

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO

**UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* PARA CONTROLE  
DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES**

**Ially de Almeida Moura**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2021**

# UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* PARA CONTROLE DE NEMATÓIDES GASTROINTESTINAIS DE RUMINANTES

**Ially de Almeida Moura**  
**Médico Veterinária**  
**Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2018**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração (Produção animal).

**Orientador:** Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto  
**Co-orientador:** Dr. Leandro de Souza Rocha

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**  
**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

M929u	<p>Moura, lally de Almeida. Utilização de <i>Metarhizium anisopliae</i> para controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes / lally de Almeida Moura. _ Cruz das Almas, Bahia, 2021. 67f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciência Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto. Coorientador: Dr. Leandro de Souza Rocha.</p> <p>1.Parasitologia veterinária – Ruminante – Controle. 2.Caprino – Nematode gastrintestinal – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.2089</p>
-------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).  
(os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* PARA CONTROLE DE  
NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES**

Comissão Examinadora da Qualificação de Dissertação de  
lally de Almeida Moura

Aprovado em: 24 de fevereiro de 2021

**Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Orientador**

**Prof. Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro  
Universidade Federal de Goiás  
Examinador Externo**

**Prof. Dr. Thiago Campanharo Bahiense  
Universidade Federal da Bahia  
Examinador Externo**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente, aos meus pais Geremias Pinheiro Moura e Valdira de Almeida Moura, por nunca deixarem de acreditar em mim, e sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha jornada.

A minha irmã Lais de Almeida Moura, por acreditar e sempre torcer por mim.

A minha avó Gildete, que mesmo com o pouco estudo, vivendo e trabalhando na roça a vida inteira, sempre soube o valor do estudo, e sempre me apoiou.

Ao Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto, pela confiança depositada em mim desde a graduação. Agradeço pela amizade, e principalmente por ter sido um orientador exemplar durante todo o período, sendo apenas um reflexo do amor que demonstra ter pela profissão.

Ao Dr. Leandro de Souza Rocha, pela co-orientação, e por todo o acompanhamento e ensinamentos passados durante o experimento.

Ao Prof. Dr. Ossival Lolato Ribeiro, pela amizade e todo apoio na realização do projeto.

Aos colegas e amigos do mestrado: Inês Pereira, Giancarlo Bonfim, Luis Eduardo, Gilberto Junior, por todo apoio ao longo do mestrado.

Aos integrantes do Laboratório de Parasitologia do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, que ajudaram direta ou indiretamente nas etapas do projeto.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por toda minha formação acadêmica e crescimento pessoal. Em especial, ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Animal pela oportunidade de retornar a UFRB, e dar continuidade na minha formação.

A todos os professores, funcionários, técnicos e alunos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

A CNPq, por financiar o projeto, sendo indispensável para a realização deste trabalho.

A FAPESB, pelo auxílio financeiro concedido, mediante bolsa que abrangeu todo período do mestrado.

Por fim, agradeço a todos os amigos e familiares que, mesmo não contribuindo diretamente com minha vida acadêmica, sempre estiveram presentes na vida pessoal, proporcionando a força e incentivo necessários para superar os meus limites.

## UTILIZAÇÃO DE *Metarhizium anisopliae* PARA CONTROLE DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE RUMINANTES

**RESUMO:** Este trabalho teve como objetivos verificar a eficácia do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em formulações aquosas e oleosas sobre os estágios de vida livre de nematoides gastrintestinais de caprinos, por meio de testes *in vitro* e em condições seminaturais, e também analisar o período de permanência deste microrganismo no solo. Os experimentos foram compostos por quatro grupos: Controle água (solução de água e Tween 80 a 0,1%); Controle óleo (óleo mineral e Tween 80 a 0,1%); Formulação aquosa de *M. anisopliae* (conídios de *M. anisopliae* diluídos em solução de água e Tween 80 a 0,1%); Formulação oleosa de *M. anisopliae* (conídios de *M. anisopliae* diluídos em solução de água com Tween 80 a 0,1% com adição de 10% de óleo mineral), sendo cada grupo composto por 10 vasos com *Brachiaria brizantha* MG5. Além dos experimentos nos vasos, foram realizados ensaios laboratoriais com os mesmos grupos, através da coprocultura quantitativa. O percentual de eficácia das formulações no teste em condições seminaturais foi obtido a partir da comparação entre o número de larvas recuperadas das fezes, solo e gramíneas pelo teste de Baermann realizados no 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> após o início do experimento. Para a avaliação da presença de *Metarhizium* sp. no solo, o número de colônias encontradas em amostras coletadas e processadas dos tratamentos foram quantificadas, antes da pulverização e no 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 52<sup>o</sup> dia após o tratamento. No teste *in vitro*, os grupos tratados com as formulações aquosa e oleosa apresentaram eficácia no controle de nematoides gastrintestinais de caprinos, proporcionando redução de 45,5% e 70%, respectivamente, quando comparado com o controle água, e redução variando de 36% a 77,9% e 61,4 a 95,9%, respectivamente no experimento em condições seminaturais. O isolado de *M. anisopliae* testado mostrou ser eficaz contra nematoides gastrintestinais de caprinos, tanto em teste *in vitro*, quanto em condições seminaturais, sob as condições climáticas de Cruz das Almas, reduzindo significativamente o número de larvas, em ambas as formulações testadas, além de se mostrar capaz de permanecer ativo por um período prolongado de até 52 dias no solo dos vasos. Assim, este estudo fornece dados sobre a aplicação de *Metarhizium* spp. no solo e contribui para futuras pesquisas visando a utilização do controle biológico contra nematoides gastrintestinais de ruminantes.

**Palavras-chave:** Fungo entomopatogênico; Biocontrole; Trichostrongyloidea

## USE OF *Metarhizium anisopliae* TO CONTROL RUMINANT GASTRINTESTINAL NEMATOIDES

**ABSTRACT:** This work aimed to verify the efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in aqueous and oily formulations on the free life stages of gastrointestinal nematodes (GNs) from goats, by means of *in vitro* tests and in semi-natural conditions, as well as the persistence of the fungus in the soil was evaluated. The experiments were composed of four groups: Water control (water solution and 0.1% Tween 80); Oil-control (mineral oil and 0.1% Tween 80); Aqueous formulation of *M. anisopliae* (conidia of *M. anisopliae* diluted in water and 0.1% Tween 80); Oily formulation of *M. anisopliae* (conidia of *M. anisopliae* diluted in water solution with 0.1% Tween 80 with the addition of 10% mineral oil), each group consisting of 10 pots with grass *Brachiaria brizantha* MG5. In addition to the experiments on the pots, laboratory tests were carried out with the same groups, through quantitative coproculture. The percentage of effectiveness of the formulations in the test under semi-natural conditions was obtained from the comparison between the number of larvae recovered from feces, soil, and grasses by the *Baermann* test performed on the 7th, 14th, 21st, and 28th days after the beginning of the experiment. For the evaluation of the presence of *Metarhizium* sp. in the soil, the number of colonies found in samples collected and processed from the treatments was quantified, before spraying and on the 3rd, 7th, 21st, and 52nd days after treatment. In the *in vitro* test, the groups treated with the aqueous and oily formulations showed efficacy in the control of GNs, providing a reduction of 45.5% and 70%, respectively, when compared to the water control, and a reduction ranging from 36% 77.9% and 61.4 to 95.9%, respectively in the experiment under semi-natural conditions. The tested *M. anisopliae* isolate proved to be effective against GNs, both *in vitro* and in semi-natural conditions, under the climatic conditions of Cruz das Almas, significantly reducing the number of larvae in both tested formulations, in addition to being able to remain active for a prolonged period of up to 52 days in the soil of the pots. Thus, this study provides data about the application of *Metarhizium* spp. in the soil and contributes to future research aiming to use the biological control against GNs from ruminants.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi; Biocontrol; Trichostrongyloidea

## LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 Estômatos de <i>Haemonchus</i> , <i>Ostertagia</i> , <i>Cooperia</i> e <i>Trichostrongylus</i> .....	8
Imagem 2 Formas infectantes: (A) <i>Cooperia</i> spp; (B) <i>Haemonchus contortus</i> e <i>Trichostrongylus</i> spp.; (C) <i>Oesophagostomum</i> spp.; (D) <i>Strongyloides papillosus</i> .....	8
Imagem 3 Ciclo biológico dos Nematoides Gastrintestinais de ruminantes.....	9
Imagem 4 Crescimento e esporulação das colônias de <i>Metarhizium anisopliae</i> após oito dias da inoculação em meio de cultura.....	13
Imagem 5 Microscopia eletrônica de varredura da cutícula de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> infectada por <i>Metarhizium anisopliae</i> . (a) e (b) 24 h após a infecção. (c) superfície da cutícula mostrando hifas penetrantes após 24 horas de pós-infecção. (d) Superfície da cutícula 72 h após a infecção. (e) e (f) Superfície da cutícula após 96 h de pós-infecção. ED: Degradação enzimática; CO: Conídio; GT: Tubo germinal; H: Hifa.....	14
Imagem 6 Animais do Setor de Caprinocultura da UFRB usados no experimento.....	18
Imagem 7 Etapas da realização da técnica de OPG.....	19
Imagem 8 Etapas do preparo das formulações fúngicas. (1) Sacos de arroz distribuídos sobre a bancada após o processo de autoclavagem; (2) Homogeneização da solução conidial antes de adicionar aos sacos de arroz; (3) Inoculação de 20 mL da suspensão conidial com cerca de $1,5 \times 10^8$ conídios/ mL, com uma seringa em 500 g de arroz pré-cozido; (4) Sacos condicionados em BOD, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; (5) Preparação das formulações conidiais.....	21
Imagem 9 (A) Quantificação em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer; (B) Conídios germinados no momento da quantificação para determinar o percentual de germinação.....	22
Imagem 10 Processamento das amostras da coprocultura.....	23
Imagem 11 (A) Padronização da altura da forrageira em 35 cm; (B) Distribuição aleatória dos vasos nos grupos.....	24
Imagem 12 Pulverização dos vasos com seus respectivos tratamentos.....	25
Imagem 13 (A) Processamento das amostras pela técnica de Baermann; (B) Contagem de larvas ao microscópio óptico das amostras coletadas do Baermann. ....	26
Imagem 14 Isolamento de colônias de <i>Metarhizium</i> sp. (setas vermelhas) e outras colônias de fungos contaminantes (setas amarelas) em meio seletivo CTC a partir de amostras de solo.....	28
Imagem 15 Presença de conídios com características de <i>Metarhizium</i> sp. obtida de microcultivo.....	29

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Rebanho caprino nacional e representação do quantitativo por região .....	5
Gráfico 2 Número de caprinos e ovinos comercializados, Regiões do Brasil, nos anos de 2006 e 2017.....	6

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Método de mensuração de colônias fúngicas, baseado no número de cruces (+) que categoriza a quantidade de colônias isoladas em placas de Petri após a inoculação das amostras de solo em meio seletivo CTC para <i>Metarhizium</i> sp.....	27
Tabela 2 Intervalos de medidas de concordâncias entre os observadores, segundo o teste Kappa, segundo interpretação de Landis e Koch (1977).....	30
Tabela 3 Média $\pm$ desvio padrão de larvas recuperadas após teste in vitro com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-A), e Formulação oleosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-O).....	31
Tabela 4 Eficácia após teste in vitro com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-A), e Formulação oleosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-O).....	32
Tabela 5 Média $\pm$ desvio padrão de larvas recuperadas após teste em condições seminaturais com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-A), e Formulação oleosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-O).....	33
Tabela 6 Eficácia após teste em condições seminaturais com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-A), e Formulação oleosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-O).....	34
Tabela 7 - Comparação da concordância entre as avaliações feita por três observadores (OBS) do número de colônias de <i>Metarhizium</i> sp. em placas de Petri contendo meio seletivo (CTC - Meio BDA acrescido de Extrato de Levedura, Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida). A concordância foi mensurada utilizando o método de análise Kappa, onde o valor máximo é igual a 1, e quanto mais próximo deste, maior a concordância.....	36
Tabela 8 Mensuração feita segundo o método de cruces (+) da quantidade de colônias por dia (0, 3 <sup>o</sup> , 7 <sup>o</sup> , 21 <sup>o</sup> e 52 <sup>o</sup> ) isoladas do solo dos diferentes grupos antes e após os tratamentos: Controle água (CTR-A); Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-A), Formulação oleosa de <i>M. anisopliae</i> (FUN-O), e mantidos em condições seminaturais.....	38

## LISTAS DE ABREVIATURAS

NGIs	Nematoides Gastrintestinais
AH	Anti-helmínticos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OPG	Ovos por grama de fezes
UV-B	Ultravioleta B
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
HUMV	Hospital Universitário de Medicina Veterinária
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	HIPÓTESE.....	3
3.	OBJETIVOS.....	4
3.1.	Objetivo geral.....	4
3.2.	Objetivos específicos.....	4
4.	REFERENCIAL TEÓRICO .....	5
4.1.	Caprinocultura .....	5
4.2.	Nematoides gastrintestinais de importância na caprinocultura .....	6
4.3.	Medidas convencionais para o controle de NGIS .....	10
4.4.	Medidas alternativas para o controle de NGIS.....	11
4.5.	<i>Metarhizium anisopliae</i> .....	12
5.	MATERIAL E MÉTODOS .....	17
5.1.	Local de realização dos experimentos e monitoramento das condições climáticas	17
5.2.	Delineamento experimental.....	17
5.3.	Animais utilizados para coleta de fezes .....	18
5.4.	Preparo das formulações fúngicas aquosas e oleosas de <i>M. anisopliae</i> .....	19
5.5.	Ensaio biológico com NGIs <i>in vitro</i> .....	22
5.6.	Ensaio biológico com NGIs em condições seminaturais .....	23
5.7.	Avaliação de patogenicidade de <i>M. anisopliae</i> sobre NGIs após o tratamento..	25
5.8.	Isolamento e identificação de colônias de <i>Metarhizium anisopliae</i> para a avaliação da persistência do fungo no solo .....	26
5.9.	Análise estatística.....	29
6.	RESULTADOS .....	31
6.1.	Viabilidade das formulações.....	31
6.2.	Ensaio biológico com NGIs <i>in vitro</i> .....	31
6.3.	Ensaio em Condições Seminaturais.....	32
6.4.	Condições Climáticas .....	35
6.5.	Mensuração da presença de <i>Metarhizium</i> sp. – Análise de concordância .....	35
6.6.	Reisolamento de <i>Metarhizium</i> sp. a partir da amostra de solo .....	37
7.	DISCUSSÃO.....	39
8.	CONCLUSÕES.....	43
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
	ANEXOS.....	50
	APENDICE .....	54
	ITENS EXIGIDOS.....	55

## 1. INTRODUÇÃO

Com um rebanho de aproximadamente 11 milhões de caprinos (IBGE, 2019), as estimativas apontam que 290 mil famílias estão diretamente ligadas ao setor de pequenos ruminantes, que possui 120 e 286 mil empregos diretos e indiretos, respectivamente (BRAGA, 2019), e a região Nordeste se destaca por concentrar cerca de 94% do rebanho caprino nacional (IBGE, 2019). O recôncavo da Bahia, é inserido na mesorregião Metropolitana de Salvador, que é uma região caracterizada por um clima tropical quente e úmido, (GUIMARÃES e LOPES, 2015), favorecendo à pecuária de ruminantes, porém essas condições ambientais também propiciam a sobrevivência de endoparasitos nos solos e pastagens.

