



Avaliação do fungo *Duddingtonia flagrans* e hipoclorito de sódio a 5% sobre a eclodibilidade de ovos de ciatostomíneos

[Evaluation of the fungus *Duddingtonia flagrans* and 5% sodium hypochlorite on the hatchability of eggs of cyathostomins]

“Artigo Científico/Scientific Article”

Fabricio Barcelos Calazans¹ , Carolina Magri Ferraz¹ , Thais Schimidt Ferreira¹ , Pedro Henrique Dutra dos Santos¹ , João Pedro Barbosa de Assis¹ , Felipe Boniedj Ventura Alvares² , Jackson Victor de Araújo³ , Debora Castro de Souza⁴ , Filipe Elias de Freitas Soares⁴ , Vinícius Longo Ribeiro Vilela^{2*} , Fabio Ribeiro Braga¹ 

¹Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico, Universidade Vila Velha, Vila Velha-ES, Brasil.

²Departamento de Medicina Veterinária, Instituto Federal da Paraíba, Sousa-PB, Brasil.

³Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, Brasil.

⁴Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil.

*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: vinicius.vilela@ifpb.edu.br

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes concentrações de conídios do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% (v/v) sob a eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de equinos. Foram formados cinco grupos experimentais: Grupo 1 (3 x 10⁶ conídios de AC001 + 20 g de fezes), Grupo 2 (6 x 10⁶ conídios de AC001 + 20 g de fezes), Grupo 3 (9 x 10⁶ conídios de AC001 + 20 g de fezes), Grupo 4 (5 mL de hipoclorito de sódio 5% (v/v) + 20 g de fezes) e Grupo 5 (5 mL de água destilada + 20 g de fezes). Em seguida, as coproculturas foram incubadas por 10 dias no escuro 26 ± 1° a 2°C e, posteriormente, procedeu-se a recuperação de larvas infectantes (L3) de nematódeos por meio da técnica de Baermann. Ao final do período experimental, constatou-se a presença absoluta de L3 de nematódeos ciatostomíneos. Os resultados demonstraram que houve redução significativa (p<0,01) na recuperação de L3 em todos os grupos tratados com o AC001 (G1, G2 e G3) e também com o hipoclorito de sódio a 5% (v/v) (G4) em relação ao grupo controle (G5). Notou-se que não houve diferença (p>0,01) entre as três concentrações de conídios testadas nos grupos G2 e G3. Conclui-se que o fungo *D. flagrans* e o hipoclorito de sódio a 5% (v/v) foram eficientes na redução de L3 de nematódeos gastrintestinais nas coproculturas, podendo esse resultado ser utilizado em futuros delineamentos experimentais.

Palavras-chave: Ciatostomídeos; coproculturas; desinfetantes; equídeos; fungo nematófago.

Abstract

The aim of this study was to assess various concentrations of conidia from the fungus *Duddingtonia flagrans* (AC001) and sodium hypochlorite (NaOCl) at a 5% (v/v) solution in relation to the hatching of equine gastrointestinal nematode eggs. Five experimental groups were established: Group 1 (3 x 10⁶ conidia of AC001 + 20 g of feces), Group 2 (6 x 10⁶ conidia of AC001 + 20 g of feces), Group 3 (9 x 10⁶ conidia of AC001 + 20 g of feces), Group 4 (5 mL of sodium hypochlorite at 5% (v/v) + 20 g of feces), and Group 5 (5 mL of distilled water + 20 g of feces). The coprocultures were then incubated for 10 days in the dark at a temperature of 26 ± 1° to 2°C. Subsequently, infective larvae (L3) of nematodes were recovered using the Baermann technique. At the end of the experimental period, the absolute presence of cyathostomin nematodes' L3 was confirmed. The results demonstrated a significant decrease (p<0.01) in L3 recovery in all groups treated with AC001 (G1, G2, and G3) as well as with 5% (v/v) sodium hypochlorite (G4) compared to the control group (G5). No significant difference (p>0.01) was observed between the three concentrations of conidia tested in groups G2 and G3. In conclusion, both the fungus *D. flagrans* and 5% (v/v) sodium hypochlorite effectively reduced L3 counts in stool cultures, suggesting their potential use in future experimental designs.

