

TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR COM FUNGOS NEMATÓFAGOS FRENTE À ANTIPARASITARIOS

FERREIRA, Gracialda Ferreira de¹; FREITAS, Thayline Machado²; VIEIRA, Juliana Nunes ³; ARAÚJO, Flávia Biasóli de ⁴; FURTADO, Josiara Mendes⁵; Esteves, Isabel de Abreu ⁶; VIEIRA, Viviane Seixas ⁷; NASCENTE, Patrícia da Silva⁸.

¹ Graduanda do Curso de Medicina Veterinária, UFPel, Bolsista PIBIC/CNPq; ² Graduanda do Curso de Medicina Veterinária; ³ Doutoranda do Programa de Pós-graduação de Parasitologia IB; ⁴ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Veterinária; ⁵ Mestranda do programa de Pós Graduação de Ciências Veterinárias-UFRGS; ⁶ Graduanda da Faculdade de Enfermagem e Obstetrícia; ⁷ Graduanda do curso de Biologia; ⁸ Prof.^a de Microbiologia/ Instituto de Biologia (IB), Departamento de Microbiologia e Parasitologia
e-mail: graci.f.ferreira@bol.com.br.

1 INTRODUÇÃO

O parasitismo gastrointestinal de nematódeos é um fator limitante nos sistemas de produção de animais criados a campo (WAGHORN et al., 2003). Diversos programas de controle vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de minimizar os efeitos adversos das endoparasitoses na produção extensiva de ruminantes. Entre eles, pode-se destacar o uso de compostos anti-helmínticos que têm focado a diminuição de larvas infectantes na pastagem por meio da diminuição da população de parasitos adultos nos animais. Entretanto, apesar de os compostos antiparasitários serem utilizados como uma das principais ferramentas, seu uso possui algumas limitações, tais como: resíduos de drogas em produtos de origem animal (PADILHA, 1996), efeitos tóxicos em organismos não alvos no meio ambiente (STRONG et al., 1996) e resistência anti-helmíntica (KAPLAN, 2004).

A utilização de agentes biológicos com atuação sobre ovos e larvas de nematoides gastrointestinais, como alternativa para higienização das pastagens, tem sido intensificada nos últimos anos. Os fungos nematófagos são os microrganismos mais estudados com este objetivo (GRAMINHA et al, 2005). Esses fungos vivem na matéria orgânica do solo, onde desenvolveram relações parasíticas ou predatórias com os nematoides, e são classificados como ovicidas, endoparasitas e predadores (BARRON, 1977). Desse modo, o uso de várias espécies de fungos nematófagos que infectam as formas larvárias dos parasitos na pastagem tem sido muito estudado, como alternativa no controle biológico dos nematódeos de ruminantes (SAUMELL & FERNÁNDEZ, 2000).

A resistência à passagem pelo trato gastrointestinal é uma característica importante em fungos nematófagos, quando se tem em vista a possibilidade de desenvolver formulações de uso oral que permitam o controle biológico (GRAMINHA et al, 2005). E o sucesso desses programas de controle utilizando fungos depende da sobrevivência dos conídios no meio ambiente, que pode ser alterada por fatores climáticos, biológicos ou por produtos químicos. Hoje em dia, nas ciências agrárias, experimentos têm sido conduzidos no sentido de se verificar o efeito de produtos químicos sobre fungos entomopatogênicos (BARCI et al., 2009).

Previamente, VIEIRA (2012) verificou através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) baseada no documento do CLSI (2008), a suscetibilidade *in vitro* dos fungos nematófagos *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces marquandii* e *Paecilomyces*

variotii frente aos fármacos antiparasitários albendazol, tiabendazol, ivermectina, levamisol e closantel, onde os resultados mostraram que todos os fármacos antiparasitários testados, tiveram efeito inibitório *in vitro* sobre os fungos nematófagos, podendo comprometer suas ações como bioagentes de controle biológico.

Devido às várias pesquisas nesta área e o pouco que se sabe sobre a ação do tratamento com anti-helmínticos concomitante ao controle biológico, este trabalho tem como objetivo testar *in vitro* a ação dos fármacos ivermectina e albendazol sobre os fungos nematófagos *Arthrobotrys oligospora*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Paecilomyces lilacinus*, *Paecilomyces variotii* através da técnica de difusão em ágar.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

As amostras fúngicas analisadas foram obtidas através do CENARGEN (Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia)- EMBRAPA (Distrito Federal) e os fármacos testados, ivermectina e albendazol, foram adquiridos de seu fabricante na formulação de uso comercial.

Para o teste de suscetibilidade foram utilizadas amostras dos fungos nematófagos *Arthrobotrys oligospora*, *P. fumosoroseus*, *P. lilacinus*, *P. variotii*, frente aos dois antiparasitários citados.

Para a preparação dos fármacos utilizou-se a metodologia de antifungigrama com fungos filamentosos baseado no documento CLSI (2008) adaptada aos fungos nematófagos e fármacos antiparasitários onde se preparou uma concentração inicial de 0,0016g/mL.

