

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ATÍLIO DALCIN JÚNIOR

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Monacrosporium sinense* E
Arthrobotrys musiformis NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES
GASTROINTESTINAIS DE EQUINOS**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

ATÍLIO DALCIN JÚNIOR

**ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Monacrosporium sinense*
E *Arthrobotrys musiformis* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATÓIDES
GASTROINTESTINAIS DE EQUINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jackson Victor de Araújo

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D138a
2020
Dalcin Júnior, Atílio, 1990-
Associação entre os fungos nematófagos *Monacrosporium
sinense* e *Arthrobotrys musiformis* no controle biológico de
nematóides gastrointestinais de equinos / Atílio Dalcin Júnior. –
Viçosa, MG, 2020.
25 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Jackson Victor de Araújo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Cavalos - Parasitos. 2. Nematoda. 3. Fungos
nematófagos. 4. Parasitoses. 5. Nematóides parasitos de animais.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.1098696

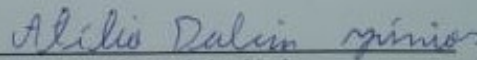
ATÍLIO DALCIN JÚNIOR

ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FUNGOS NEMATÓFAGOS *Monacrosporium sinense* E *Arthrobotrys musiformis* NO CONTROLE BIOLÓGICO DE NEMATOIDES GASTROINTESTINAIS DE EQUINOS

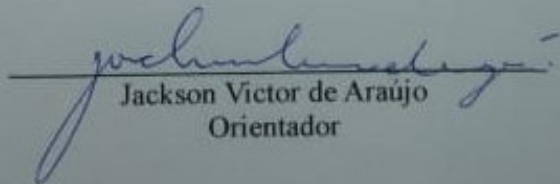
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 20 de fevereiro de 2020.

Assentimento:



Atílio Dalcin Júnior
Autor



Jackson Victor de Araújo
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Jackson Victor de Araújo e a todos que colaboraram para realização desse trabalho, bem como a FAPEMIG pela disponibilização da bolsa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

DALCIN JUNIOR, Atilio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Associação entre os fungos nematófagos *Monacrosporium sinense* e *Arthrobotrys musiformis* no controle biológico de nematoides gastrointestinais de equinos.** Orientador: Jackson Victor de Araújo.

Os nematoides gastrointestinais que parasitam os equinos são responsáveis por causar morbidade e mortalidade dos animais, ocasionando em prejuízos ao produtor. A constatação do surgimento resistência por parte das populações destes parasitas à anti-helmínticos empregados em seu controle, aponta para a necessidade de desenvolvimento de métodos alternativos de controle, com intuito de diminuir a frequência de utilização destes produtos e por consequência diminuir a velocidade ocorrência desse processo. Portanto, o potencial de se empregar fungos nematófagos, e a ausência de registros de efeitos nocivos aos animais e ao meio ambiente, tornam esses organismos alvo de interesse de mais estudos. O objetivo do presente estudo foi avaliar, pela primeira vez, a eficácia de predação e viabilidade dos fungos nematófagos *Monacrosporium sinense* (isolado SF53) e *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144), associados e separadamente, sobre larvas infectantes de ciatostomíneos, após a passagem de peletes de matriz de alginato de sódio contendo micélios dos fungos, pelo trato gastrointestinal de equinos. Também foram investigadas a capacidade de predação desses fungos em teste *in vitro*. Foi constatada a eficácia de predação dos fungos no experimento *in vitro* e as formulações peletizadas contendo a estrutura fúngica resistiram a passagem pelo trato gastrointestinal preservando a capacidade de crescimento, formação de armadilhas e de predação dos fungos. O uso combinado de *M. sinense* e *A. musiformis* apresentou maior eficácia no controle das larvas infectantes de ciatostomíneos que acometem os equinos, quando comparados ao uso isoladamente desses fungos, tanto no experimento *in vitro*, como no teste de passagem pelo trato gastrointestinal. A associação dos fungos apresentou no experimento *in vitro* um percentual de redução larval de 84,3%, enquanto que o fungo *A. musiformis* separadamente apresentou uma redução de 77,3% e o fungo *M. sinense* 69,7% de redução larval. Sendo assim, seu uso associado se apresenta como uma promissora alternativa para o controle biológico desses organismos, reduzindo a carga parasitária de larvas em fase de vida livre no ambiente de criação dos equinos.

Palavras-chave: Cavalos – Parasitos. Nematoda. Fungos nematófagos. Parasitoses. Nematóides parasitos de animais.

ABSTRACT

DALCIN JUNIOR, Atilio, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Association between nematophagous fungi *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys musiformis* in the biological control of gastrointestinal nematodes in horses.** Adviser: Jackson Victor de Araújo.

Gastrointestinal nematodes that parasitize horses are responsible for causing morbidity and mortality in animals, causing losses to the producer. The confirmation of the emergence of resistance by the populations of these parasites to anthelmintics used in their control, points to the need to develop alternative methods of control, in order to reduce the frequency of use of these products and consequently decrease the speed of occurrence of this process. Therefore, the association of fungi showed in the *in vitro* experiment a percentage of larval reduction of 84.3%, while the fungus *A. musiformis* potential of using nematophagous fungi, and the absence of a record of harmful effects in the animals and the environment, make these organisms the target of further studies. The objective of the present study was to evaluate, for the first time, the predation efficacy and viability of the predatory nematophagous fungi *Monacrosporium sinense* (isolated SF53) and *Arthrobotrys musiformis* (isolated A144), associated and separately, on infective larvae of ciatostomines, after the passage of pellets of sodium alginate matrix containing mycelia of fungi, through the gastrointestinal tract of horses. The ability of these fungi to predate *in vitro* testing was also investigated. The effectiveness of predation of fungi in the *in vitro* experiment was verified and the pelletized formulations containing the fungal structure resisted the passage through the gastrointestinal tract preserving the growth capacity, formation of traps and predation of the fungi. The combined use of *M. sinense* and *A. musiformis* showed greater efficacy in the control of infective larvae of cyiatostomines that affect horses, when compared to the isolated use of these fungi, both in the *in vitro* experiment and in the passage test through the gastrointestinal tract. separately showed a reduction of 77.3% and the fungus *M. sinense* 69.7% of larval reduction. Therefore, its associated use presents itself as a promising alternative for the biological control of these organisms, reducing the parasitic load of larvae in the free-living phase in the environment where horses are raised.