Keywords: Cyathostomines; coprocultures; disinfectants; horses; nematophagous fungus

Recebido 19 de julho de 2023. Aceito 10 de outubro de 2023.

DOI: <https://doi.org/10.26605/medvet-v17n4-6042>



Introdução

No Brasil a população de equinos é de aproximadamente 5.962.126 animais, conferindo ao país o terceiro lugar em número de animais na América latina (IBGE, 2023). Contudo, no país e no mundo, devido aos diferentes sistemas de criação destes animais e, porventura, seus hábitos alimentares, as infecções por nematódeos gastrintestinais são frequentes e apresentam-se como um sério entrave na equideocultura (Braga et al., 2009; Kaplan et al., 2012; Tzelos et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Nielsen et al., 2018). Ressalta-se, contudo, o problema da resistência química parasitária presente e a busca por pesquisas que visem um controle parasitário sinérgico (químico + biológico) mais efetivo (Braga et al., 2009; Tavela et al., 2013; Nielsen et al., 2018; Junco et al., 2023). Por outro lado, em relação à utilização de desinfetantes, em especial o hipoclorito de sódio, poucos são os relatos que elucidam a sua eficácia frente à descontaminação ambiental de formas imaturas de nematódeos gastrintestinais (Motta et al., 2022). Neste sentido, são bem-vindas pesquisas que visem ações conjuntas para o impedimento do desenvolvimento dos ciclos parasitários de nematódeos parasitos gastrintestinais.

O fungo *D. flagrans* é um fungo nematófago encontrado naturalmente no solo, em diversas áreas do mundo (Braga et al., 2009; Mendoza-De Gives et al., 2018), caracteriza-se pela sua alta produção de conídios e clamidósporos, pela eficiência em destruir L3 de nematódeos gastrintestinais presentes no ambiente e pela sua produção de nanopartículas de prata, com atividade ovicida (Tavela et al., 2013; Ferraz et al., 2022; Motta et al., 2022; Junco et al., 2023). Recentemente foi registrada uma outra característica deste fungo, sua moderada atividade ovicida, o que deve ser melhor explorada em futuras pesquisas (Motta et al., 2022).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar diferentes concentrações de conídios do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001) e hipoclorito de sódio (NaOCl) a 5% (v/v) sob a eclosão de ovos de nematódeos gastrintestinais de equinos.

Material e Métodos

Fungo e composto químico

Foi utilizado o isolado brasileiro do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001), cultivado no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Este fungo

transferido para placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar 2% (BDA 2%). Posteriormente, a obtenção de uma suspensão estoque de conídios e clamidósporos ocorreu por meio da adição de água destilada sob as placas de Petri e com auxílio de uma espátula os conídios e fragmentos miceliais foram recuperados e vertidos em tubos Falcon de 15 mL. Com o auxílio de microscópio óptico, os conídios viáveis presentes na suspensão foram corados com azul de metileno 0,5% e contados em câmara de Neubauer (Ferraz et al., 2022). Para o controle positivo, foi utilizado hipoclorito de sódio a 5% (v/v) (Audax Butterfly®).

Obtenção de fezes de equinos

Foram utilizados equinos atendidos no Hospital Veterinário Prof. Ricardo Alexandre Hippler – Universidade de Vila Velha. Foram coletadas fezes da ampola retal e, com auxílio de luva, procedeu-se a realização da técnica de O.P.G (contagem de ovos por grama de fezes), constando-se a positividade (Gordon e Withlock, 1939). Fezes a partir de 500 O.P.G. foram incluídas no ensaio experimental.