Para cada fungo testado, utilizou-se três placas de Petri contendo Potato Dextrose Ágar (PDA), a primeira, considerada controle positivo contendo ágar PDA (20ml), a segunda contendo PDA (19mL) + antiparasitário (1ml) (80µg/ml) e outra com PDA (18ml)+ antiparasitário (2ml) (160µg/ml), após a semeadura do fungo, as placas foram incubadas á 25°C por até sete dias.

As leituras dos resultados foram realizadas no 3º, 5º e 7º dia após a semeadura dos fungos, medindo o diâmetro do crescimento fúngico em cada placa, com concentrações distintas comparadas ao crescimento no controle positivo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados observados, considerando a média das medidas das três leituras, diferiram entre os fármacos testados como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Crescimento de fungos nematófagos (média) em placas com Ágar batata contendo os antiparasitários albendazol e ivermectina.

Fungo nematófago/ Antiparasitário	Ivermectina			Albendazol		
	Controle	1mL 80µg/mL	2mL 160µg/ml	Controle	1mL 80µg/mL	2mL 160µg/ml
<i>P. variotii</i>	8 cm	4,96 cm	SC	5 cm	1,06 cm	SC
<i>P.fumosorosus</i>	7cm	2,63 cm	SC	8 cm	2,83 cm	SC
<i>P.lilacinus</i>	4,16 cm	3,7 cm	SC	4,8 cm	1,9 cm	SC
<i>Arthrobotrys</i>	NR	NR	NR	7,33 cm	4,7 cm	SC

NR – não realizado

SC- sem crescimento

Os resultados demonstraram que na concentração de 80µg/mL dos antiparasitários todos os fungos testados reduziram seu crescimento, no entanto, na concentração de 160µg/ml dos antiparasitários não houve nenhum crescimento fúngico em sete dias, comparando ao controle onde ocorreu o crescimento do fungo. Poucos trabalhos têm sido realizados com ênfase na ação *in vivo* e *in vitro* dos fármacos diante de fungos nematófagos. Resultados semelhantes com inibição de fungos foi demonstrado por VIEIRA, (2012) que pela técnica de microdiluição obteve as CIMs variando de 4 a 0,031µg/mL para albendazol e ivermectina, dependendo do fungo testado.

4 CONCLUSÃO

Sabendo-se destes resultados se faz necessários testes com outros antiparasitários e pesquisas com sua atuação *in vivo*.

Os resultados mostram que todos os fármacos antiparasitários testados, tiveram efeito inibitório *in vitro* sobre os fungos nematófagos, podendo comprometer suas ações como bioagentes de controle biológico.

5 REFERÊNCIAS

- BARCI, L. A. G; WENZEL, I. M.; ALMEIDA, J. E. M.; NOGUEIRA A. H. C.; PRADO, A. P. Compatibilidade de isolados de *Beauveria bassiana* (Ascomycetes: Clavicipitaceae) com carrapaticidas químicos utilizados no controle do carrapato dos bovinos. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 18, supl. 1, p. 63-68, 2009.
- BARRON, G.L. The nematode-destroying fungi. Ontario: **Canadian Biological**, 1977. 140p.
- GRAMINHA, Érika Barbosa Neves; MONTEIRO, Antonio Carlos; DA SILVA, Heloísa Cristina; OLIVEIRA, Gilson Pereira; DA COSTA Alvimar José. Controle de nematóides parasitos gastrintestinais por *Arthrobotrys musiformis* em ovinos naturalmente infestados mantidos em pastagens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.9, p.927-933, set. 2005.
- GRØNVOLD, J. et al. Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamyospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. **Journal of Helminthology**, v.70, n.4, p.291-297, 1996.
- KAPLAN, R.M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v.20, n.10, p.477-481, 2004.
- LARSEN, M.; WOLSTRUP, J.; HENRIKSEN, S.A.; DACKMAN, C.; GRØNVOLD, J.; NANSEN, P. In vitro stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. **Journal of Helminthology**, v.65, p.193-200, 1991.
- MOTA, M. A.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V.; Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesq. Vet. Bras.** v. 23, n. 3, p. 93-100, 2003.
- PADILHA, T. Resíduos de anti-helmínticos na carne e leite. In: Padilha, T. (Ed.). Controle dos nematódeos gastrintestinais em ruminantes. Coronel Pacheco: **EMBRAPA, CNPGL**, 1996. p.77-93.
- SAUMELL, C.A.; FERNÁNDEZ, A.S. Hongos nematófagos para el control biológico de nemátodos parásitos de rumiantes. **Revista de Medicina Veterinaria**, v.81, n.4, p.270-273, 2000.

STRONG, I. et al. The effect of faecally excreted ivermectin and febendazole on the insect colonization of cattle dung following the oral administration of sustained release boluses. **Veterinary Parasitology**, v.62, n.3-4, p.253-266, 1996.

VIEIRA, Juliana Nunes. **Suscetibilidade de fungos nematófagos frente a fármacos antiparasitários. 2012.** Dissertação de Mestrado em Parasitologia-Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

WAGHORN, T.S. et al. Efficacy of the nematode-trappingfungus *Duddingtonia flagrans* against three species of gastrointestinal nematodes in laboratory faecal cultures from sheep and goats. **Veterinary Parasitology**, v.118, n.-4, p. 227- 234, 2003.