Keywords: Horses – Parasites. Nematoda. Nematoda fungi. Parasitoses. Animal parasitic nematodes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
2.1 Prejuízos das nematodioses na Equideocultura.....	8
2.2 Controle químico e resistência parasitária.....	8
2.3 Controle biológico com fungos nematófagos.....	9
2.4 Associação de fungos nematófagos predadores.....	9
3 OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo geral.....	10
3.1 Objetivos específicos.....	10
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
Capítulo 1: Associação entre os fungos <i>Monacrosporium sinense</i> e <i>Arthrobotrys</i>	
<i>Musiformis</i> e no controle biológico de nematoides gastrointestinais de equinos.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 Fungos.....	16
2.2 Larvas infectantes (L3).....	17
2.3 Avaliação <i>in vitro</i> da eficácia de predação dos fungos nematófagos sobre larvas	
infectantes de ciatostomíneos.....	18
2.4 Avaliação da eficácia de predação dos fungos nematófagos sobre larvas infectantes	
de ciatostomíneos após passagem pelo trato gastrointestinal dos equinos.....	18
2.5 Análise estatística.....	19
2.6 Comissão de ética.....	19
3 RESULTADOS.....	20
4 DISCUSSÃO.....	22
5 CONCLUSÃO.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

1 INTRODUÇÃO GERAL

O setor de Equideocultura movimentou cerca de 16,5 bilhões de reais no ano de 2018 no Brasil, com um rebanho superior a 5 milhões de cabeças. Este valor foi 15% maior que no ano de 2017, sendo que Minas Gerais é o maior produtor nacional, com cerca de 874.513 animais. Além disso o setor é responsável por mais de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, 6 vezes mais que o setor automobilístico (IBGE, 2018).

Das patologias que afetam a saúde e bem-estar dos equinos, as infecções por parasitas são as mais comuns e de grande importância por causarem perdas econômicas devido a prejuízos e mortalidade dos animais. Mais de 90 espécies de helmintos são relatadas, sendo que duas subfamílias de nematoides intestinais são de extrema relevância devido sua prevalência e patogenicidade, sendo Strongylinae e Cyatostominae, conhecidos respectivamente como grandes e pequenos estrôngilos (PICCOLI et al., 2015).

O controle dos nematoides gastrintestinais é importante para um melhor desempenho dos animais, principalmente quando são criados em altas densidades nos piquetes e a medida mais comum é o uso regular de anti-helmínticos (MOLENTO et al., 2005). Porém devido ao uso quase que exclusivo desse método, e de maneira indiscriminada por parte de alguns criadores tem surgido o desenvolvimento de resistência a diversas classes de anti-helmínticos em populações dos mais diversos nematoides, contribuindo para que as pastagens estejam na maioria das vezes contaminadas por esses (COLES et al., 2006).

O controle biológico se torna uma alternativa de controle viável e esse termo se refere ao uso de antagonistas naturalmente encontrados no meio ambiente que possam agir sobre outros organismos diminuindo sua população (ANDRADE et al., 2016).

A utilização de fungos nematófagos se apresenta como uma alternativa no controle de nematoides gastrointestinais dos animais domésticos, tendo sua ação concentrada nos bolos fecais agindo sobre formas larvais presentes no mesmo, reduzindo sua carga ambiental e por consequência a infecção dos animais (BRAGA et al., 2009).

Os fungos nematófagos são organismos saprófitos encontrados comumente nos solos e amplamente estudados e sua aplicação no controle ambiental dos helmintos se mostra uma boa alternativa após estudos realizados *in vitro* e *in vivo* (ARAUJO et al., 2010). Mais estudos necessitam ser realizados para investigar o potencial desses isolados de fungo e nesse trabalho será avaliada a associação entre os fungos nematófagos *Monacrosporium sinense* e *Arthrobotrys musiformis* quanto à sua viabilidade no controle de nematodioses dos equinos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Prejuízos das nematodioses na Equideocultura

Os nematoides estrongilídeos representam um grupo de grande interesse veterinário pela comum frequência de infecção em rebanhos de todo Brasil. A subfamília Cyathostominae é a de maior prevalência e existem registros de animais com carga parasitária de mais de um milhão e duzentas mil espécimes deste grupo (BRAGA et al., 2009).

A fauna parasitária que acomete os equinos é extensa, destacando os seguintes parasitos: os ciatostomíneos, conhecidos como pequenos estrôngilos (*Cyathostomum* spp., *Triodontophorus* spp., *Cylicostephanus* spp.) e os grandes estrôngilos (*Strongylus vulgaris*, *S. equinus*, *S. edentatus*), *Oxyuris equi*, *Trichostrongylus axei*, *Gasterophilus* spp., *Habronema* spp., *Dictyocaulus arnfieldi*, *Anoplocephala* spp., *Strongyloides westeri* e *Parascaris equorum* (MOLENTO, 2005).

O processo de deposição de ovos desses parasitas no meio ambiente através das fezes inicia o seu ciclo de vida. O ciclo desses animais passa por estágios larvares de vida livre até o estágio infectante, onde inicia uma migração do ambiente fecal para o ambiente de pastagens onde tornam-se passíveis de ingestão pelos equinos durante o pastejo, completando seu ciclo dentro do hospedeiro (COOPER et al., 2015).