A parasitose ocasionada por nematoides gastrointestinais (NGIs) é considerada o principal gargalo na produção de pequenos ruminantes, e os prejuízos são decorrentes da perda de peso e queda da produção de leite, além da morte dos animais que não são devidamente tratados (HASSUM, 2014). Dentre os nematoides que causam os maiores prejuízos na criação de caprinos, destacam-se *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* sp., *Cooperia* sp., *Oesophagostomum* spp. e *Strongyloides papillosus* (BRITO *et al.*, 2009; SILVA, 2014; MAHMUDA *et al.*, 2019). São capazes de permanecer até 150 dias viáveis na fase pré-parasitária (ALMEIDA *et al.*, 2005), sendo então considerados como fonte prolongada e constante de reinfecção.

Para o controle das enfermidades parasitárias causadas por helmintos, ainda prevalecem no Brasil o uso de anti-helmínticos (AH) químicos, entretanto, o uso de subdosagens, tratamento profilático massivo e a utilização contínua de uma mesma classe de drogas, levaram a aceleração da seleção de resistência anti-helmíntica em populações destes parasitos (VERMA *et al.*, 2018). Aliado ao problema de resistência anti-helmíntica, discussões recorrentes sobre os impactos ambientais decorrentes do uso de antiparasitários na pecuária atual, bem como, seus resíduos nos produtos de origem animal, impulsionaram pesquisas com métodos alternativos de controle (GARCIA *et al.*, 2019; BEYSDA-SILVA *et al.*, 2020).

Nesta perspectiva, o biocontrole, vêm como uma ferramenta a ser associada ao controle parasitário convencional, com intuito de melhorar a produtividade na cadeia pecuária de ruminantes, assim como, para garantir o bem-estar dos animais e causar menos impactos ao ambiente (MASCARIN *et al.*, 2019). Dentre os agentes biológicos utilizados para controle de parasitoses em ruminantes, o fungo *Metarhizium anisopliae* tem demonstrado grande potencial para controle de artrópodes de bovinos (PERINOTTO *et al.*, 2017) e CAMARGO *et al.*, 2016 demonstraram *in vivo*, que isolados do fungo possuem eficácia sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Além da ação entomopatogênica demonstrada para o controle de artrópodes, *M. anisopliae* demonstrou provável potencial, para utilização no controle alternativo sobre estádios de vida livre de nematoides de equinos (RODRIGUES *et al.*, 1996). E estudos com fungos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* têm demonstrado eficácia sobre helmintos de bovinos, equinos, ovinos e suínos (MOTA *et al.*, 2003). No entanto, *M. anisopliae* mesmo com patogenicidade já demonstrada para alguns parasitos, até onde se sabe, não existem estudos avaliando sua patogenicidade sobre NGIs de caprinos.

Diante do exposto, nota-se a importância de estudos acerca de produtos biológicos à base de fungos com potencial para o controle destes parasitos em nível de campo, possibilitando assim a difusão de métodos de controle microbiano empregados no campo da pecuária, acarretando na redução do uso de AH químicos.

Os experimentos realizados contribuirão para estudos futuros, visando o desenvolvimento de estratégias, utilizando produtos biológicos à base do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, que possam ser utilizados como medidas alternativas e integradas a outros métodos para controle de nematoides gastrintestinais de ruminantes.

## 2. HIPÓTESE

*Metarhizium anisopliae* possui patogenicidade sobre helmintos gastrintestinais de caprinos *in vitro* e em condições seminaturais.

*Metarhizium anisopliae* quando formulado com óleo, aumenta a eficácia *in vitro* e em condições seminaturais.

As condições climáticas do recôncavo da Bahia propiciam a sobrevivência e persistência desse agente microbiano por um período prolongado no solo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia *in vitro* e em condições seminaturais de *M. anisopliae* sobre os estágios de vida livre de NGIs de caprinos nas condições climáticas do Recôncavo da Bahia, e analisar o período de permanência deste microrganismo no solo.

#### 3.2. Objetivos específicos

Analisar a eficácia do fungo *M. anisopliae* em formulação aquosa e oleosa sobre os estágios de vida livre de nematoides gastrintestinais de caprinos em teste *in vitro*.

Avaliar a eficácia do fungo *M. anisopliae* em formulação aquosa e oleosa sobre os estágios de vida livre de nematoides gastrintestinais de caprinos mantidos em vasos com *Brachiaria brizantha* MG5.

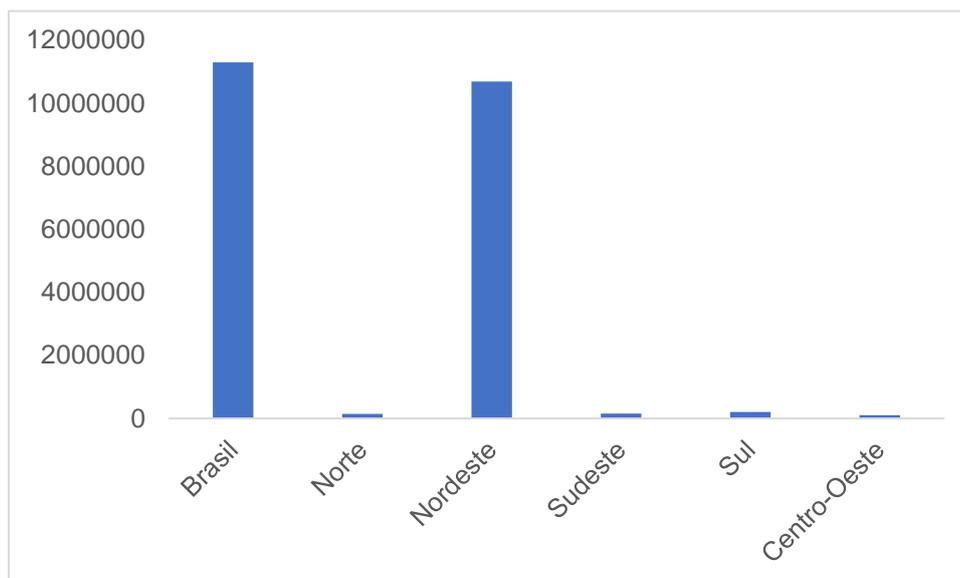
Verificar o período de persistência no solo de *M. anisopliae* quando aplicado em formulação aquosa e oleosa em condições seminaturais em vasos com *B. brizantha* MG5.

## 4. REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1. Caprinocultura

A caprinocultura está amplamente distribuída por todos os continentes e tem apresentado um crescimento mundial, porém estes estão em maior concentração em países em desenvolvimento (EMBRAPA CAPRINOS e OVINOS, 2016), a exemplo o Brasil que atualmente possui um rebanho com aproximadamente 11.301.481 milhões de animais, onde a região Nordeste se destaca por concentrar a maior parte, com um rebanho aproximado de 10.687.777 (IBGE, 2019) (Gráfico 1).

Gráfico 1 Rebanho caprino nacional e representação do quantitativo por região



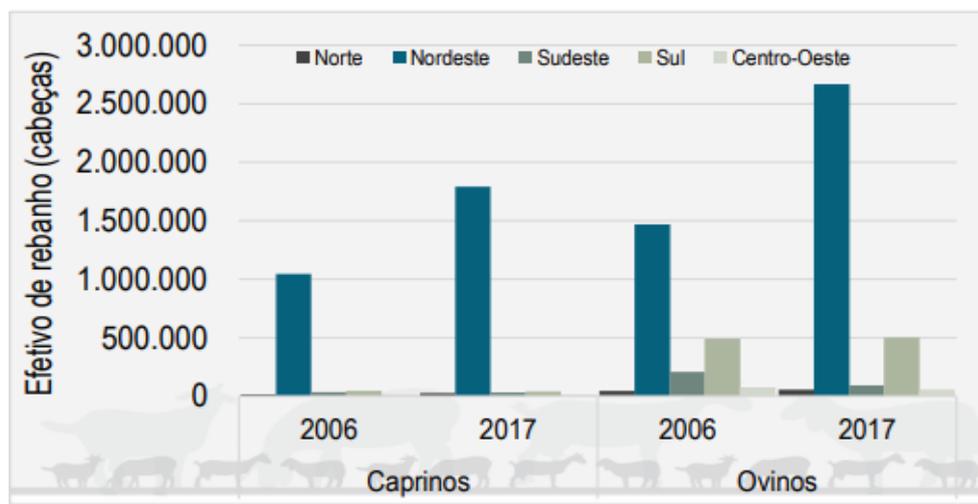
Fonte: IBGE, 2019

A caprinocultura ao longo dos tempos foi voltada para o autoconsumo e comercialização apenas do excedente pelo pequeno produtor (RODRIGUES e QUINTANS, 2015), pois representam uma reserva estratégica para momentos difíceis, quando é necessário obter dinheiro rapidamente, além de ser uma importante fonte de proteína animal para muitas famílias, especialmente na região semiárida do país, e as estimativas apontam que 290 mil famílias estão

diretamente ligadas ao setor de pequenos ruminantes, que possui 120 e 286 mil empregos diretos e indiretos, respectivamente (BRAGA, 2019).

A comercialização tem aumentando nos últimos anos, tornando-a uma das atividades que consegue gerar mais emprego e renda na agricultura familiar (MAGALHÃES *et al.*, 2018), principalmente em regiões semiáridas, devido a fácil adaptação dessa espécie nessas regiões (AMANCIO e PEREIRA, 2014). Tendo a caprinocultura apresentado um crescimento na comercialização de animais, em 2017, de 65,8% em relação ao ano de 2006, sendo este crescimento maior na região Nordeste (Gráfico 2) (MAGALHÃES *et al.*, 2018).

Gráfico 2 Número de caprinos e ovinos comercializados, Regiões do Brasil, nos anos de 2006 e 2017



Fonte: MAGALHÃES *et al.*, 2018

#### 4.2. Nematoides gastrintestinais de importância na caprinocultura

As parasitoses por nematoides gastrintestinais afetam a produção caprina, causando prejuízos econômicos em decorrência da perda de peso, queda da produção de leite e pode levar a morte dos animais acometidos se não forem devidamente tratados (HASSUM, 2014), sendo os maiores obstáculos para a obtenção de bons índices zootécnicos em criações de pequenos ruminantes (RINALDI e CRINGOLI, 2012).

Os helmintos gastrintestinais mais frequentes e de maior interesse na caprinocultura pertencem às famílias Trichostrongylidae e Chabertiidae

(URQUHART *et al.*, 1998).

Dentre os mais importantes nematoides na caprinocultura, merece destaque *Haemonchus contortus*, parasito abomasal, altamente patogênico em pequenos ruminantes (OMAR *et al.*, 2017), e tende a levar o animal a apresentar um quadro de anemia severa, associado a hipoproteinemia, e consequente perda de peso com fraqueza, podendo chegar ao óbito (HASSUM, 2014).

Os helmintos *H. contortus* e *Trichostrongylus* spp. são considerados os maiores responsáveis pelos prejuízos econômicos da caprinocultura (SILVA, 2014). No entanto, outros helmintos também podem ser identificadas e causar prejuízos, destacando-se *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp. e *Strongyloides papillosus* (BRITO *et al.*, 2009).

Algumas características são utilizadas para diferenciar as larvas infectantes (L3) desses nematoides, como a forma da extremidade craniana (Imagem 1), além do comprimento da bainha, que é obtido a partir da ponta da extremidade caudal da larva até à ponta da cauda da bainha (VANWYK *et al.*, 2004), onde a L3 de *Cooperia* spp. e *H. contortus* apresentam cauda da bainha de comprimento médio, de *Oesophagostomum* spp. cauda da bainha de comprimento longo, de *Trichostrongylus* spp. cauda da bainha curta, e *S. papillosus* não apresenta bainha (Imagem 2) (AMARANTE, 2014).