Ensaio Experimental

Para a realização do ensaio experimental, as fezes coletadas foram homogeneizadas e então procedeu-se o preparo das coproculturas (20 gramas de fezes) com distintas concentrações de conídios de *D. flagrans* e/ou hipoclorito de sódio a 5% (v/v). Foram feitas 6 repetições, cada uma com 5 grupos. Cada grupo utilizou o mesmo bolo fecal após homogeneização para misturar bem a quantidade de ovos contidos nas fezes. Foram formados 4 grupos tratados e 1 grupo controle (água destilada), conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações do fungo *Duddingtonia flagrans* utilizadas nos tratamentos G1, G2, G3, G4 e grupo controle (G5) no delineamento do ensaio experimental

Grupos	Ensaio experimental
G1	3 x 10 ⁶ conídios de AC001+ 20 gramas de fezes
G2	6 x 10 ⁶ conídios de AC001+ 20 gramas de fezes
G3	9 x 10 ⁶ conídios de AC001+ 20 gramas de fezes
G4	5 mL de hipoclorito de sódio 5% (v/v) + 20 gramas de fezes
G5	5 mL de água destilada + 20 gramas de fezes

Após a adição dos fungos ou hipoclorito, as fezes foram homogeneizadas novamente. Em seguida, foram feitas as coproculturas dos grupos tratados e controle foram mantidos em câmara de incubação por um período de 10 dias no escuro a $26 \pm 1^\circ$ a 2°C . Após esse período, procedeu-se a recuperação das larvas por meio da técnica de

Baermann, conforme a metodologia descrita por Braga et al. (2010), com posterior identificação e cálculo do percentual de redução das L3 nos grupos experimentais. Após a identificação larval, o percentual de redução foi calculado utilizando-se a seguinte equação descrita por Mendoza-De Gives e Vasquez-Prates (1994).

$$\% \text{ Redução} = \frac{\text{Média de L}_3 \text{ recuperadas no grupo controle} - \text{média de L}_3 \text{ recuperadas no grupo tratado} \times 100}{\text{Média de L}_3 \text{ recuperadas no grupo controle}}$$

Análise dos Dados

Os resultados obtidos foram interpretados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2003).

Resultados

No presente trabalho, o desenvolvimento do fungo foi estimulado pelo contato com um número crescente de L3 presentes nas coproculturas e com redução da recuperação das L3 em todas as diferentes concentrações em G1, G2 e G3 de conídios. Dessa forma, foi possível constatar que houve a germinação do fungo sob as condições testadas e conseqüentemente a predação das L3 que eclodiram nesse período, o que ao final do ensaio demonstrou eficácia na utilização de AC001 em distintas concentrações de conídios.

Ao final do ensaio experimental e recuperação das L3, constatou-se que 100% das larvas obtidas eram de pequenos strongilídeos

(ciatostomíneos) em todas as coproculturas (G1 a G5). Houve um percentual de redução em todos os grupos (G1 a G4) na eclosão dos ovos de ciatostomíneos, conseqüentemente devido a menor recuperação das L3 nas coproculturas (Tabela 2).

Dentre os resultados obtidos, foi observado que a concentração de larvas no G1 apresentou menor percentual de redução dentre os grupos (71,1%) e em relação aos demais tratamentos, apresentou uma diferença significativa estatística de ($p < 0,01$). Entretanto, independentemente da concentração utilizada de conídios, o fungo *D. flagrans* apresentou um potencial nematicida acima de 70% e, nos grupos 2 e 3, demonstrou capacidade predatória tão eficiente na redução de larvas quanto um controle químico (Tabela 2).

Houve uma média de redução de L3 nos grupos G1, G2 e G3 de 80,9% ao final do ensaio, o que comprova a sua eficácia e atividade predatória em ambiente fecal, mimetizando o bolo fecal depositado durante o pastejo dos animais.

Tabela 2. Médias e percentuais de redução das L3 recuperadas das coproculturas após os tratamentos com diferentes concentrações do fungo *Duddingtonia flagrans* (G1: 3×10^6 conídios; G2: 6×10^6 conídios; G3: 9×10^6 conídios) e hipoclorito de sódio (NaClO 5% v/v - G4 - controle positivo). Grupo controle (G5 - controle negativo: água destilada).