A parasitose por estrongilídeos pode acarretar em mudança de comportamento, diminuição do escore corporal, fertilidade, no desenvolvimento e da resistência imunológica a outros patógenos. Em casos de carga parasitária muito altas pode ocasionar morte de animais do plantel e grandes prejuízos ao produtor. (CERNEA; MADEIRA DE CARVALHO; COZMA, 2008).

2.2 Controle químico e resistência parasitária.

Por muito tempo o controle das nematodioses foi realizado somente com anti-helmínticos e muitas vezes de forma indiscriminada. Esse é um fator predisponente para o surgimento de resistência dos parasitos a esses compostos (GRAMINHA et al., 2001).

A resistência parasitária pode ser definida como o evento em que uma determinada população de parasitos não é combatida com eficácia pelo princípio ativo do composto empregado. Podendo ser observado esse fenômeno quando se utiliza um determinado anti-helmíntico obtendo uma redução da carga parasitária com valores inferiores à 95%, enquanto

se empregado em outras populações não resistentes com condições semelhantes, sua ação é superior a essa. (MOLENTO, 2005).

O aparecimento de resistência dos parasitos aos compostos utilizados e a ecotoxicidade de alguns destes apontam a necessidade de alternativas de controle (Assis et al., 2003). O controle biológico então surge como uma opção viável, principalmente o emprego de fungos nematófagos (ARAUJO; GOMES; GUIMARÃES, 1998).

2.3 Controle biológico com fungos nematófagos

Entre os antagonistas naturais de nematoides estão presentes bactérias, vírus, protozoários, besouros, ácaros, e fungos são descritos com potencial uso no controle biológico desses organismos. Entretanto, os fungos nematófagos tem se mostrado uma alternativa promissora na redução no número de larvas presentes no ambiente (BRAGA et al., 2010).

Esses fungos são classificados em predadores, endoparasitas e oportunistas, e compreendem diversas espécies, com sua ação concentrada no ambiente fecal, combatendo as formas larvais livres dos nematoides (SILVA et al., 2009). Os fungos predadores são os mais bem estudados e apresentam grande potencial de serem empregados no controle biológico (ARAUJO et al., 2008). Porém diferenças nos mecanismos de ação sobre cada grupo de parasitos podem existir, havendo uma grande necessidade de mais estudos específicos nesse campo (BRAGA et al., 2010).

2.4 Associação de fungos nematófagos predadores

Os fungos predadores são os mais utilizados no controle biológico de nematoides que parasitam os equinos. Eles produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio com a função de capturar os nematoides. Essas armadilhas podem se formar em resposta à presença de nematoide, de vida livre ou parasitos ou devido a presença de seus metabólitos, também podem ser produzidas em condições de estresse fisiológico, como na escassez de água e nutrientes. (BRAGA; ARAUJO, 2014).

A capacidade de predação varia entre as espécies de fungos predadores, sendo esses um grupo de eficiência comprovada na redução de larvas no ambiente fecal (DIAS et al., 2007). Experimentos *in vitro* mostram que os fungos predadores *Monacrosporium sinense* e

Arthrobotrys musiformis possuem eficácia na redução desses parasitos em ensaios *in vitro*, porém não há nenhum estudo que avaliou a associação dos dois contra nematoides de equinos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de predação dos fungos *Monacrosporium sinense* (isolado SF53) e *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) quando cultivados em associação e separadamente, para sua utilização como alternativa de controle biológico dos nematoides que infectam os equinos.

3.2 Objetivos específicos

Verificar a ação *in vitro* dos isolados fúngicos *Monacrosporium sinense* e *Arthrobotrys musiformis* sobre larvas em estágio infectante de nematoides gastrintestinais de equinos em associação e separadamente.

Avaliar a viabilidade e ação dos fungos *Monacrosporium sinense* e *Arthrobotrys musiformis*, separadamente e em associação, após a passagem de micélio fúngico em matriz de alginato de sódio pelo trato gastrintestinal de equinos, quanto à sua atividade predatória sobre as larvas de nematoides gastrintestinais dos equinos, em diferentes intervalos de tempo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. C.; HIURA, E.; DA FONSECA, L. A.; MAGRI, C.; FERRAZ, C. C. S.; SENA, F. P.; GIRARDI, F. M. **Utilization of the Fungus *Duddingtonia flagrans* in Control of Nematode Larvae Development in Equine Stool.** International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v.5, n.3, p.829-35, 2016.

ARAÚJO, J. V.; GOMES, A. P. S.; GUIMARÃES, M. P. **Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*.** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.7, p.117–122, 1998.

ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; MILANI, J. A.; SILVA, A. S.; TAVELA, A. O. ***In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs.** Parasitology Research, v.102, n.4, p.787–790, 2008.

ARAUJO, J. M.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; CARVALHO, R. O. ***In vitro* predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri***. Parasitology research, v.107, n.1, p.103-108, 2010.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; CAMPOS, A. K. **Avaliação *in vitro* do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae)**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.18, n.1, p.82-85, 2009.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. M.; FERREIRA S. R.; CARVALHO, G. R. **Viability of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* after passage through the gastrointestinal tract of horses**. Veterinary parasitology, v.168, n.3-4, p.264-268, 2010.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. **Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals**. Applied Microbiology and Biotechnology, v.98, n.1, p.71–82, 2014.

CERNEA, M.; MADEIRA DE CARVALHO, L. M.; COZMA, V. **Atlas de diagnóstico de estrogilidose equina**. Romênia: AcademicPres, p.119, 2008.

COLES, G. C.; JACKSON, F.; POMROY, W. E.; PRICHARD, R. K.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.; SILVESTRE, A.; VERCRUYSSSE, J. **The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance**. Veterinary parasitology, v.136, n.3-4, p.167-185, 2006.

COOPER, K. M.; MAHON, C. M.; FAIRWEATHER, I.; ELLIOTTA, C. T. **Potential impacts of climate change on veterinary medicinal residues in livestock produce: An island of Ireland perspective**. Trends in Food Science & Technology v.44, n.1, p.21-35, 2015.

DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; CAMPOS, A. K.; BRAGA, F. R.; FONSECA, T. A. **Application of a formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of cattle gastrointestinal nematodiosis**. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.23, n.9, p.1245, 2007.

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CANDIDO, R. C.; SILVA, G. F.; COSTA, A. J. **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, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em <www.ibge.gov.br> acesso em 25 de janeiro de 2020.

MOLENTO, M. B. **Resistência parasitária em helmintos de equídeos e propostas de manejo**. Ciência Rural, v.35, n.6, p.1469-1477, 2005.

PICCOLI, C.; MARQUES, S. M. T.; APPEL, G.; DA SILVEIRA, E.; SIQUEIRA, G. B.; LOOS, D. E.; MATTOS, M. J. T. **Helmintos intestinais em cavalos de trabalho e de lazer de Porto Alegre/RS**. Science and Animal Health, v.3, n.1, p.56-64, 2015.

SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; FRASSY, L. N.; TAVELA, A. O.; CARVALHO, R. O.; CASTEJON, F. V. **Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in a tropical region of the southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium***. Parasitology research, v.105, n.6, p.1707, 2009.

CAPÍTULO 1

**Associação entre os fungos nematófagos *Monacrosporium sinense* e *Arthrobotrys*
Musiformis no controle biológico de nematoides gastrointestinais de equinos**

RESUMO

Associação entre os fungos nematófagos *Monacrosporium sinense* e *Arthrobotrys musiformis* no controle biológico de nematóides gastrointestinais de equinos.

O uso de fungos nematófagos no controle biológico de nematóides gastrointestinais que parasitam os equinos é uma alternativa que pode ser associada ao controle químico, uma vez que o controle das infestações de larvas no ambiente, reduz a reinfecção dos animais e, assim, pode ser implementada uma menor frequência de utilização de anti-helmínticos convencionais. Peletes formulados com estruturas fúngicas como conídios, clamidósporos e micélio, em matriz de alginato de sódio, podem ser fornecidos juntamente à alimentação dos equinos, para disseminação destes fungos por meio das fezes nos ambientes de criação desses animais. Uma vez que os ovos desses parasitos são eliminados nas fezes, o fungo cresce utilizando este meio rico em nutrientes, e tem o crescimento de hifas adaptadas que formam armadilhas e predam as larvas que estão se desenvolvendo nesse ambiente, reduzindo suas populações e diminuindo a taxa de reinfecção dos equinos no decorrer do pastejo. A ação predatória dos isolados fúngicos *Arthrobotrys musiformis* (A144) e *Monacrosporium sinense* (SF53), associados e separadamente, foi avaliada *in vitro* e após passagem pelo trato gastrointestinal de equinos foi mantida a capacidade de crescer e formar armadilhas para predação das larvas infectantes. Os resultados deste estudo demonstram uma nova alternativa para o controle biológico de larvas de ciatostomíneos nos sistemas de criação dos equinos.

Palavras-chave: Cavalos – Parasitos. Nematoda. Fungos nematófagos. Parasitoses. Nematóides parasitos de animais.

ABSTRACT

Association between nematophagous fungi *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys musiformis* in the biological control of gastrointestinal nematodes in horses.

The use of nematophagous fungi in the biological control of gastrointestinal nematodes that parasitize horses is an alternative that can be associated with chemical control, since by controlling the infestation of larvae in the environment, a less frequent use of anthelmintics can be implemented. Pellets formulated with fungal structures such as conidia, chlamydozoospores and mycelium, in a matrix of sodium alginate, can be supplied together with the feeding of horses, for the dissemination of these fungi along the feces in the husbandry environments of these animals. Once the eggs of these parasites are eliminated in the feces, the fungus grows using this rich in nutrients environment, and has the growth of adapted hyphae that form traps and prey on the larvae that are developing in this environment, reducing their populations and decreasing the reinfection rate of horses during grazing. The predatory action of the fungal isolates *Arthrobotrys musiformis* (A144) and *Monacrosporium sinense* (SF53), associated and separately, was evaluated *in vitro* and after passing through the gastrointestinal tract of horses, the ability to grow and form traps for the predation of infectious larvae was maintained. The results of this study demonstrate a new alternative for the biological control of ciatostomine larvae in equine rearing systems.

Keywords: Horses – Parasites. Nematoda. Nematoda fungi. Parasitoses. Animal parasitic nematodes.

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de infecções por nematoides estrongilídeos é comum nos equinos, que são criados principalmente à pasto no Brasil. A subfamília Cyathostominae é a que apresenta maior prevalência, com casos registrados de animais parasitados com mais de um milhão e duzentas mil espécimes de ciatostomíneos, em um único indivíduo (CASTRO et al., 2003). Os ciatostomíneos tem parte do seu ciclo de vida no ambiente e infecções maciças acarretam enterite catarral descamativa, anorexia, perda de escore corporal e dependendo do número de parasitos, estado nutricional e fisiológico do animal acometido, pode haver mortalidade (SOULSBY, 1987).

A utilização de vermífugos com diferentes formulações é a principal forma de tratamento para as helmintoses. Porém, nem sempre é satisfatória a redução das cargas parasitárias dos animais. O surgimento de resistência a anti-helmínticos por parte das populações de parasitos torna importante o estudo e desenvolvimento de novos métodos alternativos ou auxiliares ao controle químico (FAZZIO et al., 2014).