Imagem 1 Estômatos de *Haemonchus*, *Ostertagia*, *Cooperia* e *Trichostrongylus*

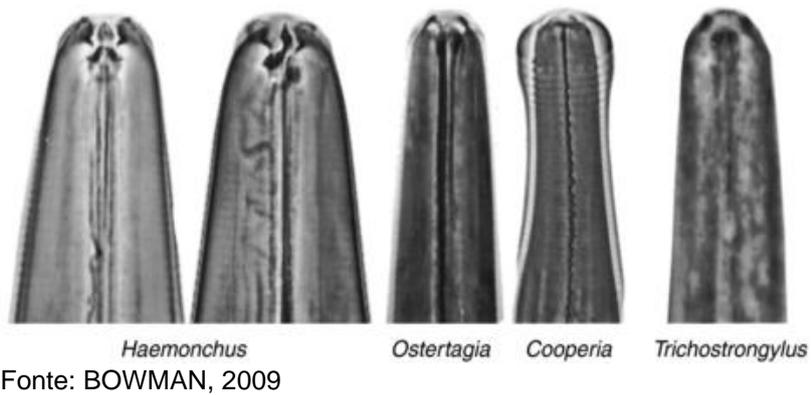
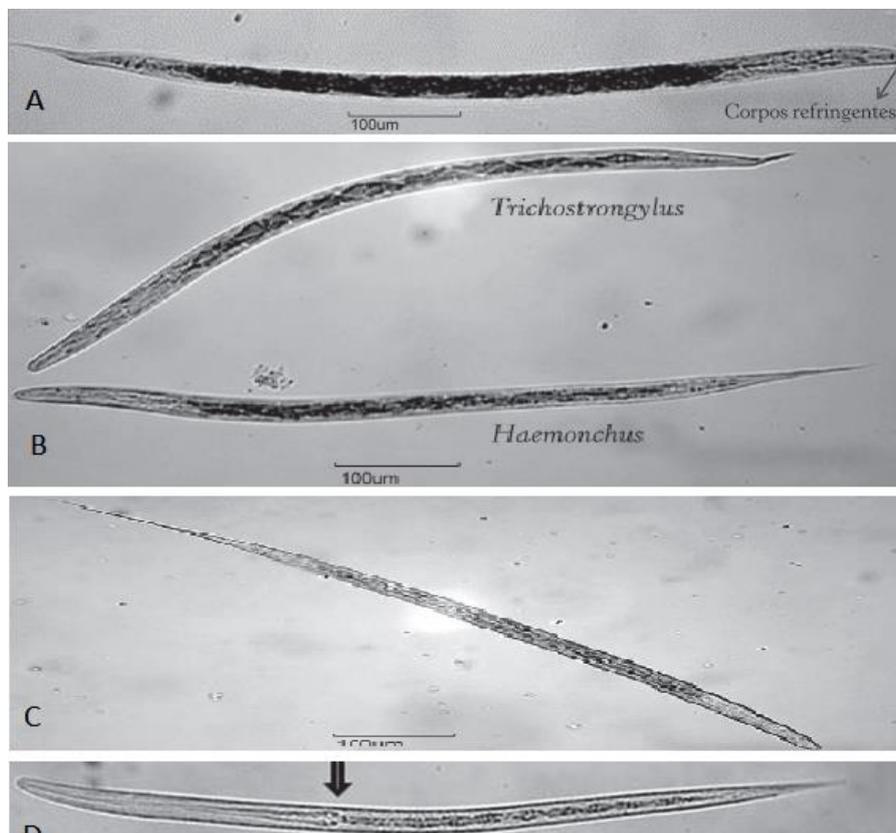


Imagem 2 Formas infectantes: (A) *Cooperia* spp.; (B) *Haemonchus contortus* e *Trichostrongylus* spp.; (C) *Oesophagostomum* spp.; (D) *Strongyloides papillosus*



O ciclo evolutivo dos estrongilídeos à qual pertence esses nematoides ocorre de modo similar, sendo composta pela fase pré-parasitária e parasitária. No hospedeiro, a fêmea libera os ovos após ter realizado a cópula, e estes saem juntamente com as fezes do animal. No ambiente, já em contato com o oxigênio e umidade, o processo de eclosão das larvas ocorre em alguns dias, dando

origem as larvas do primeiro estágio, que após se alimentarem de bactérias presentes nas fezes se desenvolvem e transformam-se em L2, e estas ao repetirem o processo, dão origem as L3 (Imagem 3) (FORTES, 2004).

Imagem 3 Ciclo biológico dos Nematoides Gastrintestinais de ruminantes



A larva L3 apresenta uma maior capacidade de se movimentar, além de possuir maior resistência a condições de estresse. Neste estágio, quando em condições climáticas favoráveis as larvas podem se deslocar tanto no plano horizontal, ao saírem da massa fecal, quanto no vertical, quando sobem nas hastes da forrageiras ou se aprofundam no solo. A contaminação do hospedeiro irá ocorrer durante o pastejo, quando os animais ingerirem a forragem com a larva L3 (VAN e MORGAN, 2011).

Com relação a presença desses nematoides gastrintestinais (NGIs) de caprinos no ambiente, a precipitação pluviométrica associada a temperatura, são fatores fundamentais para desenvolvimento e migração das larvas (SILVA, 2008). Isso possibilita a permanência destas larvas por aproximadamente 10 semanas na pastagem (BRAGA, 1980), entre 100 a 150 dias nas cúbicas fecais (ALMEIDA *et al.*, 2005), e de três a nove semanas no solo (LYAKU *et al.*, 1988).

### 4.3. Medidas convencionais para o controle de NGIS

Para o controle das enfermidades parasitárias em caprinos causadas por helmintos, ainda prevalecem no Brasil o uso de anti-helmínticos químicos (VERMA *et al.*, 2018), que são comercializados em casas agropecuárias, sem a necessidade de receituário veterinário, que leva à um uso inadvertido na maioria das vezes, contribuindo para a aceleração da seleção de populações de helmintos resistentes (WALLER *et al.*, 1996).

Dentre os AH comercializados, os princípios ativos mais utilizados ao longo dos anos no tratamento das endoparasitoses, são os grupos dos benzimidazóis (Albendazole, Fenbendazole e Oxfendazole); das avermectinas (Ivermectina); dos imidazotiazoles (Cloridrato de levamisole) e das salicilanilídeos (Closantel sódico) (BORGES, 2003).

Os benzimidazóis que tem como mecanismo de ação a capacidade de comprometer o citoesqueleto do parasito através de uma interação seletiva com  $\beta$ -tubulina fator 15 (PIYUSH e SINGH, 2011), vem demonstrando, em alguns estudos realizados em rebanhos no Brasil, algum nível de resistência dos nematoides gastrointestinais aos anti-helmíntico dessa classe, apresentando nesses casos, uma eficácia abaixo de 95% (VIERIA e CAVALCANTE, 1999; MELO *et al.*, 2003; MELO *et al.*, 2009; BORGES *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 2015).

As lactonas macrocíclicas (avermectinas e milbemicinas) são endectocidas amplamente utilizados em animais e em alguns casos de parasitoses em humanos (CEZAR *et al.*, 2010), pois possuem capacidade de causar paralisia da faringe e musculatura da parede do corpo dos nematoides, através da sua atuação em canais de cloro regulados por glutamato (GluCl) (PIYUSH e SINGH, 2011), no entanto a resistência anti-helmíntica também já é encontrada com seu uso (MELO *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2015).

Outro grupo que também tem seu uso muito difundido, e vem apresentando resultados insatisfatórios devido a ineficácia apresentada, é o grupo dos imidazotiazoles (MELO *et al.*, 2003; LIMA *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2015), que atua de forma a causar paralisia muscular espástica, pois são agonistas do receptor nicotínico 19, fazendo com que os ocorra prologada

ativação dos receptores excitatórios de acetilcolina nicotínica (nACh) (PIYUSH e SINGH, 2011).

O quarto grupo que é muito utilizado, é o dos salicilanilídeos, que tem como mecanismo de ação primária, o desacoplamento da fosforilação oxidativa, fazendo com que as células deixem de ter sua principal fonte de energia (SWAN, 1999), porém existe regiões que já não apresentam uma eficácia acima de 95%, (BORGES *et al.*, 2015; MELO *et al.*, 1988).

O uso de subdosagens, o tratamento profilático massivo e a utilização contínua de uma mesma classe da droga, aceleram o mecanismo de desenvolvimento de resistência anti-helmíntica em populações destes parasitos (VERMA *et al.*, 2018; SALGADO *et al.*, 2016). Este uso de drogas que apresentam baixa eficiência causa prejuízos econômicos, pois o investimento não gera um efeito terapêutico desejado, bem-estar animal e/ou produtividade (MANZANILLAB *et al.*, 2017).

É preciso determinar qual o melhor anti-helmíntico para cada propriedade, estabelecendo critérios para a escolha dos medicamentos (VIEIRA e CAVALCANTE, 1999), associado a isso, é importante buscar métodos alternativos de controle, além do uso de bases químicas já comumente usadas pelos produtores.

#### **4.4. Medidas alternativas para o controle de NGIS**

A já conhecida resistência anti-helmíntica, aliada a discussões recorrentes sobre os impactos ambientais, decorrentes do uso de antiparasitários na pecuária atual, bem como, seus resíduos nos produtos de origem animal, impulsionaram pesquisas com métodos alternativos de controle (GARCIA *et al.*, 2019; BEYS-DA-SILVA *et al.*, 2020).

Vários estudos, com métodos alternativos para reduzir a dependência de tratamento convencionais a base de produtos químicos, vem sendo realizados nos últimos anos, tal como a utilização do FAMACHA© (BATISTA *et al.*, 2014), homeopatia (GEMELLI *et al.*, 2018), fitoterapia (FERRAZ e FREITAS, 2008; BALDIN *et al.*, 2012; DORIGON e GAI, 2016; FONSECA *et al.*, 2019; MOTTIN *et al.*, 2019), e até estudos onde tem demonstrado a possibilidade de realizar a

seleção de animais com base na identificação de marcadores genéticos associados a resistência AH (BERTON *et al.*, 2017; MAHMUDA *et al.*, 2019).

Além dos supracitados, métodos alternativos de controle, o controle biológico vem sendo estudado, e é baseado no fenômeno natural de que muitas espécies vivem e se alimentam de outros organismos, cujas populações são reguladas, e às vezes erradicadas de um ecossistema (BERTI e MACEDO, 2010), como por exemplo o uso de fungos entomopatogênicos (MASCARIN *et al.*, 2019)

A administração de fungos nematófagos é considerada uma promissora alternativa na profilaxia das helmintíases gastrintestinais parasitárias, pois estes desenvolvem estruturas em forma de armadilhas, responsáveis pela captura e destruição dos estágios infectantes dos nematóides. Os fungos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* têm demonstrado eficácia em experimentos laboratoriais e no campo no controle de parasitos de bovinos, equinos, ovinos e suínos (MOTA *et al.*, 2003).

Em estudo recente as espécies *Duddingtonia flagrans*, *Clonostachys rosea*, *Arthrobotrys musiformis* e *Trichoderma esau*, demonstraram importante atividade predatória sobre larvas infectantes de *H. contortus*, e com isso podem ser considerados como agentes de controle biológico (SILVA *et al.*, 2017), e a espécie *M. anisopliae* é um dos mais promissores fungos com potencial para controle biológico, devido o mecanismo de ação sobre a praga alvo (ALVES, 1998), tendo a capacidade de atuar sobre vários parasitos (MURAD *et al.*, 2006; FERNANDES e BITTENCOURT, 2008; SANTI *et al.*, 2010).

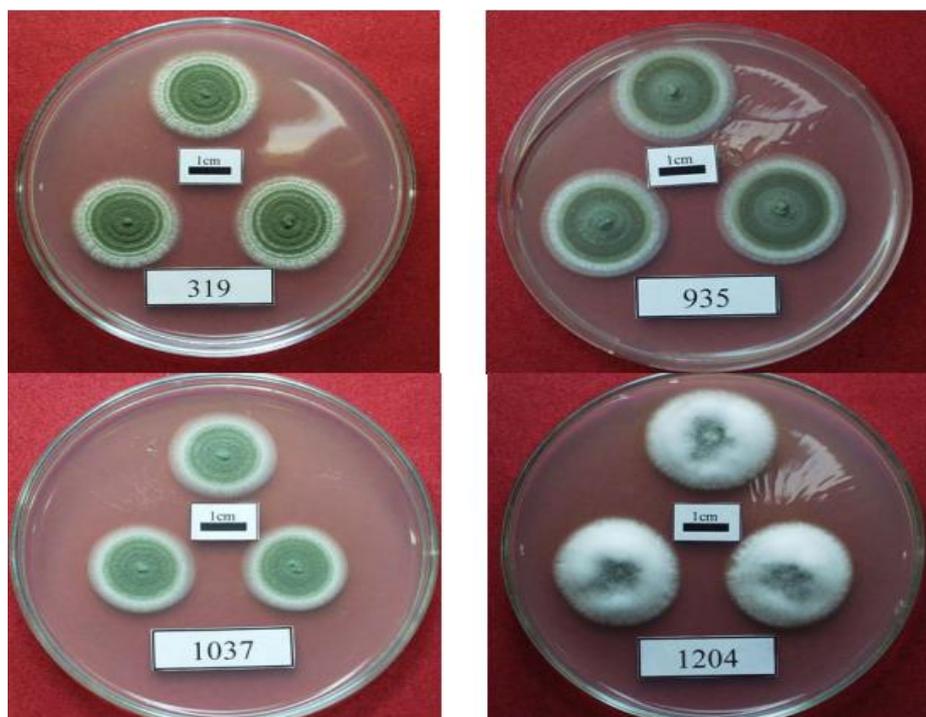
#### **4.5. *Metarhizium anisopliae***

O gênero *Metarhizium* é um dos mais conhecidos fungos entomopatogênicos. Foi inicialmente descrito na Rússia como um agente patogênico do besouro de trigo (Coleoptera: Scarabaeidae), e é usado para o controle de insetos em muitos países, incluindo Estados Unidos, Brasil, Austrália e Filipinas (DRIVER *et al.*, 2000).

