.; CAMPOS, A. K.; TAVELA, A. O. Ação in vitro dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (Duddington, 1955), *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) e *Pochonia chlamydosporia* (Gams & Zare, 2001) sobre ovos de *Eurytrema*

coelomaticum (Giard & Billet, 1892). Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v.76, n.1, p.131-134, 2009.

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

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; SOARES, F. E. F.; GENIÊR, H. L. A.; LIMA, W. S.; MOZZER, L. R.; QUEIROZ, J. H. Atividade larvicida do extrato bruto enzimático do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.44, n.3, 2011a.

BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; SOARES, F. E. F.; QUEIROZ, J. H.; GENIÊR, H. L. A. Ação do extrato bruto enzimático do fungo *Pochonia clamydosporia* sobre ovos de *Ancylostoma* spp. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.44, n.1, 2011b.

CAPUANO, D. M.; ROCHA, G. M. Ocorrência de parasitas com potencial zoonótico em fezes de cães coletadas em áreas públicas do município de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Revista Brasileira de Epidemiologia, v.9, p.81-86, 2006.

CARNEIRO, R. M. D. G. Etude des possibilités d'utilisation du champignon nematophage *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson, 1974, comme agent de lutte biologique contre meloidogyne arenaria (Neal, 1889), Chitwood, 1949. 1986. 119f. Tese (Doutorado)-Universite des Sciences et Techniques du Languedoc, Paris.

CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; TAVELA, A. O. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* spp. evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. Journal Helminthology, v. 83, p.1-6, 2009.

CIARMELA, M. L.; BASUALDO, F.; BASUALDO, J. A. Biological control of *Paecilomyces lilacinus* genus against *Toxocara canis* eggs. Parasitology Research, v.86, n.1, p.854-859, 2000.

CORDEIRO, L. N. Efeito in vitro de extratos etanólicos da raiz de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e das folhas de melão-de-são-caetano (*Momordica charantia* L.) sobre ovos e larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos. 2008. 63f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)–Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

CÔRTEZ, V. A.; PAIN, G. V.; FILHO, R. A. A. Infestação por ancilostomídeos e toxocarídeos em cães e gatos apreendidos em vias públicas, São Paulo (Brasil). Revista de Saúde Pública, v. 22, n.4, p.341-343, 1988.

CROMPTON, D. W. The public health importance of hookworm disease. Parasitology, v. 121. p.39-50. 2000.

DACKMAN, C.; CHET, I.; NORDBRING-HERTZ, B. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii* infection and enzymatic activity. FEMS Microbiology Ecology, v.62, n.1, p.151-156, 1989.

DANTOFF, L. E.; NEMEC S.; K. PERNEZNY. Biological control of *Fusarium crown* band root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus* intraradices. Biological Control, v.5, p.427-431, 1995.

DE LA CRUZ, J.; HIDALGO-GALLEGO, A.; LORA, J. M.; BENÍTEZ, T.; PINTOR-TORO, J. A.; LLOBELL, A. Isolation and characterization of three chitinases from *Trichoderma harzianum*. European Journal Biochemistry, v.206, p.859-867, 1992.

DIMANDER, S. O.; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastrointestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. Veterinary Parasitology, v.111, n.2/3, p.192-209, 2003.

DUNN, M.; SAYRE, R. M.; WERGIN, W. P. Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson as observed with scanning electron microscope. Scanning Electron Microscopy, p.1351-1357, 1982.

FERNANDEZ, M. F. Avaliação da ação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma ceylanicum*. 2011. 44f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FORTES, E. Parasitologia Veterinária – 3.ed. São Paulo: Ícone, 1997. p.307-310.

FREIRE, F. C. O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juvenis of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. Fitopatologia Brasileira, v.10, n.3, p.557-596, 1985.

FREITAS, M. G. Helminologia Veterinária. Copiadora e Editora Rabelo & Brasil Ltda, 3.ed., Belo Horizonte, p. 396, 1977.

FREITAS, L. G.; FERRAZ, S.; ALMEIDA, A. M. S. Controle de *Meloidogyne javanica* em tomateiro pela produção de mudas e substrato infestado com *Paecilomyces lilacinus*. Nematologia Brasileira, Brasília, v.23, n.1, p.65-73, 1999.

FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L.; FERRAZ, S. Introdução à nematologia. Universidade Federal de Viçosa, p.57-59 (Caderno Didático, 58), 2006.

GENNARI, S. M.; KASAI, N.; PENA, H. F. J.; CORTEZ, A. Ocorrência de protozoários e helmintos em amostras de fezes de cães e gatos da cidade de São Paulo. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v.36, p.87-91, 1999.

GIROTO, M. J.; AQUINI, L. F. B.; PEREZ, R. B.; NEVES, M. F.; SACCO, S. R. O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides parasitas revisão de literatura. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, n.10, 2008.

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

GRAMINHA, E. B. N.; MONTEIRO, A. C.; SILVA, H. C.; OLIVEIRA, G. P.; COSTA, A. J. Controle de nematoides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília, v.40, n.9, p.927-933, 2005.