Os fungos nematófagos tem sido utilizados no controle dos animais domésticos e os fungos dos gêneros *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* já demonstraram resistência a passagem pelo trato gastrointestinal de equinos e com manutenção da sua atividade predatória sobre larvas (L3) de nematoides infectantes (CASTRO et al., 2003). Os fungos predadores são os mais estudados por apresentarem uma boa eficiência na predação de L3 por meio da formação de armadilhas, que promovem a adesão, imobilização e morte das larvas dos helmintos por meio de penetração de suas hifas (BRAGA; ARAUJO, 2014). Sua dispersão no ambiente é promovida pela administração por via oral juntamente à alimentação. Mas para que o fungo chegue no bolo fecal com viabilidade de crescimento e que tenha mantida sua capacidade de predação é importante que ele resista às condições adversas durante sua passagem pelo trato gastrointestinal dos animais (BRAGA; ARAUJO, 2014)

O presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade predatória *in vitro* e após passagem pelo trato gastrointestinal dos equinos, dos fungos nematófagos *A. musiformis* e *M. sinense*, em associação e separadamente sobre L3 de ciatostomíneos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Fungos

Os fungos nematófagos *Monacrosporium sinense* (isolado SF53) e *Arthrobotrys musiformis* (isolado A144) foram obtidos no Laboratório de Parasitologia do departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Os fungos originários estão armazenados em tubos de ensaio contendo meio de cultura corn-meal ágar 2%, em ambiente escuro da Micoteca, à temperatura de 4°C. Os fungos foram transferidos para placas de Petri de 9 cm de diâmetros contendo meio ágar-ágar 2% (AA 2%) e crescidos por 7 dias em estufa à 26°C na ausência de luz. Para produção dos micélios, fragmentos de ágar de aproximadamente 4 mm, contendo micélio e esporos do fungo foram transferidos para Erlenmeyer de 250 mL, com 150 mL de meio GPY 2% (Glicose – Peptona - Yeast), e mantidos sob agitação à temperatura de 26°C, no escuro, por 15 dias. Após este período, a recuperação da massa micelial foi feita por filtração e a secagem da mesma foi feita em seguida para produção de peletes em matriz de alginato de sódio de acordo com a técnica descrita por Walker e Connick (1983) e modificada por Lackey et al., (1993). Os peletes contendo a associação dos fungos foram adicionados de metade do peso de micélio de cada isolado, totalizando a mesma quantidade de micélio que nos tratamentos contendo os fungos separadamente.

2.2 Larvas infectantes (L3)

Para obtenção das larvas, foram coletadas amostras de fezes de animais naturalmente infectados, provenientes do Setor de Equideocultura da UFV campus Viçosa. As que apresentaram contagem superior a 1000, no exame de ovos por grama de fezes (OPG), foram utilizadas para a preparação de coproculturas adicionando-se vermiculita. Posteriormente à incubação das mesmas durante 15 dias em estufa, ajustada na temperatura de 26°C, as larvas então foram recuperadas a partir da técnica de Baermann, com água a 42°C e um tempo de decantação de 12 horas.

Para a quantificação das larvas, o líquido contendo-as foi homogeneizado, e 10 amostras de 50 µl dessa suspensão foram contadas com auxílio de microscopia de luz, foi estabelecida a média de larvas nesse volume, podendo estabelecer por regra de três simples o volume empregado para o número de larvas necessários nas próximas etapas do experimento.

A identificação das larvas em microscopia de luz foi feita seguindo as chaves propostas por Carvalho (2004,2007,2008). Para isso, 1000 larvas foram identificadas aleatoriamente sem que se repetisse o mesmo campo, e constatou-se que a totalidade das larvas pertenciam a subfamília Cyathostominae, sendo de 69,3% *Cyathostomum* tipo A, 17,8% *Cyathostomum* tipo C, 9,6% *Cyathostomum* tipo D e 3,2% *Cyathostomum* tipo B. Não foi possível estabelecer

a prevalência dos morfotipos apresentados após sua recuperação no teste *in vitro* e no teste de passagem, pois a diferenciação desses é sutil, todas apresentam 8 células intestinais, mudando ligeiramente sua disposição e posteriormente ao tempo permanecido nas placas de Petri, no decorrer dos dois experimentos, as células apresentavam considerável grau de degeneração na maioria dos indivíduos, impossibilitando a identificação a esse nível.

2.3 Avaliação *in vitro* da eficácia de predação dos fungos nematófagos sobre larvas infectantes de ciatostomíneos

Foram utilizadas sessenta placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo 20mL de AA 2%, divididas em 3 tratamentos e 1 controle, sendo 15 repetições por grupo. Nos tratamentos foram adicionados dois repiques de 4mm, sendo o tratamento 1 e 2 dois repiques do mesmo isolado fúngico em cada, *Arthrobotrys musiformis* e *Monacrosporium sinense*, respectivamente, e o tratamento 3, um repique de cada isolado. Não houve adição de fungos no grupo controle. As placas de todos os três tratamentos foram mantidas por 10 dias em B.O.D., a 26°C e no escuro, para crescimento fúngico prévio.

Posteriormente, em cada placa dos 4 grupos foram vertidas 1000 larvas, e as mesmas foram mantidas por 7 dias em estufa, nas mesmas condições descritas acima, observações diárias foram feitas e constatou-se a presença de larvas predadas em todos tratamentos. As larvas foram recuperadas das placas com a técnica de Baermann adaptada, com água a 42°C e um tempo de 12 horas de decantação.

O percentual de redução larval de cada um dos grupos tratados em relação ao controle foi calculado usando-se a seguinte fórmula, proposta por Mendoza-de-Gives et al (1999):

$$\% \text{Redução} = \frac{(\text{Média de larvas do controle} - \text{Média de larvas do tratamento})}{\text{Média de larvas do controle}} \times 100$$

2.4 Avaliação da eficácia de predação dos fungos nematófagos sobre larvas infectantes de ciatostomíneos após passagem pelo trato gastrointestinal dos equinos

Utilizou-se 24 equinos naturalmente infectados, raças mangalarga marchador e bretão, fêmeas adultos com idade e pesos variados, sendo divididos em grupos de 6 animais e a escolha dos integrantes de cada um foi feita para que animais de peso semelhante e mesma raça estivessem cada um em um grupo, com intuito de obter uma maior homogeneidade entre eles.