Morfologicamente, *M. anisopliae* apresenta três variações básicas de cores da esporulação: verde acinzentado, cinzento escuro e verde escuro,

podendo este último, ser ainda mais diferenciada em tons mais brilhantes ou mais sombrios (YIP *et al.* 1992) (Imagem 4).

Imagem 4 Crescimento e esporulação das colônias de *Metarhizium anisopliae* após oito dias da inoculação em meio de cultura

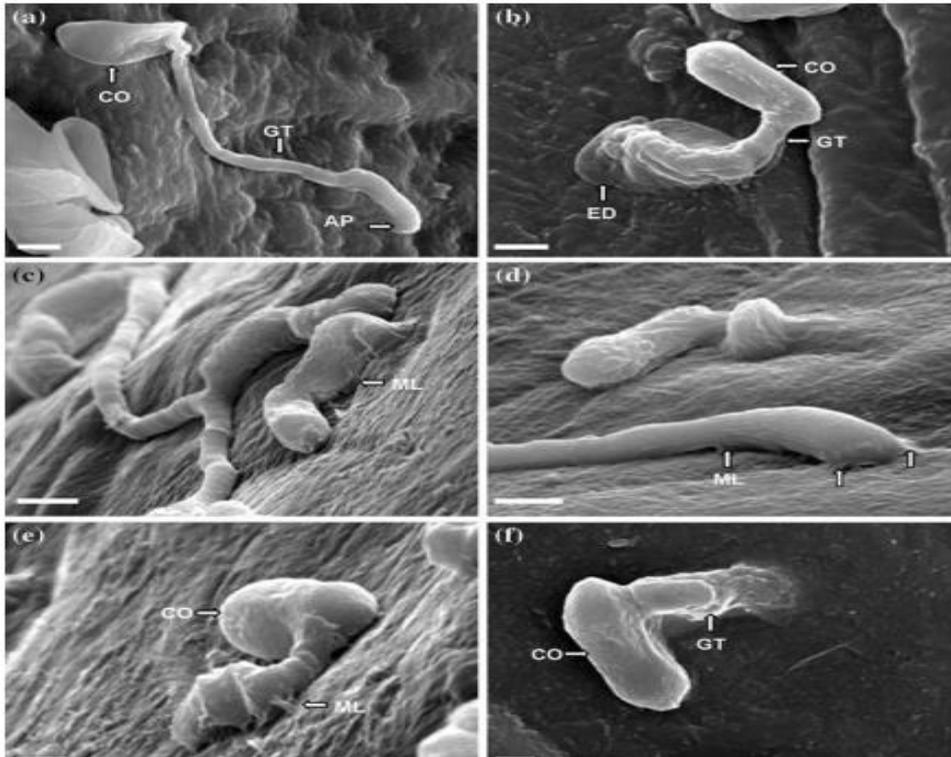


Fonte: MACEDO, 2005.

A atividade inseticida e acaricida deste fungo entomopatogênico vem sendo comprovada em vários estudos que tem comprovado sua eficácia no controle de insetos, como o resultado obtido por Rodrigues *et al.* (2019), que conseguiram demonstrar que o fungo foi altamente ativo contra adultos de *Aedes aegypti*, assim como é eficaz em combater as traças *Spoladea recurvalis* (OPISA *et al.*, 2019).

É capaz também de infectar várias espécies de carrapatos (FERNANDES e BITTENCOURT, 2008), cuja sua capacidade de penetrar na cutícula dos artrópodes, faz dele uma alternativa viável no controle biológico de ectoparasitas (ALVES, 1998), através de conídios que germinam na cutícula do inseto e produzem um tubo germinativo, que penetra no corpo onde o fungo prolifera como hifa, eventualmente matando o hospedeiro (Imagem 5). Após a morte, se as condições forem quentes e úmidas, o fungo cresce através da cutícula e forma uma superfície verde (DRIVER *et al.*, 2000).

Imagem 5 Microscopia eletrônica de varredura da cutícula de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infectada por *Metarhizium anisopliae*. (a) e (b) 24 h após a infecção. (c) superfície da cutícula mostrando hifas penetrantes após 24 horas de pós-infecção. (d) Superfície da cutícula 72 h após a infecção. (e) e (f) Superfície da cutícula após 96 h de pós-infecção. ED: Degradação enzimática; CO: Conídio; GT: Tubo germinal; H: Hifa



Fonte: ARRUDA *et al.* 2005.

Sua patogenicidade depende da secreção de enzimas hidrolíticas, que degradam a cutícula do hospedeiro e em estudos realizados para identificar as proteínas envolvidas no processo de infecção e na especificação do hospedeiro, pode-se identificar proteases, como elastase, tripsina, quimotripsina, carboxipeptidase e subtilisina, quitinases, DNase I e proteína rica em prolina, além de identificar que algumas destas foram inferidos como específicos do hospedeiro, sendo importante para o entendimento dos mecanismos de adaptação do *M. anisopliae* a diferentes hospedeiros (MURAD *et al.*, 2006; SANTI *et al.*, 2010)

Além da atividade inseticida e acaricida já mencionada, já foi demonstrado também que *M. anisopliae* possui ação nematicida, agindo sobre os estádios pré-parasitários de nematoides da subfamília Cyathostominae de equinos

(RODRIGUES *et al.*, 1996), porém seu mecanismo de ação em nematoide é ainda desconhecido, mas é provavelmente semelhante a outros fungos com esporos pegajosos ou conídios, que parasitam, e através da penetração direta e da produção de hifas infecciosas dentro do corpo do nematoide, acaba por matar o parasito (DEVI, 2018).

Uma das principais vantagens da utilização de fungos no controle biológico de pragas, está na facilidade de produção das suas unidades infectivas em escala comercial, facilidade de aplicação em condições de campo, o baixo custo em práticas agrícolas, e principalmente, o reduzido impacto ambiental nos programas estabelecidos até hoje (ORLANDELLI e PAMPHILE, 2011).

Os mais importantes condicionantes ambientais abióticos para os fungos são a temperatura, a umidade relativa e a radiação solar (ZIMMERMANN, 2007). A faixa de temperatura necessária para o desenvolvimento de *M. anisopliae* é entre 15°C e 35°C (ALVES *et al.*, 1984), no entanto em procedimentos de produção desse fungo com a finalidade de utilização em controle biológico no campo a temperatura ideal é de 25-30° C, pois proporcionaram maiores taxas de esporulação, e elevadas porcentagens de germinação dos conídios, além de desenvolvimento mais rápido das microestruturas somáticas e reprodutivas (hifas, anastomoses, apressórios, conidióforos e conídios elipsóides) (VIEIRA *et al.*, 2009).

Em temperaturas extremas de 40 e 45° C não são detectado esporulação, germinação, nem desenvolvimento de nenhuma microestrutura (VIEIRA *et al.*, 2009), porém o uso de óleo mineral adicionado as formulações podem conferir maior resistência contra os efeitos de temperatura extrema, podendo proteger os conídios contra o atraso induzido pelo calor na germinação e na produção de apressório (BARRETO *et al.*, 2016).

A umidade relativa do ar também é de extrema importância nas fases de disseminação, germinação e penetração, sendo também um fator limitante para a reprodução de algumas espécies fúngicas (ALVES, 1998). Para germinar no ambiente, *M. anisopliae* necessita de alta umidade relativa (WALSTAD *et al.*, 1970).

Outro condicionante abiótico que influencia no desenvolvimento dos fungos no ambiente é a radiação solar, particularmente o componente UV-B, que

afeta negativamente a sobrevivência de fungos entomopatogênicos no campo (FERNANDES *et al.*, 2007)

Os solos rizosféricos são comprovadamente um reservatório potencial para *M. anisopliae*, e propiciam maior sobrevivência dos transformantes deste fungo em condições de campo, levando alguns pesquisadores a direcionar estudos na biologia da interfase solo/raiz, como um local onde plantas, insetos e patógenos interagem para determinar a eficácia do biocontrole fúngico, ciclo e sobrevivência (HU e LEGER, 2002).

A partir dos resultados favoráveis observados ao longo dos anos utilizando espécies fúngicas como controladoras de pragas, muitos questionamentos foram levantados a respeito da segurança desses microrganismos sobre espécies não alvos. Todavia, Zimmermann (2007) revisou o risco da aplicação de *M. anisopliae* para mamíferos, aves, peixes, invertebrados, relatando diversos estudos que garantem a seguridade deste agente para os animais estudados.

Atualmente há um grande número de micoInseticidas e micoacaricidas no mundo, tendo em torno de 171 produtos comerciais a base de fungos registrados, sendo destes 33,9% de *M. anisopliae* (FARIA e WRAIGHT, 2007). No Brasil, a empresa Koppert Biological Systems, fabrica produtos com *M. anisopliae* que são largamente utilizados no controle de pragas de pastagens e cana-de-açúcar, e que também apresentam ação acaricida sobre algumas espécies de carrapato, como *R. microplus* (CAMARGO *et al.*, 2016) e *Dermacentor nitens* (PERINOTTO *et al.*, 2013). É importante ressaltar que estudos têm demonstrado que quando os fungos são formulados com veículos oleosos, há um aumento da eficácia (CAMARGO *et al.*, 2014; PERINOTTO *et al.*, 2017).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Local de realização dos experimentos e monitoramento das condições climáticas

O trabalho foi realizado no Campus da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizado no município de Cruz das Almas - BA. Os testes foram conduzidos no setor de forragicultura da UFRB, sendo as análises realizadas no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV) da UFRB, e no Laboratório de Fitopatologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). As coordenadas geográficas de Cruz das Almas – BA, são 12° 39' 11" latitude sul e 39° 7' 19" longitude oeste, com altitude de 212 metros. O clima da região, segundo classificação de Köppen, é do tipo Aw (tropical quente e úmido, com estação chuvosa e seca), tendo os meses de março a agosto como os mais chuvosos e de setembro a fevereiro, os mais secos (REZENDE, 2004). Os dados meteorológicos foram obtidos por consulta no banco de dados gerados pela Estação Meteorológica da Embrapa Mandioca e Fruticultura. O presente Projeto de Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRB com protocolo 23007.00006228/2019-16.

### 5.2. Delineamento experimental

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, e composto por quatro grupos: Controle água, tratado com formulação de água e Tween 80 a 0,1%; Controle óleo, tratado com formulação de água acrescida de 10% óleo mineral e Tween 80 a 0,1%; Suspensão aquosa de *M. anisopliae*, tratado com *M. anisopliae* diluída em água e Tween 80 a 0,1%; Formulação oleosa de *M. anisopliae*, tratado com a formulação de *M. anisopliae* diluída em água e Tween 80 a 0,1% e acrescida de 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para o ensaio em condições seminaturais, cada grupo de tratamento foi composto por 10 vasos, cada vaso representou

uma unidade experimental, e para o ensaio *in vitro*, cada tratamento foi composto por 10 copos, cada copo representou uma unidade experimental.

### 5.3. Animais utilizados para coleta de fezes

Para as coletas de fezes que foram utilizadas nos experimentos *in vitro* e em condições seminaturais, foram utilizados 10 caprinos, pertencentes ao rebanho da UFRB, mestiços, fêmeas, apresentando idade entre 6 e 18 meses, pesando em torno de 30 kg, naturalmente infectados por helmintos e sem tratamento prévio com anti-helmínticos por no mínimo 60 dias. Durante esse período, os animais foram monitorados quanto a sanidade, afim de assegurar que a falta de tratamento nos 60 dias não prejudicasse os animais (Imagem 6).

Imagem 6 Animais do Setor de Caprinocultura da UFRB usados no experimento



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

Para os experimentos *in vitro* e em condições seminaturais, amostras de fezes coletadas diretamente da ampola retal dos animais, foram avaliadas pela contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG), de acordo com a técnica de Gordon e Whitlock (1939), sendo selecionados os animais em que os exames continham ovos de NGIs das superfamílias Trichostrongyloidea e Strongyloidea com contagem entre de 2500 e 3200 de OPG. Após a coleta de

fezes dos animais selecionados, foi realizado novamente um OPG, afim de verificar a contagem do *pool* de fezes, e foi constatado o valor de 2700 de OPG (Imagem 7).