	G1	G2	G3	G4	G5
Médias	150a	87b	60b	96bc	519bcd
%Redução	71,1	83,2	88,4	81,5	-

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas linhas difere $P < 0,01$ – teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Discussão

A eficácia fúngica de *D. flagrans* utilizando quatro diferentes concentrações de clamidósporos contra três diferentes níveis de contagem de ovos fecais bovinos foi determinada por Zegbi et al. (2021) e seus resultados indicaram que o número de ovos nas fezes de bovinos não foi um fator determinante na eficácia fúngica contra nematódeos gastrintestinais. Esse fato, corrobora a proposta deste estudo em avaliar apenas a concentração de conídios sob uma concentração fixa de ovos, comparando-a aos efeitos que o

controle químico apresenta em sua ação nematicida.

Trabalhos iniciais como os de Fontenot et al. (2003), relatam que *D. flagrans* apresenta uma taxa ótima de crescimento em temperaturas entre 20 e 30°C de 15 e 60 mm por semana. No entanto, na presença de nematódeos, esse fungo consegue produzir cerca de 700 a 800 armadilhas por cm^2 em curto intervalo de tempo.

A literatura reporta que o fungo *D. flagrans* (AC001) apresenta grande potencial de produzir clamidósporos, estruturas de resistência que são capazes de passar pelo trato intestinal do animal e

permanecem viáveis depois de ingeridos, passando de maneira inerte pelo trato gastrointestinal e eliminados nas fezes, colonizando-as logo após a sua deposição no solo e predando os nematódeos por meio de hifas adesivas (Braga e Araújo, 2014). Nesse contexto, a espécie se destaca pela capacidade de produzir grande quantidade de clamidósporos, estruturas reprodutivas com parede espessa e altamente resistente, que, se ingeridos, percorrem o trato gastrointestinal dos animais e permanecem viáveis quando nas fezes.

Diversos estudos já relataram eficácia de *D. flagrans* no controle de nematódeos de equinos (Madeira de Carvalho et al., 2007; Braga et al., 2009; Araujo et al., 2010; Braga et al., 2010; Braga et al., 2011). Devido a sua forma de ação, o uso deste fungo tem atraído muita atenção e tem sido foco de inúmeras pesquisas na última década, contudo existem poucos relatos da sua utilização direta em coproculturas de equinos, o que pode vir a direcionar mais contribuições nessa área (Braga et al., 2009; 2020).

Ao longo dos anos, os desinfetantes de amplo espectro vêm sendo utilizados na higienização das instalações de equinos e estão inclusos na categoria química dos álcoois, aldeídos, halogênicos, fenóis ou agentes de amônio quaternário (Dwyer, 2004). A eficácia dos desinfetantes pode ser reduzida ou inativada por fatores associados à limpeza das baias, como a carga orgânica, água dura e detergentes. Ainda de acordo com Dvorak (2005), detergentes não iônicos não carregados são detergentes industriais adequados para associação do uso de desinfetantes, de acordo com suas características, eles apresentam boa penetração e dispersão, são bons emulsificantes, apresentam eficácia na redução da tensão superficial, além de possuírem propriedades espumantes reduzidas.

No presente trabalho, a utilização de hipoclorito de sódio 5% (v/v) como controle positivo foi eficiente em reduzir nas coproculturas a eclodibilidade dos ovos e por conseguinte as L3 obtidas. Esse resultado pode ser extrapolado no futuro para uma utilização diretamente voltada para a limpeza das baias e desinfecção do local como um todo. Ainda deve ser destacado aqui que distintas concentrações do produto poderiam ser testadas com a finalidade de se observar qual a melhor concentração e diluição do produto a ser empregada com segurança e economia na rotina da limpeza das baias nas propriedades rurais. Corroborando este fato, Bull et al. (2019)

mencionaram que a prática de manter equinos em baias é comum no manejo de cavalos, essa tendência permite melhor benefícios de controle na rotina do animal, reprodução, nutrição e manejo sanitário.

Conclusão

As distintas concentrações de conídios de AC001 e hipoclorito de sódio 5% utilizadas separadamente foram eficientes na redução da eclodibilidade dos ovos. Tendo em vista as altas taxas de redução de larvas ambientais, é possível utilizar o hipoclorito de sódio com menos frequência para a redução de larvas em estábulos e baias, enquanto se utilizam os fungos por via oral para redução das larvas ambientais no pasto.