Os animais foram pesados e tratados previamente com formulação anti-helmíntica contendo dois princípios ativos, ivermectina 0,4% e pamoato de pirantel 38,3%, obedecendo-se a dose estabelecida na bula do produto. Passados 21 dias da vermifugação, e após a confirmação de ausência de ovos no exame coproparasitológico, todos equinos receberam 100g de peletes em administração única, por via oral, misturados em fubá de milho, sendo que o grupo 1 recebeu peletes preparados com micélio do fungo *Arthrobotrys musiformis*, o grupo 2 contendo o fungo *Monacrosporium sinense*, grupo 3 recebeu os peletes preparados com os dois fungos e o grupo 4, o controle, peletes sem adição de fungos. O fornecimento foi realizado individualmente certificando-se que todo pelete fosse consumido por todos indivíduos.

Foram coletadas amostras de fezes com aproximadamente 500g, direto da ampola retal de cada animal nos intervalos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas após a administração dos peletes e cada amostra foi homogeneizada primeiro separadamente e posteriormente 100g de cada amostra foram misturadas e homogeneizadas novamente, por grupo e horário de coleta, e pesadas 2g de fezes, que foram transferidos para placas de Petri contendo AA 2%, sendo realizadas 10 repetições por grupo e horário, totalizando 240 placas de Petri. Em todas foram adicionadas 1000 L3 de ciatostomíneos e acondicionadas em estufa à 26°C, e no escuro, por 15 dias. Observações diárias foram realizadas para visualização da presença de conídios e conidióforos característicos dos fungos testados, seguindo-se a classificação proposta por Van OORSCHOT (1985). No último dia, para recuperação das larvas viáveis nas placas, realizou-se a técnica de Baermann adaptada, e foi feita a contagem das larvas nas amostras para estabelecer a média de larvas recuperadas por tratamento, para estabelecer o percentual de redução a mesma fórmula descrita no teste *in vitro* foi empregada.

2.5 Análise estatística

No teste *in vitro* os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Turkey ($p \leq 0.05$). No teste de passagem os dados foram submetidos a análise estatística pelo método de Kruskal Wallis ($p \leq 0.05$). O software utilizado para realização das análises foi o IBM SPSS Statistics 2.0.

2.6 Comissão de ética

A realização deste experimento ocorreu após aprovação pelo “Comissão de Ética para Utilização de Animais de Produção” da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP), protocolo nº -124/2018.

3 RESULTADOS

No teste *in vitro* todos os grupos apresentaram diferenças significativa no número de larvas vivas recuperadas. O percentual de redução do tratamento contendo o isolado fúngico *Arthrobotrys musiformis* associado ao *Monacrosporium sinense* foi o maior entre os três tratamentos, com uma redução de 84,3% do total de larvas quando comparado ao controle. O grupo contendo apenas o fungo *A. musiformis* foi o segundo mais eficaz na predação das larvas, apresentando 77,3% de redução larval. O grupo contendo o *M. sinense*, apresentou redução de 69,7%, como apresentado na tabela 1.

Tabela 1 – Experimento *in vitro*

A144 + SF53		A144		SF53		Controle
L3 Recuperadas	Redução de L3 (%)	L3 Recuperadas	Redução de L3 (%)	L3 Recuperadas	Redução de L3 (%)	L3 Recuperadas
47,6 ^a (6,9)	84,3%	69,1 ^b (7,1)	77,3%	92,1 ^c (7,6)	69,7%	304,1 ^d (16,5)

Fonte: Atilio Dalcin Júnior

Médias, desvios padrão e percentuais de redução das larvas infectantes de ciatostomíneos após 7 dias de interação com os fungos *Monacrosporium sinense* (SF53) e *Arthrobotrys musiformis* (A144). Letras diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0.05$).

Com relação ao teste de passagem, nas leituras das placas de Petri, constatou-se que houve crescimento fúngico com formação de armadilhas e conídios característicos dos isolados empregados, além da presença de larvas infectantes predadas. Houve diferença significativa nos tratamentos e horários na maioria dos casos, porém em alguns não se constatou diferença significativa.

As médias do número de larvas infectantes de ciatostomíneos recuperados após 15 dias de incubação das placas, bem como os percentuais de redução estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Teste de passagem

Tempo	A144 + SF53		A144		SF53		Controle
	L3 Recuperadas	Redução de L3 (%)	L3 Recuperadas	Redução de L3 (%)	L3 Recuperadas	Redução de L3 (%)	L3 Recuperadas
12	83,3 ^a (20,7)	74,5	94,6 ^{ab} (15,1)	71,0	112,0 ^b (23,1)	65,7	326,1 ^c (85,9)
24	67,6 ^a (14,3)	76,8	91,1 ^b (20,5)	68,7	103,6 ^b (14,9)	64,4	291,3 ^c (63,0)
36	127,7 ^a (25,6)	63,2	136,2 ^a (24,9)	60,7	199,6 ^b (27,9)	42,4	346,6 ^c (68,4)
48	100,6 ^a (18,3)	63,7	97,2 ^a (18,2)	64,9	148,3 ^b (27,0)	46,4	276,9 ^c (65,1)
60	44,8 ^a (9,1)	83,0	89,6 ^b (19,6)	66,1	79,9 ^b (15,4)	69,7	264,0 ^c (79,6)

72	66.3 ^a (11,4)	71,3	95,5 ^b (15,2)	58,6	84,9 ^b (17,3)	63,2	240,8 ^c (53,9)
----	--------------------------	------	--------------------------	------	--------------------------	------	---------------------------

Fonte: Atílio Dalcin Júnior
Médias, desvios padrão e percentuais de redução das larvas infectantes de ciatostomíneos após os 15 dias de interação com os fungos. Recuperados em diferentes intervalos após administração, por via oral aos animais, dos fungos *Arthrobotrys musiformis* e *Monacrosporium sinense* (A144 + SF53), *Arthrobotrys musiformis* (A144) e *Monacrosporium sinense* (SF53). Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0.05$).