Imagem 7 Ilustração da realização da técnica de OPG



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

#### 5.4. Preparo das formulações fúngicas aquosas e oleosas de *M. anisopliae*

Para a realização dos bioensaios, amostras do isolado ARSEF 3643 de *M. anisopliae*, foram obtidos da micoteca da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foi então realizada a produção do fungo, em 10kg de arroz branco tipo 1, onde inicialmente o arroz foi condicionado em um recipiente, acrescido de 20 L de água, por um período de 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a água foi retirada e o arroz úmido foi transferido para sacos plástico de polipropileno, com aproximadamente 500g de arroz, por saco. Os sacos contendo arroz foram levados para autoclave e esterilizados por 20 minutos a 120 °C. Após a autoclavagem, os sacos foram retirados e espalhados sobre uma bancada previamente limpa com álcool 70%, onde ficaram por cerca de uma hora para resfriarem à temperatura ambiente. Uma suspensão de conídios foi preparada com solução estéril de Tween 80 a 0,05% mediante raspagem com espátula, dos conídios presentes nas placas de petri, contendo *M. anisopliae* que foram obtidos do processo de repicagem, das amostras da coleção de fungos da UFRRJ. Então 20 mL da suspensão conidial com cerca de  $1,5 \times 10^8$  conídios/mL, foi inoculado com uma seringa em 500 g de arroz pré-cozido. Os sacos foram agitados, para homogeneizar os conídios por toda a massa de arroz, em seguida foram acondicionados em estufa climatizada tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*), ajustada para  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ , por um período de sete dias. Após esse período, inicialmente foi preparada uma solução aquosa sem a presença dos conídios fúngicos, sendo composta somente de água destilada estéril e 0,1% de Tween 80, utilizada no tratamento do grupo controle água. Para o tratamento do grupo controle óleo foi preparada uma formulação contendo água destilada estéril, 0,1% de Tween 80 e 10% de óleo mineral (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Para as formulações utilizadas para o tratamento dos grupos de *M. anisopliae* aquoso e de *M. anisopliae* oleoso, foram preparadas através da lavagem do arroz, inicialmente com uma solução contendo água destilada estéril e 0,1% de Tween, para o preparo da formulação de *M. anisopliae* aquoso, e para o tratamento de *M. anisopliae* oleoso, foi acrescido 10% de óleo mineral, a solução contendo o *M. anisopliae*, onde apenas 3 sacos de arroz contendo os conídios (total de 1,5 kg) foi suficiente para ajustar a concentração das formulações a  $10^8$  conídios/mL (Imagem 8).

Imagem 8 Etapas do preparo das formulações fúngicas. (1) Sacos de arroz distribuídos sobre a bancada após o processo de autoclavagem; (2) Homogeneização da solução conidial antes de adicionar aos sacos de arroz; (3) Inoculação de 20 mL da suspensão conidial com cerca de  $1,5 \times 10^8$  conídios/mL, com uma seringa em 500 g de arroz pré-cozido; (4) Sacos condicionados em BOD, a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ; (5) Preparação das formulações conidiais.



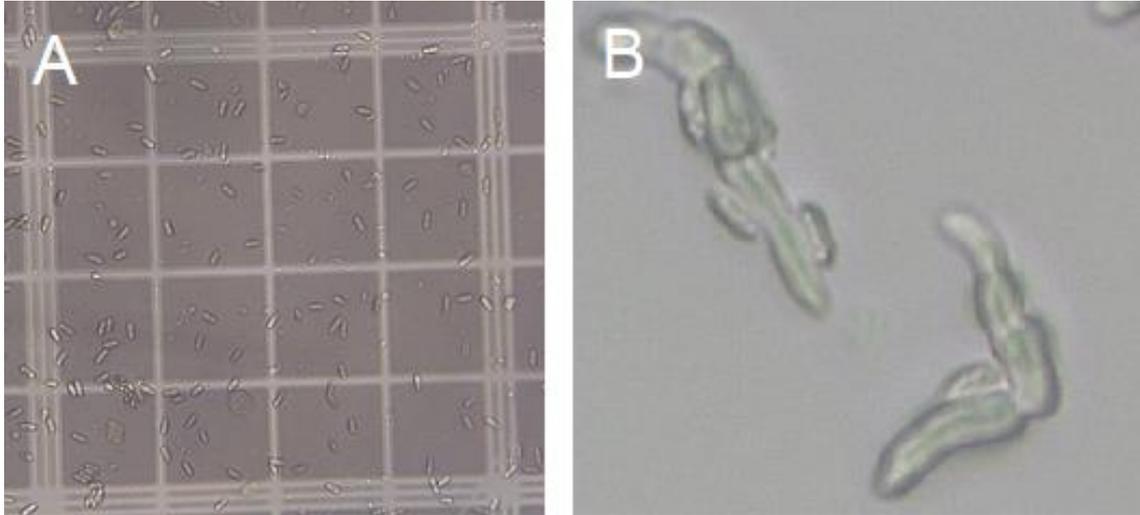
Fonte: Arquivo pessoal (2020)

As formulações foram quantificadas em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer, segundo Alves (1998), tendo as concentrações ajustadas a  $10^8$  conídios/mL (Imagem 9).

A viabilidade dos conídios foi verificada através da inoculação de uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  da suspensão e formulação em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA, Sigma) e incubação a  $25^\circ\text{C}$  por 24 horas. A leitura da viabilidade dos conídios foi feita através de observação direta pelo microscópio

óptico e o cálculo da germinação dos mesmos, foi realizado segundo metodologia proposta por Alves (1998) (Imagem 9).

Imagem 9 (A) Quantificação em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer; (B) Conídios germinados no momento da quantificação para determinar o percentual de germinação.



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

### **5.5. Ensaio biológico com NGIs *in vitro***

No dia zero, após a coleta de fezes, realizada diretamente da ampola retal dos caprinos, foram pesados e colocados 2g de fezes em copos de polipropileno de 50 mL, mais 2 mL da solução de cada tratamento, sendo cada tratamento formado por dez unidades experimentais. Após 10 minutos de espera, foram adicionados 2 gramas de maravalha em cada copo e feita a homogeneização. Os copos foram tampados com filme de PVC transparente e com três furos realizados com agulha histológica. Foram então levados para uma BOD, ajustada para  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$ , por um período de sete dias.

Após sete dias de cultivo, essas amostras tiveram o filme PVC transparente retirado, os copos completados com água previamente aquecida a  $45^\circ\text{C}$ , e uma placa de Petri foi colocada em cima dos copos, e então virado de forma rápida sobre a placa Petri. Foram adicionados 20 mL de água, nas placas de Petri (Imagem 10). Após duas horas o conteúdo foi coletado e condicionado em tubos de ensaio, e então analisados e feita a contagem das larvas dos NGIs em microscopia óptica.

O cálculo da eficácia dos tratamentos foi feito utilizando a seguinte fórmula de percentual de redução de larvas (RODRIGUES *et al.*, 1996):

$$\%Redução = \frac{n^{\circ}larvas\ controle - n^{\circ}larvas\ tratadas}{n^{\circ}larvas\ controle} \times 100$$

Imagem 10 Processamento das amostras do ensaio *in vitro*



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

### 5.6. Ensaio biológico com NGIs em condições seminaturais

Três meses antes do início do experimento, sementes de *B. brizantha*, cultivar MG5 foram plantadas em 40 vasos de polipropileno de 5 litros, com dimensões de 22 cm de diâmetro e 22 cm de altura, preenchidos com terra de superfície, terra de subsolo e adubo orgânico na proporção de 1:1:1, e adubados com fósforo. Todos os vasos foram mantidos em área com incidência de sol e chuva nas instalações do setor de forragicultura da UFRB. Sete dias antes do experimento, a *B. brizantha* de todos os vasos, foram podadas, padronizando a altura da forrageira em 35 cm. No dia zero (dia do tratamento), antes da pulverização, os vasos foram distribuídos nos respectivos grupos de forma aleatória (Imagem 11).

Imagem 11 (A) Padronização da altura da forrageira em 35 cm; (B) Distribuição aleatória dos vasos nos grupos.



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

No dia zero, após as 16h (horário de menor radiação solar e temperatura mais amena), foram depositadas em cada vaso, 20g de fezes de caprinos, de um *pool* de fezes com contagem do OPG de 2700. Após a deposição das fezes, o solo dos 10 vasos de cada tratamento, foi pulverizado com 80 mL da formulação do seu respectivo tratamento, de modo a pulverizar todas as gramíneas e solo do vaso (Imagem 12).

Imagem 12 Pulverização dos vasos com seus respectivos tratamentos



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

A partir de então, os vasos receberam irrigação artificial com 300 mL de água cada, apenas em períodos de estiagem que ultrapassassem 2 dias, afim de fazer com que as gramíneas não passassem por desidratação crítica, e assim mantendo uma condição mais próxima da condição das gramíneas do campo.

### **5.7. Avaliação de patogenicidade de *M. anisopliae* sobre NGIs após o tratamento**

Após sete dias da deposição das fezes contendo ovos de NGIs, foram realizadas coletas semanais durante 4 semanas, de alíquotas de 2g das amostras de fezes, 2g de solo e 2g de gramíneas, sendo pesadas e processadas pela técnica de Baermann, onde essas amostras foram colocadas em gaze dobrada em quatro e este conjunto colocado sobre um funil contendo um tubo de borracha conectado à extremidade inferior de sua haste. A borracha foi obliterada com uma presilha, e então adicionando-se água aquecida (45°C) ao funil, em quantidade suficiente para entrar em contato com as fezes, solo e gramíneas, permanecendo em repouso durante uma noite. No dia seguinte, a presilha foi aberta, recolhendo-se cerca de 7 mL de sedimento em tubo de centrífuga e o volume completado com água para 12 mL, centrifugando por 2 minutos a 1120 x g. O sobrenadante foi então descartado, ficando 2 mL, que

foram homogeneizados e realizada a pipetagem de 100  $\mu$ L para uma lâmina de vidro, seguido de identificação e contagem de larvas ao microscópio óptico, para verificar o percentual de larvas recuperadas. O cálculo da eficácia dos tratamentos foi feito utilizando a mesma fórmula de percentual de redução de larvas do teste *in vitro* (Imagem 13).

Imagem 13 (A) Processamento das amostras pela técnica de Baermann; (B) Contagem de larvas ao microscópio óptico das amostras coletadas do Baermann.



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

### **5.8. Isolamento e identificação de colônias de *Metarhizium anisopliae* para a avaliação da persistência do fungo no solo**

Para monitorar o desenvolvimento do fungo inoculado nos vasos, foram coletadas aleatoriamente três amostras de solo de 3 vasos distintos de cada tratamento. As amostras foram homogeneizadas, formando posteriormente uma única amostra composta de cada tratamento. Os momentos de coleta ocorreram: no dia do tratamento, antes da pulverização (dia 0), a fim de verificar se o solo já apresentava *M. anisopliae*, e no 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 52<sup>o</sup> dia após o tratamento.

Posteriormente foi pesada em microtubos, uma alíquota de 0,35g de cada amostra composta e diluída em um mL de solução de Tween 80 a 0,01%. Após agitação vigorosa por 30 segundos em agitador tipo Vórtex, uma alíquota de 50 $\mu$ l foi adicionada em placas de Petri (três placas de Petri para cada vaso) contendo meio seletivo CTC (Extrato de Levedura, Cloranfenicol, Tiabendazol e

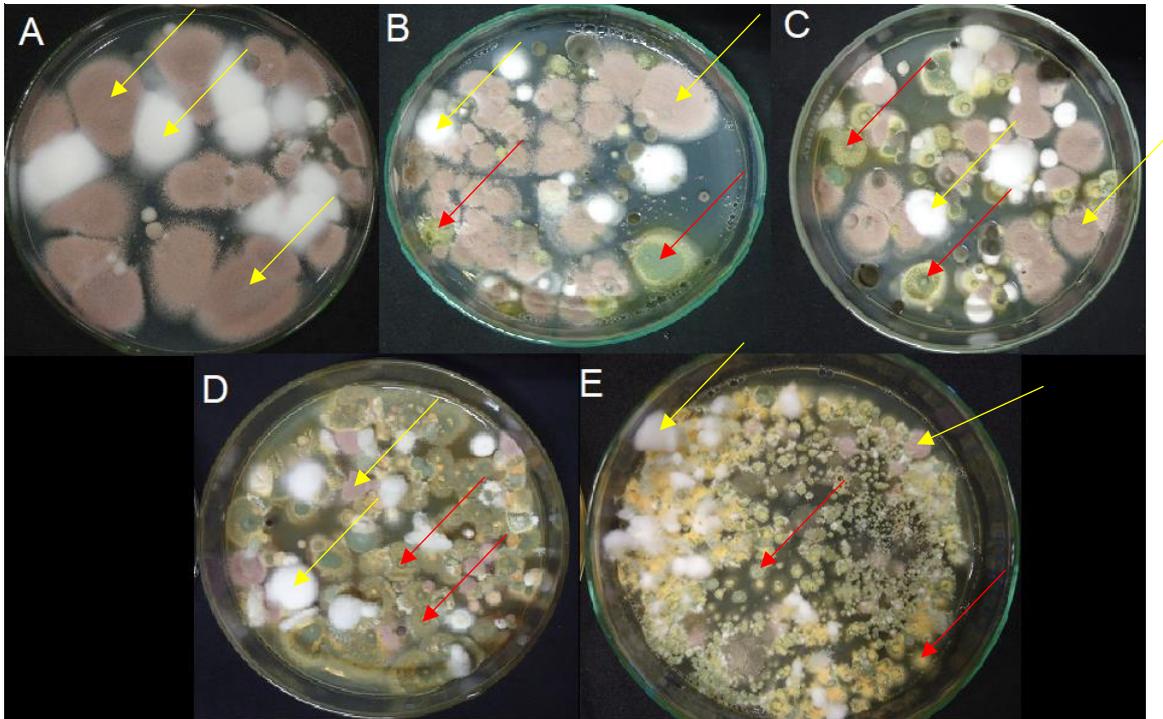
Ciclohexamida) e distribuída com auxílio da alça Drigalski de forma homogênea sobre o meio de cultura, conforme a metodologia descrita por Fernandes *et al.* (2010).

As placas de Petri foram mantidas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa  $\geq 80\%$  durante 21 dias, sendo analisadas a cada sete dias quanto a presença ou não de colônias características de *M. anisopliae*. A avaliação da quantidade das colônias seguiu a metodologia proposta por Marciano (2016), em que três observadores, analisaram visualmente as características das colônias presentes nas placas de Petri (Imagem 14), e foi categorizado quanto a presença e quantidade de colônias de *Metarhizium* sp., variando entre sem cruz (-) a quatro cruces (++++), sendo que, sem cruz (-) equivale a nenhuma colônia de *Metarhizium* sp., uma cruz (+) equivalem de 1 a 25 colônias de *Metarhizium* sp., duas cruces (++) equivalem de 26 a 50 colônias de *Metarhizium* sp., três cruces (+++) equivalem de 51 a 75 colônias de *Metarhizium* sp. e quatro cruces (++++) equivalem a mais de 76 colônias, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 Método de mensuração de colônias fúngicas, baseado no número de cruces (+) que categoriza a quantidade de colônias isoladas em placas de Petri após a inoculação das amostras de solo em meio seletivo CTC para *Metarhizium* sp.