Referências

- Araujo, J.M. et al. *In vitro* predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. **Parasitology Research**, 107: 103-108, 2010.
- Ayres, M. et al. **BioEstat 3.0: Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: MTC/CNPq, 2003. 291 p.
- Barbosa, F.C. et al. Eficácia anti-helmíntica da ivermectina em equinos: exames coproparasitológicos e hematológicos. **Ciência Animal Brasileira**, 19(1-12): e-44583, 2018.
- Braga, F.R. et al. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 163: 335-340, 2009.
- Braga, F.R. et al. Predatory activity of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on horse Cyathostomins infective larvae. **Tropical Animal Health and Production**, 42: 1161-1165, 2010.
- Braga, F.R. et al. Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). **Experimental Parasitology**, 128: 460- 463, 2011.
- Braga, F.R.; Araújo, J.V. *Nematophagous fungi* for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 98: 71-82, 2014.
- Braga, F. R. et al. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to

- control *in vivo* and *in vitro* of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. **3 Biotech**, 10(2):1-5, 2020.
- Bull, J. et al. Characterization of feeding, sport management, and routine care of the Chilean corralero horse during rodeo season. **Animals**, 9(9): 697, 2019.
- Carvalho, L.M.M. et al. Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controle biológico da estrogilidose equina no Ribatejo. **Revista Portuguesa de Ciência Veterinária**, 102: 233-247, 2007.
- Dvorak, G. **Disinfection 101**. Center for Food Security and Public Health. Ames: Iowa State University, 2005. 21 p.
- Dwyer, R.M. Environmental disinfection to control equine infectious diseases. **Veterinary Clinic North American Equine Practice**, 20: 531-542, 2004.
- Ferraz, C.M. et al. *In vitro* evaluation of the nematicidal effect of *Duddingtonia flagrans* silver nanoparticles against strongylid larvae (L3). **Biocontrol Science and Technology**, 29: 1-5, 2022.
- Fontenot, M.E. et al. Efficiency of feeding *Duddingtonia flagrans* chlamyospores to grazing ewes on reducing availability of parasitic nematode larvae on pasture. **Veterinary Parasitology**, 118(3-4): 203-213, 2003.
- Gordon, H.M.; Whitlock, H.V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, 12: 50-52, 1939.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Rebanho de Equinos**. 2023. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equinos/br>>. Acesso em: 18 dez 2023.
- Kaplan, R. M.; Vidyashankar, A. N. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, 186: 70-78, 2012.
- Junco, M. et al. A review of the use of *Duddingtonia flagrans* as a biological controller of strongylid nematodes in horses. **Parasitology Research**, 122(2): 357-368, 2023.
- Madeira de Carvalho, L. M. et al. Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controle biológico da estrogilidose equina no Ribatejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, 102(1), 233-247, 2007.
- Mendoza-De Gives, P.; Vasquez-Prats, V.M. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. **Veterinary Parasitology**, 55(1-3): 197-203, 1994.
- Mendoza-De Gives, P. et al. The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally treated calves maintained under tropical conditions-Dose/response assessment. **Veterinary Parasitology**, 263: 66-72, 2018.
- Motta, C.P. et al. Ovicidal activity of chemical disinfectants and the nematophagous Fungus *Duddingtonia flagrans* on eggs of the geohelminth *Toxocara canis*. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, 1: 1-5, 2022.
- Nielsen, M.K. et al. Anthelmintic efficacy against equine strongyles in the United States. **Veterinary Parasitology**, 259: 53-60, 2018.
- Tavela, A.E.O. et al. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. **Research in Veterinary Science**, 94: 568-72, 2013.
- Tzelos, T. et al. Strongyle egg reappearance period after moxidectin treatment and its relationship with management factors in UK equine populations. **Veterinary Parasitology**, 237: 70-76, 2017.
- Zegbi, S. et al. *In vitro* efficacy of different concentrations of *Duddingtonia flagrans* on varying egg densities of gastrointestinal nematodes of cattle. **Experimental Parasitology**, 230: 108156, 2021.