Em todos os tempos de coleta (12, 24, 36, 48, 60, 72 horas) os fungos *A. musiformis* e *Monacrosporium sinense*, em associação e/ou separados tiveram ação sobre os nematodas constatada pela diminuição do número de larvas infectantes de ciatostomíneos quando comparados ao grupo controle. No tempo de 12 h após administração dos peletes, o tratamento contendo a associação dos fungos apresentou média de larvas recuperadas de $(83,3 \pm 20,7)$ e um percentual de redução de 74,5%, e no grupo contendo apenas o fungo *A. musiformis* se observou uma média de $(94 \pm 15,1)$ e 71% de redução, porém não houve diferença estatística entre os dois grupos para se afirmar que houve uma maior ação nematicida no primeiro citado, mas esse diferiu significativamente do grupo contendo apenas o fungo *M. sinense*, o qual se obteve uma média de larvas de $(112 \pm 23,1)$ e 65,7% de redução larval, também não houve diferença significativa entre este último com o tratamento contendo apenas o *A. musiformis*.

No tempo de coleta 24h após passagem dos peletes, a associação dos fungos apresentou diferença estatística com os outros tratamentos e uma menor média de larvas recuperadas, bem como um maior percentual de redução, sendo $(67,6 \pm 20,7)$ a média e 76,8% a redução. Os grupos com os fungos separados, *A. musiformis* e *M. sinense*, não diferiram estatisticamente e obtiveram, respectivamente, médias de larvas recuperadas de $(91,1 \pm 20,5)$ e $(103,6 \pm 14,9)$ e percentual de redução de 68,7% e 64,4%.

Às 36h e 48h após coleta não houveram diferenças significativas entre os grupos contendo o fungo associado e o grupo contendo apenas o *A. musiformis*. E nos dois tempos (36 e 48h) de coleta o fungo *M. sinense* diferiu dos dois, tendo uma maior média de larvas recuperadas e menor percentual de redução larval que os dois primeiros. Na associação dos fungos, apresentou-se nos tempos de 36h e 48h, respectivamente, média de larvas recuperadas de $(127,7 \pm 25,6)$ e $(100,6 \pm 18,3)$, a redução foi de 63,2% e 63,7%, o grupo contendo o isolado *A. musiformis* apresentou média de $(136,2 \pm 24,9)$ e $(97,2 \pm 18,2)$, com 60,7% e 64,9% de redução larval, o isolado *M. sinense* obteve uma média de larvas recuperadas de $(199,6 \pm 27,7)$ e $(148,3 \pm 27,0)$ e redução das larvas de 42,4% e 46,4%.

Já nos tempos de coleta de 60 e 72h, em ambos horários a associação entre os fungos *A. musiformis* e *M. sinense* apresentaram o maior percentual de redução, 83,0% e 71,3% e a menor

média de larvas recuperadas, $(44,8 \pm 9,1)$ e $(66,3 \pm 11,4)$, diferindo estatisticamente dos outros dois grupos, os quais não tiveram diferenças significativas entre si em ambos tempos de coleta citados, o fungo *A. musiformis* apresentou médias de larvas recuperadas, respectivamente, de $(89,6 \pm 19,6)$ e $(95,5 \pm 15,2)$ e percentual de redução larval de 66,1% e 58,6%, o isolado *M. sinense* obteve média de $(79,9 \pm 15,4)$ e $(84,9 \pm 17,3)$ e redução de 69,7% e 63,2%.

4 DISCUSSÃO

Já existem estudos que demonstram o potencial de predação dos fungos nematófagos *Arthrobotrys musiformis* e *Monacrosporium sinense* e a manutenção da viabilidade após a passagem pelo trato gastrointestinal sobre diferentes espécies de nematoides que parasitam os animais domésticos. Porém pela primeira vez foi relatada a ação *in vitro* e *in vivo* da associação destes isolados sobre larvas infectantes de ciatostomíneos que acometem os equinos. Os valores das médias de larvas recuperadas nos tratamentos, encontrados no presente estudo, tanto no experimento *in vitro* como no teste de passagem, são menores que os dos grupos controle, demonstrando o potencial da associação destes organismos de serem empregados no controle biológico de L3 de ciatostomíneos, sendo que no teste *in vitro* os fungos associados obtiveram um maior percentual de redução larval que no teste contendo apenas os isolados *A. musiformis* e *M. sinense* separadamente. Além disso, no teste de passagem, a associação de fungos apresentou também a maior eficácia nos horários de 24, 60 e 72h quando comparado aos outros tratamentos, sendo que nos tempos de 12, 36 e 48h, não houve diferença estatística entre a associação dos fungos e o grupo contendo o fungo *A. musiformis* sozinho, mas nos três casos houve maior percentual de redução dos fungos empregados de forma associada.

Os fungos nematófagos se apresentam como uma forma de controle biológico das larvas infectantes de nematoides presentes no ambiente (TAVELA et al., 2012). Para utilização destes agentes biológicos à campo é necessário a utilização de meios que os protejam das condições adversas que enfrentam durante a passagem pelo trato gastrointestinal, para que sejam dispersos nos ambientes de pastagem onde os equinos são criados, e desenvolvam suas hifas e estruturas de resistência durante seu crescimento no bolo fecal rico em nutrientes. Uma maneira de fazer realizar isso é por meio de peletes em matriz de alginato de sódio, que tem se mostrado uma boa alternativa para administração via oral de fungos nematófagos (ASSIS et al., 2012). Resultados satisfatórios tem sido alcançado com essa formulação em condições laboratoriais e à campo, foi observada a viabilidade de fungos em peletes com até 40 meses em temperatura de 4°C e por cerca de 4 meses em temperatura ambiente (MANI; SIRLING; 1995).