Número de cruces	Intervalo do número de colônias
-	0
+	1 – 25
++	26 – 50
+++	51 – 75
++++	$\geq 76$

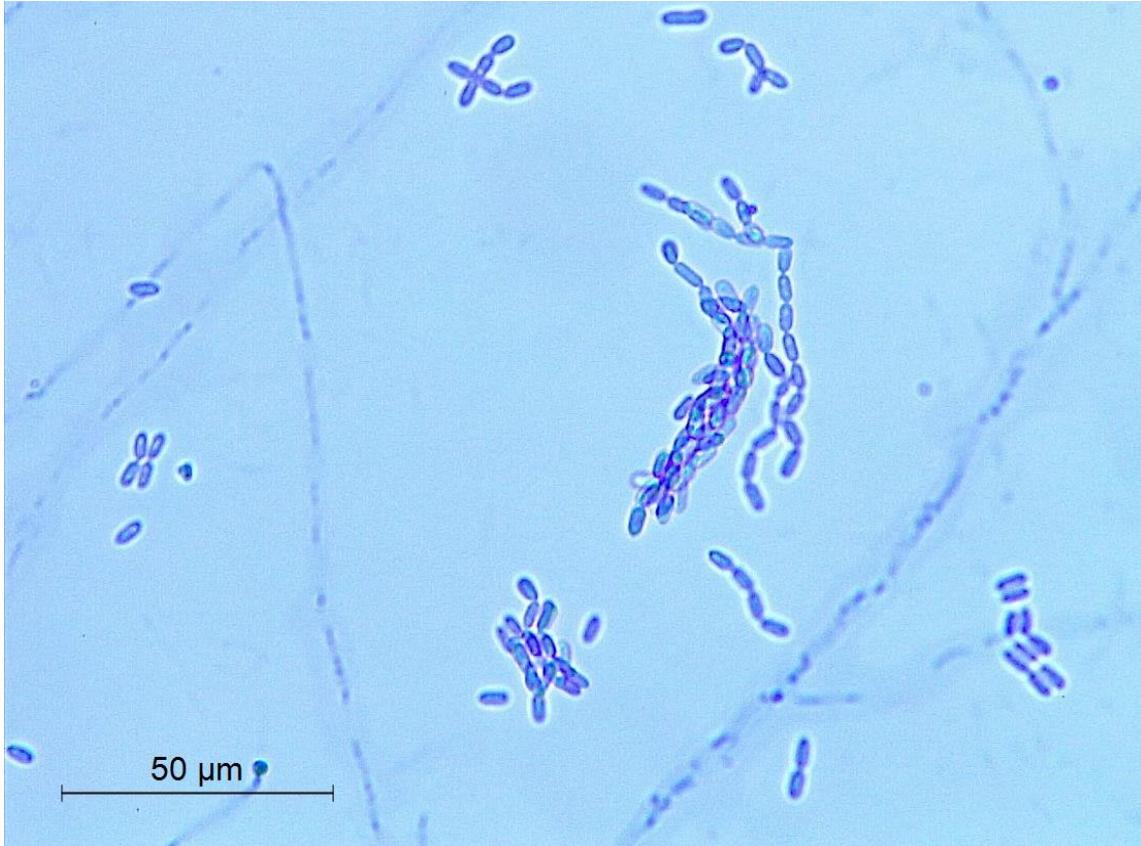
Imagem 14 Isolamento de colônias de *Metarhizium* sp. (setas vermelhas) e outras colônias de fungos contaminantes (setas amarelas) em meio seletivo CTC a partir de amostras de solo.



Fonte: Arquivo pessoal (2020). Legenda: (A) Placa sem colônias características de *Metarhizium* sp. avaliada com sinal de menos (-) contendo apenas colônias de fungos contaminantes; (B) Placa contendo de 1 a 25 colônias características de *Metarhizium* sp. avaliada com uma cruz (+) e apresentando colônias de fungos contaminantes; (C) Placa contendo de 26 a 50 colônias características de *Metarhizium* sp. avaliada com duas cruces (++) e apresentando colônia de fungo contaminante; (D) Placa contendo de 51- 75 colônias características de *Metarhizium* sp. avaliada com três cruces (+++) e apresentando colônia de fungo contaminante; (E) Placa contendo mais de 76 colônias características de *Metarhizium* sp. avaliada com quatro cruces (++++).

Também foi feita a análise das características microscópicas das colônias encontradas, a partir da técnica de microcultivo entre lâmina e lamínula (RIDDELL, 1950). As características macro e microscópicas foram avaliadas seguindo as descritas na literatura por Tulloch (1976); Driver *et al.* (2000) e Bischoff *et al.* (2009). Devendo apresentar macroscopicamente colônia com pigmentação inicial branca, passando à amarela e tomando uma coloração verde com seu amadurecimento. Microscopicamente devem apresentar forma cilíndrica a oval, ligeiramente estreitados no meio, podendo ser truncados em ambas as extremidades, com medidas podendo variar entre 3,5 x 9,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e dispostos em cadeias de colunas (Imagem 15).

Imagem 15 Presença de conídios com características de *Metarhizium* sp. obtida de microcultivo.



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

### 5.9. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise descritiva e posteriormente feito a distribuição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, sendo constatado que os dados eram paramétricos (Anexos A e B). Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para a comparação entre as médias. Na avaliação do número de colônias fúngicas, para a análise de concordância entre os observadores, foi utilizada a estatística de Kappa seguindo a interpretação segundo Landis e Koch (1977) (Tabela 2).

Tabela 2 Intervalos de medidas de concordâncias entre os observadores, segundo o teste Kappa, segundo interpretação de Landis e Koch (1977)

Valores de Kappa	Interpretação
<0	Nenhuma concordância
0 – 0,19	Baixa concordância
0,20 – 0,39	Razoável concordância
0,40- 0,59	Moderada concordância
0,60 – 0,79	Substancial concordância
0,80-1,00	Quase/perfeita concordância

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Viabilidade das formulações

Os conídios das suspensões do isolado de *M. anisopliae* utilizados nos experimentos *in vitro* e em condições seminaturais apresentaram 99% de germinação após 24h de incubação a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### 6.2. Ensaio biológico com NGIs *in vitro*

O número de larvas quantificadas nos grupos tratados com o fungo *M. anisopliae*, foi significativamente menor do que o grupo controle água ( $P < 0,05$ ), enquanto os grupos controle óleo e formulação aquosa de *M. anisopliae* não apresentaram diferença significativa entre si ( $P > 0,05$ ), mas diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) do grupo controle água (Tabela 3). A formulação oleosa, apresentou o melhor percentual, com eficácia de 70% quando comparado com controle água, e eficácia de 43% quando comparado com controle óleo (Tabela 4)

Tabela 3 Média  $\pm$  desvio padrão de larvas recuperadas após teste *in vitro* com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de *M. anisopliae* (FUN-A), e Formulação oleosa de *M. anisopliae* (FUN-O).

Grupos	Número de larvas
CTR-A	2397 $\pm$ 344 a
CTR-O	1262 $\pm$ 132 b
FUN-A	1304 $\pm$ 136 b
FUN-O	719 $\pm$ 100 c

Médias seguidas da mesma letra na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa ( $p \geq 0,05$ ), segundo o teste de Tukey.

Tabela 4 Eficácia após teste *in vitro* com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de *M. anisopliae* (FUN-A), e Formulação oleosa de *M. anisopliae* (FUN-O).

Grupo controle	Grupo tratado	Eficácia (%)
CTR-A	CTR-O	47,3
CTR-A	FUN-A	45,5
CTR-A	FUN-O	70
CTR-O	FUN-A	-3,3
CTR-O	FUN-O	43

### 6.3. Ensaio em Condições Seminaturais

No período de avaliação todos os grupos diferiram do grupo controle água ( $p < 0,05$ ). Apenas na primeira coleta não houve diferença significativa entre controle óleo e a formulação aquosa de *M. anisopliae*, e apenas na segunda coleta as formulações fúngicas não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ) (Tabela 5). A formulação oleosa de *M. anisopliae*, apresentou o melhor percentual de redução, com eficácia de até 95,9% (Tabela 6).

Tabela 5 Média  $\pm$  desvio padrão de larvas recuperadas após teste em condições seminaturais com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de *M. anisopliae* (FUN-A), e Formulação oleosa de *M. anisopliae* (FUN-O).

Grupos	Coleta do dia 7	Coleta do dia 14	Coleta do dia 21	Coleta do dia 28
	Número de larvas	Número de larvas	Número de larvas	Número de larvas
CTR-A	105 $\pm$ 6.77 a	141 $\pm$ 23.4 a	126 $\pm$ 23,5 a	106 $\pm$ 15.7 a
CTR-O	70,6 $\pm$ 4,84 bc	85,2 $\pm$ 9,22 b	52,5 $\pm$ 2,88 b	49,6 $\pm$ 1,60 b
FUN-A	67,2 $\pm$ 8,15 c	38,6 $\pm$ 7,39 c	28,6 $\pm$ 4,63 c	23,4 $\pm$ 4,84 c
FUN-O	40,5 $\pm$ 7,54 d	21,8 $\pm$ 4,13 c	5,12 $\pm$ 2,85 d	5,25 $\pm$ 3,62 d

Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ), segundo o teste de Tukey.

Tabela 6 Eficácia após teste em condições seminaturais com os tratamentos: Controle água (CTR-A), Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de *M. anisopliae* (FUN-A), e Formulação oleosa de *M. anisopliae* (FUN-O).

Grupo controle	Grupo tratado	Eficácia (%)				Eficácia Media (%)
		Primeira coleta	Segunda coleta	Terceira coleta	Quarta coleta	
CTR-A	CTR-O	32,7	39,5	58,3	53,2	45,9
CTR-A	FUN-A	36	72,6	77,3	77,9	65,9
CTR-A	FUN-O	61,4	84,5	95,9	95	84,2
CTR-O	FUN-A	4,8	54,6	45,5	52,8	39,4
CTR-O	FUN-O	42,6	74,4	90,2	89,4	74,1

#### **6.4. Condições Climáticas**

A partir do quinto dia após o início do experimento, houve a presença de chuvas em alguns dias do período do experimento, que com chuvas diárias que variaram de 0,2 a 18,9 mm, porém ocorreram também períodos de estiagens prolongados, de até 11 dias. Nos cinquenta e dois dias de experimentação a precipitação total foi de 89,3 mm (Anexo C). A umidade média foi 78,57%, variando entre 34% e 100% (Anexo C) e a temperatura média foi 25,2 °C, variando entre 14,9 °C e 34,4 °C (Anexo D).

#### **6.5. Mensuração da presença de *Metarhizium* sp. – Análise de concordância**

As mensurações feitas pelos avaliadores, foram analisadas pelo teste Kaapa, seguindo metodologia proposta por Marciano (2016), onde foi verificado concordância variando entre 0,15 e 0,91 entre os mesmos. Verificou-se uma moderada concordância entre os avaliadores nos controles água e óleo, e nos tratamentos com as formulações fúngicas constatou-se uma perfeita ou quase perfeita concordância entre dois observadores, no entanto quando avaliado a concordância dos dois com o terceiro observador, teve-se baixa concordância. Na Tabela 7 pode-se verificar o grau de concordância entre os observadores.

Tabela 7 - Comparação da concordância entre as avaliações feita por três observadores (OBS) do número de colônias de *Metarhizium* sp. em placas de Petri contendo meio seletivo (CTC - Meio BDA acrescido de Extrato de Levedura, Cloranfenicol, Tiabendazol e Ciclohexamida). A concordância foi mensurada utilizando o método de análise Kappa, onde o valor máximo é igual a 1, e quanto mais próximo deste, maior a concordância.

	Controle Água			Controle Óleo			Formulação conidial aquosa			Formulação conidial oleosa		
	OBS 1	OBS 2	OBS 3	OBS 1	OBS 2	OBS 3	OBS 1	OBS 2	OBS 3	OBS 1	OBS 2	OBS 3
OBS 1	---	0,48*	0,48*	---	0,48*	0,48*	--	0,91*	0,15*	--	0,87*	0,15*
OBS 2	0,48*	---	0,48*	0,48*	---	0,48*	0,91*	--	0,15*	0,87*	--	0,15*
OBS 3	0,48*	0,48*	---	0,48*	0,48*	---	0,15*	0,15*	--	0,15*	0,15*	--

\*Significantes ao nível de  $\alpha=5\%$

### 6.6. Reisolamento de *Metarhizium* sp. a partir da amostra de solo

No período de avaliação correspondente a primeira coleta, realizada no dia zero, antes da pulverização dos vasos com os tratamentos, não foram identificadas colônias características de *Metarhizium* sp. nos grupos. A partir da segunda coleta, foram identificadas colônias características de *Metarhizium* sp., apenas nos grupos tratados com formulação aquosa e oleosa de *M. anisopliae*. Entre a segunda e quinta coleta, os grupos tratados com a formulação aquosa e oleosa de *M. anisopliae*, diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) dos grupos controle (água e óleo), exceto pela quarta e quinta coleta, onde foi possível identificar uma redução gradativa no número de colônias do grupo tratado com a formulação aquosa de *M. anisopliae*, e mesmo apresentando colônias características de *Metarhizium* sp, não diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) dos grupos controle (água e óleo) (Tabela 8).