GRØNVOLD, J.; HENRIKSEN, S. A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminthes of domesticated animals. Veterinary Parasitology, v. 64, n.1-2, p.47-64, 1996.

GUIMARÃES, L. C.; SILVA, J. H.; SAAD, K.; LOPES, E. R.; MENESES, A. C. O. Larva *migrans* within scalp sebaceous gland. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.32, p.187-189, 1999.

HEUKELBACH, J.; WILCKE, T.; FELDMEIER, H. Cutaneous larva *migrans* (creeping eruption) in an urban slum in Brazil. Internacional Journal Dermatology, v.43, p.511–515, 2004.

HOMERO, H. Q. Parasitología y enfermedades parasitárias de animales domésticos. 1ed. México, Limusa, 1984. 876p.

HOWELL, C. R. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control diseases. Phytopatology, Lancaster, v.96, p.178-180, 2006.

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

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. Microbiology, v.141, p.2823–2829, 1995.

JACKSON, A.; HEUKELBACH, J.; CALHEIROS, C. M.; SOARES, V. L.; HARMS, G. FELDMEIER, H. A study in a community in Brazil in which cutaneous larva *migrans* is endemic. Clinical Infectious Diseases, v.43 p.13–18, 2006.

JANSSON, H. B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection mechanisms in the fungus nematode system. In: POINAR, G. O.; JANSSON, H. B. Diseases of nematode, v.II. CRC Press, Boca Raton, p.1-72, 1988.

KATAGIRI S, OLIVEIRA-SEQUEIRA T. C. G. Prevalence of dog intestinal parasites and risk perception of zoonotic infection by dog owners in São Paulo State, Brazil. Zoonoses Public Health. v.55, p.406-413, 2008.

KERRY, B. R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematode. *Journal of Nematology*, v.22, n.45, p.621-631, (Supplement) 1990.

KERRY, B. R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, v.38, n.1, p.323-441, 2000.

KHAN, A.; WILLIAMS, K.L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggs hell structures and hatching of *Meloidogyne javanica* juveniles. *Biological Control*, v.31, p.346 – 352, 2004.

LABRUNA, M. B.; PENA, H. F. J.; SOUZA, S. L. P.; PINTER, A.; SILVA, J. C. R.; RAGOZO, A. M. A.; CAMARGO, L. M.; GENNARI, S. M. Prevalência de endoparasitas em cães da área urbana do município de Monte Negro, Rondônia. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, n.2, p.183-93, 2006.

LARSEN M. Biological control of helmintos. *Internacional Journal of Parasitology*, v.29, p.139–46, 1999.

LOHMANN, T. R.; FILHO, J. M.; PAULINO, B. V.; YAMAMOTO, S.; LOPES, R. B.; Efeito da aplicação de *Trichoderma harzianum* na supressão de doenças e no desenvolvimento de mudas de eucalipto. *Revista Brasileira De Agroecologia*.v.4,n 2, 2009.

LYSEK, H.; CHALUPOVÁ, V. Quantitative determination of activity of ovicidal fung. *Acta University Palackianae Olomucensis*, 1978.

MACIEL, H. S.; ARAÚJO, J. V.; CECON, P. R. Atividade predatória in dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.15, n.2, p.71-75, 2006.

MACIEL, A. S.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; FREITAS, L. G. Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. *Veterinary Parasitology*, v.161, p.239-247, 2009.

MACIEL, A. S.; FREITAS, L. G.; CAMPOS, A. K.; LOPES, E. A.; ARAÚJO, J. V. The Biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm, *Veterinary Parasitology*, v.173, p.262-270, 2010.

MACLENNAN, J. D.; MANDL, I.; HOWES, E. L. Bacterial digestion of collagen. *The Journal Clinical Investigation*, v.32, p.1317–1322, 1953.

MANKAU, R. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Annual Review Phytopathology*, Palo Alto, v.18, p.415-440, 1980.

MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; BRAÚNA, L. M.; PÁDUA, R. R.; GOMES, D. Cepas de *Trichoderma* para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad* v.11, n.1, p.3-9, 2007.

MOHAMED, H. A. L. A.; HAGGAG, W. M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. Brazilian Journal of Microbiology. v.37, n.2, p.181-191, 2006.

MORGAN-JONES, G.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Infections events in the fungus-nematode system. In: Poinar O. G. & Borne J. H. (ed.) Diseases of Nematodes. CRC Press, Boca Raton, Florida, p.59-62, 1988.

MORO, F. C. B.; PRADEBON, J. B.; SANTOS, H. T.; QUEROL, E. Ocorrência de *Ancylostoma* e *Toxocara* em praças e parques públicos dos municípios de Itaquí e Uruguaiana, fronteira oeste do Rio Grande do Sul. Biodiversidade Pampeana, v.6, n.1, p.25-29, 2008.

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

NAIME, M. F. Isolamento de fungos com atividade nematófaga em solo paranaense. 2009. 63f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Parasitologia Humana. 11 ed., São Paulo, Atheneu, 2007. 494p.