Os resultados do teste *in vitro* demonstram o potencial de utilização desses fungos em associação e separadamente contra larvas de ciatostomíneos, com uma taxa de redução em condições laboratoriais de 84,3% no tratamento contendo os dois fungos, 77,3% no grupo com apenas o fungo *A. musiformis* e 69,7% com o fungo *M. sinense*. Braga et al. (2009a) relataram um percentual de redução do fungo *M. sinense* (isolado SF53) em experimento *in vitro* contra larvas de primeiro estágio de *Angiostrongylus vasorum* de 74,2%. Em outro ensaio experimental *in vitro* foram demonstradas reduções de 85% e 72,5%, de L3 de ciatostomíneos, respectivamente, utilizando os fungos *Arthrobotrys robusta* (isolado I31) e *Monacrosporium thaumasium* (isolado NF34) sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos (Braga et al., 2009b).

Em estudo realizado por Castro et al. (2003) com diferentes fungos às temperaturas de 25, 28 e 30°C, foi encontrado, respectivamente, para o fungo *A. musiformis* um percentual de redução de larvas de ciatostomíneos de 58,45%, 89,4% e 73,99%, sendo segundo este trabalho o maior percentual no tratamento submetido a 28°C. O presente estudo foi realizado à temperatura de 26°C.

A viabilidade de crescimento e predação dos fungos *A. musiformis* e *M. sinense* após passagem pelo trato gastrointestinal de equinos foram demonstradas no presente estudo, obtendo redução da quantidade inicial de larvas infectantes de ciatostomíneos, tanto em associação como separadamente, em todos horários quando comparados ao grupo controle. Os maiores percentuais de redução foram encontrados no grupo contendo a associação do fungos nos tempos de 60h, 24h e 12h.

5 CONCLUSÃO

A associação entre os fungos *Arthrobotrys musiformis* e *Monacrosporium sinense* demonstrou-se mais eficiente que quando utilizados separadamente, tanto nos ensaios *in vitro* como na passagem pelo trato gastrointestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. A capacidade de predação foi mantida e mais estudos podem avaliar a capacidade predatória na utilização desses isolados conjuntamente em diferentes espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSIS, R. C. L.; LUNS, F. D.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R. **Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil**. *Experimental Parasitology*, v.132, n.3, p.373-377, 2012.

- BRAGA, F. R.; CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. R.; ARAÚJO, J. V.; LIMA, W. S.; TAVELA, A. O. **Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae.** Journal of Helminthology, v.83, n.4, p.303-308, 2009a.
- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. R.; CAMPOS, A. K. **Controle *In Vitro* de Larvas Infectantes de Ciatostomíneos (NEMATODA: CYATHOSTOMINAE) de Equinos utilizando os Fungos Predadores *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*.** Ciência Animal Brasileira, v.10, n.3, p.887-892, 2009b.
- BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. **Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals.** Applied Microbiology Biotechnology, v.98, n.1, p.71–82, 2014.
- CASTRO, A. A.; OLIVEIRA, C. R.; ANJOS, D. H.; ORNELAS, E. I.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ARAÚJO, J. V.; RODRIGUES, M. L. A. **Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumasium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae).** Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v.12, n.2, p.53-57, 2003.
- FAZZIO, L. E.; SANCHEZ, R. O.; STREITENBERGER, N.; GALVAN, W. R.; GIUDICI, C. J.; GIMENO, E. J. **The effect of anthelmintic resistance on the productivity in feedlot cattle.** Veterinary Parasitology, v.206, n.3-4, p.240-245, 2014.
- LACKEY, B. A.; MULDOON, A. E.; JAFFEE, B. A. **Alginate pellet formulation of *Hirsutella rhossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes.** Biological Control, v.3, n.2, p.155-160, 1993.
- MADEIRA DE CARVALHO, L. M.; FAZENDEIRO, M. I.; AFONSO-ROQUE, M. M. **Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos strongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equinos-1. Género *Cyathostomum* sl.** Acta Parasitológica Portuguesa, v.11, n 1-2, p;23-32, 2004.
- MADEIRA DE CARVALHO, L. M.; FAZENDEIRO, M. I.; AFONSO-ROQUE, M. M. **Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos strongilídeos (Nematoda: strongylidae) dos equídeos-2. Géneros *Gyalocephalus*, *Poteriostomum*, *Craterostomum*, *Oesophagodontus*, *Triodontophorus*, *Strongylus* e *Trichostrongylus*.** Acta Parasitológica Portuguesa, v.14, p.23-34, 2007.
- MADEIRA DE CARVALHO, L. M.; FAZENDEIRO, M. I.; AFONSO-ROQUE, M. M. **Estudo morfométrico das larvas infectantes (L3) dos strongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos equídeos. 4. Estudo das populações de ciatostomíneos de equídeos bravios e domésticos através do método de análise dos morfotipos de L3 de *Cyathostomum sensu latum*.** Acta Parasitológica Portuguesa. 2008, v.15, n.1-2, p.65-70, 2008.
- MANI, A.; STIRLING, G. R. **The activity of nematode-trapping fungi following their encapsulation in alginate.** Nematologica, v.41, n.1-4, p.240-250, 1995.

SOULSBY, E.J.L. **Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos**. México: Interamericana, p.805, 1987.

TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. M.; MAGALHAES, L. Q.; SILVEIRA, W. F.; BORGES, L. A. ***In vitro* association of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34) and *Pochonia chlamydosporia* (VC1) to control horse cyathostomin (Nematoda: Strongylidae)**. Biocontrol Science and Technology, v.22, n.5, p.607-610, 2012.

VAN OORSCHOT, C. A. N. **Taxonomy of the *Dactylaria* complex, V. A review of *Arthrobotrys* and allied genera**. Studies in Mycology, v.26, p.61-96, 1985.

WALKER, H. L.; CONNICK, J. **Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides**. Weed Science, p.333-338, 1983.