Tabela 8 Mensuração feita segundo o método de cruces (+) da quantidade de colônias por dia (0, 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 52<sup>o</sup>) isoladas do solo dos diferentes grupos antes e após os tratamentos: Controle água (CTR-A); Controle óleo (CTR-O), Formulação aquosa de *M. anisopliae* (FUN-A), Formulação oleosa de *M. anisopliae* (FUN-O), e mantidos em condições seminaturais.

Tratamentos	Dia 0	3 <sup>o</sup> dia	7 <sup>o</sup> dia	21 <sup>o</sup> dia	52 <sup>o</sup> dia
CTR-A	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	a	a	A	a	a
CTR-O	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-
	a	a	A	a	a
FUN-A	-	++++	++++	+++	++
	-	++++	++++	+++	++
	-	++++	++++	+++	++
	a	b	B	ab	ab
	-	++++	++++	++++	+++
FUN-O	-	++++	++++	++++	++++
	-	++++	++++	++++	++++
	-	++++	++++	++++	++++
	a	b	B	b	b

Legenda: (-) Zero colônia de *Metarhizium* sp. isolada; (+) 1 a 25 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas; (++) 26 a 50 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas; (+++) 51 a 75 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas; (++++)  $\geq$  76 colônias de *Metarhizium* sp. isoladas. Cada tratamento possui três linhas, e cada linha é referente a mensuração de um avaliador. Letras minúsculas diferentes no mesmo dia apresentam diferenças significativas ( $p \geq 0,05$ ) segundo o teste de Friedman.

## 7. DISCUSSÃO

Até a data da realização desse trabalho, não foram encontrados na literatura estudos avaliando a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* sobre os NGIs de caprinos, sendo este, o primeiro estudo a demonstrar *in vitro*, que *M. anisopliae* possui ação nematicida sobre esse grupo de helmintos. Da mesma forma, ainda não foram realizados estudos avaliando a patogenicidade do fungo *M. anisopliae* sobre nenhuma espécie de nematoide gastrointestinal em condições seminaturais, sendo esta pesquisa também pioneira no tema. Além disso, os resultados aqui encontrados tanto *in vitro*, como em condições seminaturais, demonstraram que *M. anisopliae* apresenta maior virulência sobre NGI, quando preparado em formulações fúngicas com adição de óleo mineral.

Neste trabalho, o isolado ARSEF 3643 de *M. anisopliae* com bioatividade já conhecida para fêmeas, ovos e larvas de *R. microplus* (JONES, 2017), teve patogenicidade sobre NGI de caprinos verificada inicialmente *in vitro*. Foi possível verificar que o isolado testado apresentou eficácia de até 70%, e mesmo não existindo estudos correlatos avaliando a patogenicidade de *M. anisopliae* sobre NGI de ruminantes, um estudo realizado por RODRIGUES *et al.* (1996), pode demonstrar em teste *in vitro*, que *M. anisopliae* possui ação nematicida sobre os estádios pré-parasitários de nematoides da subfamília Cyathostominae de equinos. No estudo realizado por RODRIGUES *et al.* (1996), eles puderam verificar que tanto na concentração de  $1,3 \times 10^6$  conídios/grama, como  $1,3 \times 10^8$  conídios/grama, apresentaram reduções no número de larvas recuperadas, quando comparadas ao grupo controle. As reduções variaram de 55,4% a 85,1% respectivamente, evidenciando que na concentração de  $1,3 \times 10^8$  conídios/grama, foram obtidos os melhores resultados na redução de nematoides da subfamília Cyathostominae de equinos.

No teste *in vitro* do presente estudo, o grupo tratado com a formulação fúngica acrescida de 10% de óleo mineral, obteve um resultado melhor, apresentando uma maior redução no número de larvas, com 70% de eficácia quando comparado ao controle água, e com isso pode-se inferir, que o óleo potencializou a ação do fungo. Este evento observado com a adição do óleo mineral conferido à formulação fúngica, faz dele um bom adjuvante para

formulações fúngicas a base de *M. anisopliae*, fato este que vem sendo atribuído a maior tolerância proporcionada por formulações de conídios à base de óleo, a fatores abióticos como temperatura (PAIXÃO *et al.*, 2017; ALVES *et al.*, 2017), além das propriedades cutinófilas do óleo (PRIOR, C., JOLLANDS, P., e LE PATOUREL, G., 1988), que também pode favorecer a adesão dos conídios aos nematoides, tendo em vista que a parede do corpo dos nematoides é constituída de três partes principais: hipoderme, camada muscular, e cutícula na parte externa no corpo (RODRIGUES, 2016). No entanto, o estudo também evidenciou que o óleo mineral por si só, é capaz de promover redução no número de larvas, tendo apresentado eficácia de 47,3% quando comparando o controle óleo em relação ao controle água. Como anteriormente citado, não existem outros estudos que corroborem desse achado em NGIs, no entanto, autores demonstraram que os óleos apresentam efeito tóxico sobre outros parasitos, como os carrapatos (ABDEL-SHAFY; SOLIMAN, 2004; CAMARGO *et al.*, 2012). Outra possibilidade relatada é a capacidade de causar a morte dos carrapatos por asfixia, por obstruírem os espiráculos respiratórios (VINCENT *et al.*, 2003; NAJAR RODRÍGUEZ *et al.*, 2008), sendo uma possibilidade a ser considerada também sobre a mortalidade causada aos NGIs nesse estudo, quando tratados com o controle óleo, por possivelmente dificultar ou impedir a troca gasosa realizada pela cutícula.

No experimento em condições seminaturais, o isolado ARSEF 3643 de *M. anisopliae*, demonstrou ser capaz de promover reduções no número de larvas infectantes, em todas as semanas avaliadas. As eficácias observadas variaram de 36% a 95,9% quando comparado com o controle água, e eficácia variando de 4,8% a 90,2% quando comparando as formulações fúngicas com o controle óleo. Essa redução ocorreu, possivelmente pela capacidade dos conídios, de realizar a penetração direta via cutícula no nematoide, e pela produção de hifas infecciosas dentro do corpo do nematoide, e por consequência acaba por matar o parasito (DEVI, 2018). Essa redução em todas as semanas, também pode ser atribuída ao fato de que foi possível identificar colônias com características de *Metarhizium* sp. no solo dos vasos que foram pulverizados com as formulações de *M. anisopliae*.

No presente estudo, a formulação que obteve a melhor média após as quatro semanas observadas, foi a associação de *M. anisopliae* com o veículo

oleoso, com eficácia média de 74,1% após as quatro coletas quando comparando com o controle óleo, e eficácia média de 84,2% quando comparado com o controle água. Até a data da realização desse trabalho, não foram encontrados estudos comprovando que a adição de óleo mineral a formulação fúngica, faça com que a formulação seja mais eficaz no controle de nematoides gastrintestinais. No entanto, pesquisadores tem demonstrado em testes com carrapatos, que quando os fungos são formulados com veículos oleosos, há um aumento da eficácia (CAMARGO *et al.*, 2012; PERINOTTO *et al.*, 2013; CAMARGO *et al.*, 2014; CAMARGO *et al.*, 2016; ALVES *et al.*, 2017; PERINOTTO *et al.*, 2017).

O maior percentual de eficácia de *M. anisopliae* observada no experimento em condições seminaturais, quando em formulações acrescidas de óleo mineral, está possivelmente relacionada ao fato de conferir maior resistência contra os efeitos de temperatura extrema, podendo proteger os conídios contra o atraso induzido pelo calor na germinação e na produção de apressório (BARRETO *et al.*, 2016), além de ser capaz de proteger os conídios dos efeitos adversos das altas temperaturas da água antes da pulverização no campo (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Durante o experimento, foi verificado grandes variações de temperatura, variando entre 14,9 e 34,4 °C, havendo uma média de 25,2 °C, sendo essas variações de temperatura considerada fator de estresse aos conídios (BARRETO *et al.*, 2016). No entanto, a faixa de temperatura identificada durante os dias de experimento, estão dentro da faixa de temperatura necessária para o desenvolvimento de *M. anisopliae*, que é entre 15°C e 35°C (ALVES *et al.*, 1984). exceto pelo 49º dia do experimento que apresentou uma temperatura mínima de 14,9°C, no entanto estando muito próximo dos 15°C supracitado, além da temperatura máxima, que foi de 34,4°C, está distante das temperaturas extremas de 40 a 45°, que são consideradas faixa de temperatura onde não são detectado esporulação, germinação, nem desenvolvimento de nenhuma microestrutura (VIEIRA *et al.*, 2009).

Outro fator abiótico que é tido como fator limitante para o desenvolvimento de *M. anisopliae*, é a umidade relativa do ar, que também é de extrema importância nas fases de disseminação, germinação e penetração (ALVES, 1998). E no presente trabalho, foi verificado que também houve grandes

variações, havendo uma média de 78,5% de umidade relativa do ar, variando entre 34% e 100%. Mesmo com a grande variação identificada, o período de experimentação apresentou uma média de umidade relativa do ar considerada alta, tendo dias com máxima de 100% que é considerado ideal para *M. anisopliae* germinar no ambiente, tendo em vista que ele necessita de alta umidade relativa (WALSTAD *et al.*, 1970).

No presente trabalho, foi possível constatar através dos testes de reisolamento de *Metarhizium* sp. do solo, que no grupo tratado com a formulação fúngica acrescida de 10% de óleo mineral, obteve-se mais colônias que a formulação fúngica aquosa no 21º e 52º dias após o tratamento. Com isso pode-se inferir, que o óleo mineral conferiu aos conídios maior proteção aos fatores abióticos nas condições que foram submetidos, e possivelmente fazendo com que *Metarhizium* sp. ficasse mais viável e apto a dar continuidade ao ciclo de vida no ambiente. Porém, mesmo em menor quantidade, o isolado avaliado em formulação aquosa, assim como na formulação oleosa, foi identificado em todas as coletas após o tratamento, sendo capaz de se manter no solo dos vasos pelos 52 dias do experimento, onde foi capaz inclusive de promover redução significativa dos nematoides em todas as coletas.

Sendo este um estudo pioneiro ao avaliar a patogenicidade dos fungos entomopatogênicos *M. anisopliae* (isolado ARSEF 3643) sobre a fase pré-parasitaria de NGIs de caprinos, os resultados encontrados se mostraram muito relevantes, e são considerados motivadores para dar continuidade a esta linha de pesquisa. Estudos futuros poderão avaliar, a sua virulência sobre a fase pré-parasitaria de NGIs de ruminantes, quando associado a outros adjuvantes como óleo vegetal, além da possibilidade de avaliar concentrações diferentes de óleo, que pode impactar diretamente nos custos das formulações. Tendo como próximo passo também a realização do estudo a campo, tendo em vista que se trata de um fungo já amplamente utilizado na agricultura, e com possibilidade de avaliar sua aplicabilidade em um sistema de controle integrado de mais de um parasito, pois como já mencionado, o fungo possui patogenicidade conhecida em outros parasitos de ruminantes, como o carrapato *R. microplus*.

## 8. CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados, pode-se concluir que o isolado de *M. anisopliae* ARSEF 3643 foi capaz de reduzir o número de larvas de NGIs de caprinos, tanto *in vitro* quanto em condições seminaturais. Além disso, foi possível recuperar o fungo da amostra de solo por até 52 dias após o início do experimento. Desta forma, o isolado apresenta potencial para ser utilizado no controle da fase pré-parasitária de nematoides gastrintestinais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, L.R.; CASTRO, A.A.; SILVA, F.J.M; FONSECA, A.H. 2005. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematoides gastrintestinais de ruminantes, na estação seca da baixada fluminense, RJ. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 14(3): 89-94.
- ABDEL-SHAIFY, S.; SOLIMAN, M. M. M., 2004 Toxicity of some essential oils on eggs, larvae and females of *Boophilus annulatus* (Acari: Ixodida: Amblyomidae) infesting cattle in Egypt. *Acarologia*, 44, 23–30.
- ALVES, F.M.; BERNARDO, C.C.; PAIXÃO, F.R.S.; BARRETO, L. P.; LUZ, C.; HUMBER, R.A.; FERNANDES, É. K. K.; 2017. Heat-stressed *Metarhizium anisopliae*: viability (*in vitro*) and virulence (*in vivo*) assessments against the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Pesquisa Parasitológica** 116, 111–121.
- ALVES, S. B.; NOGUEIRA, N. L. 1984. Efeito da temperatura na germinação e viabilidade do *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, Londrina. Resumos... Londrina, 170.
- ALVES, S.B. 1998. Fungos entomopatogênicos. In: Alves S.B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: Fealq. 1163.
- AMANCIO, A. V. F. S.; PEREIRA, P. T. S. 2014. PANORAMA DA CAPRINOCULTURA DE CORTE E LEITE NO BRASIL. **Revista Científica Eletrônica de Ciências Aplicadas da FAIT**.
- AMARANTE, A.F.T. 2014. **Os parasitas de ovinos** [online]. São Paulo: Editora UNESP.
- ARRUDA, W., LÜBECK, I., SCHRANK, A., & VAINSTEIN, M. H. 2005. Morphological Alterations of *Metarhizium anisopliae* During Penetration of *Boophilus microplus* Ticks. **Experimental and Applied Acarology** 37(3-4): 231–244.
- BALDIN, E.L.L; WILCKEN, S.R.S.; PANNUTI, L.E.R.; SCHLICK-SOUZA, E.C.; VANZEI, F.P. 2012. Uso de extratos vegetais, manipueira e nematicida no controle do nematoide das galhas em cenoura. **Summa Phytopathologica** 38(1): 36-41.
- BARRETO, L. P., LUZ, C., MASCARIN, G. M., ROBERTS, D. W., ARRUDA, W., & FERNANDES, É. K. K. 2016. Effect of heat stress and oil formulation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* s.s. on tick cuticle and artificial medium. **Journal of Invertebrate Pathology** 138: 94–103.
- BATISTA, J.F.; CAMPELO, J.E.G.; MORAIS, M.F.; SILVA, MAGALHÃES, P.O.; BARÇANTE, P.C.; SILVA, F.P. da; MENDONÇA, I.L. 2014. Endoparasitismo gastrintestinal em cabras da raça Anglonubiana. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 15(2): 318-326.
- BERTI, F. E.; MACEDO, L. P. M. 2010. Fundamentos de controle biológico de insetos-praga. **Catálogo da publicação na fonte**. Biblioteca Sebastião Fernandes (BSF) – IFRN, 108.
- BERTON, M. P.; SILVA, R. M. O.; PERIPOLLI, E.; STAFUZZA, N. B.; MARTIN, J. F.; ÁLVAREZ, M. S.; GAVINÃ, B. V.; TORO, M. A.; BANCHERO, G.; OLIVEIRA, P. S.; ELER, J. P.; BALDI, F.; FERRAZ, J. B. S. 2017. Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 73(8).
- BEYS-DA-SILVA, W. O. et al. 2020. Updating the Application of *Metarhizium Anisopliae* to Control Cattle Tick *Rhipicephalus Microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology** 208(1): 1-29.
- BISCHOFF, J. F.; REHNER, S. A.; HUMBER, R. A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia** 101: 512-530.
- BORGES S.L., OLIVEIRA A.A., MENDONÇA L.R., LAMBERT S.M., VIANA J.M., NISHI S.M., JULIÃO F.S. & ALMEIDA M.A.O. 2015. Resistência anti-helmíntica em rebanhos caprinos nos biomas Caatinga e Mata Atlântica. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 35(7): 643-648.