NUNES, H. T.; MONTEIRO, A. C.; POMELA, A. W. V. Uso de agentes microbianos e químicos para o controle de *Meloidogyne incógnita* em soja. Acta Scientiarum Agronomy, v.32, n.3, 2010.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; AMARANTE, A. F. T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. Veterinary Parasitology, v.103, p.19-27, 2002.

PROCIV, P.; CROESE, J. Human eosinophilic enteritis caused by a dog *Ancylostoma caninum*. Lancet. v.335. p.1299-1302, 1990.

RAMÍREZ-BARRIOS, R. A.; BARBOZA-MENA, G.; ANGULO-CUBILLÁN, F.; MUÑOZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; GONZÁLEZ, F.; ESCALONA, F. Prevalence of intestinal parasites in dogs under veterinary care in Maracaibo, Venezuela. Veterinary Parasitology, v.121, p.11-20, 2004.

RIBEIRO, R. R. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. 2003. 43f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

RIBEIRO, V. M. Controle de Helmintos de Cães e Gatos, XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latinoamericano de Ricketisioses. Ouro Preto, Minas Gerais, Revista Brasileira de Parasitologia, v.13, Suplemento I, 2004.

ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P.G.; LYMBERG, A. J.; THOMPSON, P.C. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, v.30, p.1369-1377, 2000.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S.; DE ARAÚJO, W. L.; T., NICHOLAS J.; THORNTON, C. R. RNA interference of endochitinases in the sugarcane endophyte *Trichoderma virens* 223 reduces its fitness as a biocontrol agent of pineapple disease. *Plos One*, v. 7, p.47-50, 2012.

RUBEL, D. WISNIVESKY, C. Magnitude and distribution of canine fecal contamination and helminth eggs in two areas of different urban structure, Greater Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.133, p.339-347, 2005.

SCAINI, C. J.; TOLEDO, R.; LOVATEL, R.; DIONELLO, M A.; GATTI, F A.; SUSIN, L.; SIGNORINI, V. R. M. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central de Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.36, n.5, p.617-619, 2003.

SCHENCK, S.; CHASE, T.J.; ROSENZWEIG, W. D.; PRAMER, D, Collagenase production by nematode-trapping fungi. *Applied an Enviromental Microbiology*, v.40, p.567-570, 1980.

SCHICKLER, H.; HARAN, S.; OPPENHEIM, A.; CHET, I. Induction of the *Trichoderma harzianum* chitinolytic system is triggered by the chitin monomer N-acetylglucosamine. *Mycological Research*, v.102, p.1224–1226, 1998.

SIVAN, A. Biological control of Fusarium crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease*, v.71, n.7, p.587–592, 1987.

SIVAN, A.; CHET, I. Biological control of *Fusarium* spp. in cotton, wheat and muskmelon by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, v.116, n.39–47, 1986.

SOARES, F. E. F.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; LIMA, W. S.; LANUSE, R. M.; QUEIROZ, J. H. Q. In vitro from of a serine protease *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylos vasorum*. *Parasitology Research*, v.110, p. 2423-2427, 2012.

SOMMERFELT, I. E., CARDILLO, N., LÓPEZ, C., RIBICICH, M., GALLO, C., FRANCO, A. Prevalence of *Toxocara cati* and other parasites in cats faeces collected from the open spaces of public institutions: Buenos Aires, Argentina. *Veterinary Parasitology*, v.140, p.296-301, 2006.

SOULSBY, E. J. L. Helminthes, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. 7.ed. London: Bailliere & Tindall, p 809, 1982.

SOWERMIMO, O. A. The prevalence and intensity of gastrointestinal parasites of dogs in Ile-Ife, Nigeria. *Journal Helminthology*, v.83, p.27–31, 2009.

STROMBERG, B. E. Enviromental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology*, v.72, p.247-264, 1997.

STROMBERG, B. E.; AVERBECK, G. A. The role of parasite epidemiology in the management of grazing cattle. *Internacional Journal Parasitology*, v.29, p.33-39, 1999.

SUAREZ, V. H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. *Veterinary Research*, v.33, p.563-573, 2002.

TIKHONOV, V. E.; LÓPEZ-LLORCA, L. V.; SALINAS, J.; JANSSON, H. B. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genetics and Biology*, v.35, p.67–78. 2002.

TOSI, S.; ANNOVAZZI, L. P.; TOSI, I.; IADOLA, P.; CARRETA, G. Collagenase production in an antartic strain of *Arthrobotrys totor* Jarowaja. *Mycopathologia*, v.153, p.157-162, 2001.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUCAN, J. L. *Parasitologia Veterinária*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 1998. 273p.

VELHO, P. E. N. F.; FARIA, A. V.; CINTRA, M. L. Larva *Migrans*: a case report and review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.45, n.3, p.167-171, 2003.

WALLER, P. J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENESSY, D. R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v.51, p 289-299, 1994.

WANG, C. R.; QIU, J.; ZHAO, J. P.; XU, L. M.; YU, W. C.; ZHU, X. Q. Prevalence of helminthes in adult dogs in Heilongjiang Province, the People's Republic of China. *Parasitology Research*, v.99, p.627–630, 2006.

YANG, J.; TIAN, B.; LIANG, L.; ZHANG, K. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.75, p.21-31, 2007.