- BORGES, C. C. L. 2003. Atividade *in vitro* de anti-helmínticos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de caprinos, utilizando a técnica de coprocultura quantitativa (Ueno, 1995). **Parasitol Latinoam** 58: 142–147.
- BOWMAN, D.D.; LYNN, R.C.; EBERHARD, M.L. & ALCARAZ, A. 2009. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. Elsevier.
- BRAGA, R. N. 2019. Opportunities for investment into small ruminant breeding programmes in Brazil. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 136(5) 313–318.
- BRAGA, R.M. 1980. Desenvolvimento e sobrevivência de ovos de nematódeos de bovinos sob condições naturais. 90 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica
- BRITO, D.R.B.; SANTOS, A.C.G.; TEIXEIRA, W.C.; GUERRA, R.M.S.N.C. 2009. Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira** 10(3): 967-974.
- CAMARGO, M.G.; MARCIANO, A.F.; SA, F.A.; PERINOTTO, W.M.S.; QUINELATO, S.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2014. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology** 205: 271-276.
- CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; PERINOTTO, W.M.S.; SA, F.A.; QUINELATO, S.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2012. Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology** 188(1-2): 140-147.
- CAMARGO, M.G.; NOGUEIRA, M.R.S.; MARCIANO, A.F.; PERINOTTO, W.M.S.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; SCOTT, F.B.; ANGELO, I.C.; PRATA, M.C.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2016. *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. **Veterinary Parasitology** 223: 38-42.
- CEZAR, A.S.; VOGEL, F.S.F.; SANGIONI, L.A.; ANTONELLO, A.M.; CAMILLO, G.; TOSCAN, G.; ARAUJO, L.O. 2010. Ação anti-helmíntica de diferentes formulações de lactonas macrocíclicas em cepas resistentes de nematódeos de bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30(7): 523-528.
- DEVI G. 2018. Nematophagous fungi: *Metarhizium anisopliae*. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**. 3(6).
- DORIGON, S.; GAI, V. F. 2016. Torta de crambe na alimentação de ovinos para o controle de parasitas gastrintestinais. **Revista Cultivando o Saber** 9(3): 265-274.
- DRIVER, F.; MILNER, R. J.; TRUEMAN, J. W. H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. **Mycological Research** 104: 134-150.
- EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Produção Mundial. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial>. Acesso em: 30.nov.2020
- FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control** 43: 237-256.
- FERNANDES, É. K. K., RANGEL, D. E. N., MORAES, Á. M. L., BITTENCOURT, V. R. E. P., & ROBERTS, D. W. 2007. Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. **Journal of Invertebrate Pathology** 96(3): 237–243.
- FERNANDES, É.K.K.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2008. Entomopathogenic fungi against South American tick species. **Experimental and Applied Acarology** 46: 71-93,
- FERNANDES, E.K.K.; KEYSER, C.A.; RANGEL, D.E.N.; FOSTER, R.N.; ROBERTS, D.W. 2010. CTC medium: A novel dodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. **Biological Control** 54: 197-205.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. G. 2008. O controle de fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais. <http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/antagonistas.pdf>.

FONSECA, R. S.; OLIVEIRA, A. F. M.; MARTINS, I. V. F.; DONATELE, D. M.; OLIVEIRA, F. A.; VIDAL, M. L. B.; MOULIN, I. R. M.; QUIRINO, C. R. 2019. Efeitos da torta de neem no controle alternativo de nematóides gastrintestinais em ovinos: Revisão. **PUBVET** 13(4): 1-12.

FORTES, E. 2004. **Parasitologia veterinária**. 4. ed. Porto Alegre: Sulina.

GARCIA, M. V. et al. 2019. Biologia e importância do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. p. 17-27. In: Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. eds. ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; KOLLER, W.W. Embrapa, Brasília, Distrito Federal.

GEMELLI, J. L.; PEREIRA, A. S. C. 2018. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal** 12(3): 327–341.

GORDON, H. MCL.; WHITLOCK, H. N. 1939. A new technique for counting nematode egg in the sheep faeces. **Journal of Council of Science and Industry Research in Australia** 12(1): 50-52.

GUIMARÃES, MJM; LOPES, I. 2015. Análise da precipitação do município de Cruz das Almas através da técnica de quantis. In: XXV Congresso Nacional de Irrigação e Drenagem, São Cristóvão-SE.

HASSUM I.C. 2014. Famacha method as a tool for selective control of nematode parasites in sheep. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 36(3): 251- 254.

HU, G., ST. LEGER, R.J. 2002. Field studies of a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent. **Applied Environmental Microbiology** 68: 6383-6387.

IBGE. Censo agropecuário 2019. Disponível em: <[https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=29&tema=75662](https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=29&tema=75662)>. Acesso em: 10 março. 2019.

LIMA, W.C.; ATHAYDE A.C.R.; MEDEIROS G.R.; LIMA D.A.S.D.; BORBUREMA J.B.; SANTOS E.M.; VILELA V.L.R.; AZEVEDO S.S. 2010. Nematóides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30: 1003-1009.

LYAKU, J.R.S.; MONRAD, J.; KASSUKU, A.A. 1988. larval ecology of bovine strongylid worms in tropical soils. In.: *In vitro* on the longevity of infective strongylid larvae in different soil types. **Tropical Animal Health of Production** 20(1): 190-192.

MACEDO, D. 2005. Seleção e caracterização de *Metarhizium anisopliae* VISANDO AO CONTROLE DE *Mahanarva fimbriolata* (HEMIPTERA: CERCOPIDAE) EM CANA-DE-AÇÚCAR. 104 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAGALHÃES, K. A.; MARTINS, E. C.; LUCENA, C. C.; FILHO, Z. F. H. 2018. Panorama da ovinocultura e da caprinocultura a partir do Censo Agropecuário 2017. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos, n. 7, dezembro.

MAHMUDA, B. B. A.; OMAR, A. I.; FARUQUE, O.; NOTTER, D. R.; PERIASAMY, K.; MONDAL, M. H.; SARDER, J. U.; SHAMSUDDIN, M.; CAO, J.; DU, X.; WU, Z.; ZHAO, S. 2019. Single nucleotide polymorphisms in candidate genes are significantly associated with resistance to *Haemonchus contortus* infection in goats. **Journal of Animal Science and Biotechnology** 30(10).

MANZANILLAB, F.A.H.; ROBERTOSA, N.F.O; GARDUÑOOC, R.G.; SARMIENOB, R.C.; ACOSTAB, J.F.J.T. 2017. Gastrointestinal nematode populations with multipleant helmintic resistance in sheep farms from the hot humid tropics of Mexico. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports** 9: 29–33.

MARCIANO, A.F. 2016. Controle de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae): Uso de formulações oleosas de *Metarhizium* spp. em condições seminaturais. 2016. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.

MARTINS, E.C.; Ms. MAGALHÃES, K.A.; SOUZA, J.D.F. de; GUIMARÃES, V.P.; BARBOSA, C.M.P.; Ms. FILHO, Z.F.H. 2016. Cenários mundial e nacional da caprinocultura e da ovinocultura. **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil** (2): 3-6.

MASCARIN, G. M. et al. 2019. Current status and perspectives of fungal entomopathogens used for microbial control of arthropod pests in Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology** 165(1): 46–53.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; REIS, I. F. 2009. RESISTÊNCIA AOS ANTI-HELMÍNTICOS BENZIMIDAZÓIS EM NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE PEQUENOS RUMINANTES DO SEMIÁRIDO NORDESTINO BRASILEIRO. **Ciência Animal Brasileira** 10(1): 294-300.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; SELAIVE, A. V.; GIRÃO, M. D. 1998. Resistência a anti-helmínticos em nematóides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de pentecoste, estado do ceará. **Ciência Animal** 8(1): 7-11.

MELO, A. C. F. L.; REIS, I. F.; BEVILAQUA, C. M. L.; VIEIRA, L. S.; ECHEVARRIA, A. A. M.; MELO, L. M. 2009. Nematódeos resistentes a anti-helmíntico em rebanhos de ovinos e caprinos do estado do Ceará, Brasil. **Ciência Rural** 33(2)

MELO, V. F. P.; PINHEIRO, R. S. B.; JUNIOR, A. C.; AMÉRICO, J. H. P.; SANTOS, V. C.; ROSESTOLATO, L. L. R. 2015. Manejo de anti-helmínticos no controle de infecções gastrintestinais em cabras. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 16(4): 916-924.

MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. & ARAÚJO, J.V. 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 23(3): 93-100.

MOTTIN, V. D.; CRUZ, J. F.; TEIXEIRA N. M. R.; MARISCO, G.; FIGUEREDO, J. S.; SOUSA, L. S. 2019. Eficácia, toxicidade e letalidade de plantas com potencial atividade anti-helmíntica em pequenos ruminantes no Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 20: 01–23.

MURAD, A. M., LAUMANN, R. A., LIMA, T. DE A., SARMENTO, R. B. C., NORONHA, E. F., ROCHA, T. L., ... FRANCO, O. L. 2006. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** 142(3-4), 365–370.

OLIVEIRA, D.G.P.; LOPES, R.B.; REZENDE, J.M.; DELALIBERA, I. 2018. Increased tolerance of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* conidia to high temperature provided by oil-based formulations. **Journal of Invertebrate Pathology** 151, 151-157

OMAR A, ALAM M, FARUQUE M, MONDAL M, RAIHAN M, ADETULA A. 2017. Variability infecal egg count of *Haemonchus contortus* infection to native goat breeds of China and Bangladesh under natural grazing condition. **Progressive** 27: 473–81.

OPISA, S., DU PLESSIS, H., AKUTSE, K. S., FIABOE, K. K. M., & EKESI, S. 2019. Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* between *Spoladea recurvalis* (Lepidoptera: Crambidae) adults and compatibility of the fungus with the attractant phenylacetaldehyde. **Microbial Pathogenesis** 131: 197–204.

ORLANDELLI, R.C.; PAMPHILE, J.A. 2011. Fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* como agente de controle biológico de insetos pragas. **Revista Saúde e Biologia** 6: 79-82.

PAIXÃO, F.R.S.; MUNIZ, E.R.; BARRETO, L.P.; BERNARDO, C.C.; MASCARIN, G.M.; LUZ C.; FERNANDES, K.K. 2017. Tolerância ao calor aumentada proporcionada por formulações de conídios à base de óleo de *Metarhizium anisopliae* e *Metarhizium robertsii*. **Biocontrol Science and Technology**, 27: 3, 324-337.

PERINOTTO, W.M.S.; ANGELO, I.C.; GOLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; QUINELATO, S.; SA, F.A.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J.B.; MARCIANO, A.F.; MONTEIRO, C.M.O.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2017. *In vitro* pathogenicity of different *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates in oil formulations against *Rhipicephalus microplus*. **Biocontrol Science and Technology** 27: 338-347.

PERINOTTO, W.M.S.; CAMARGO, M.G.; GOLO, P.S.; ANGELO, I.C.; QUINELATO, S.; MONTEIRO, C. M. O.; SA, F.A.; COUTINHO-RODRIGUES, C.J. B.; MARCIANO, A.F.; De PAULO, J.F.; BITTENCOURT, V.R.E.P. 2013. Controle de *Dermacentor nitens* utilizando uma

formulação comercial a base de *Metarhizium anisopliae*. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 35: 35.

PIYUSH, Y. 2011. Rupali singh. A review on anthelmintic drugs and their future scope. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 3(3): 17-21.

PRIOR, C., JOLLANDS, P., & LE PATOUREL, G. 1988. Infectivity of oil and water formulation of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology** 52, 66–72.

REZENDE, J. de O. 2004. Recôncavo Baiano, berço da Universidade Federal segunda da Bahia: passado, presente e futuro. Salvador: P&A, 194.

RIDDELL, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia** 42: 265-270.

RINALDI, L.; CRINGOLI, G. 2012. Parasitological and pathophysiological methods for selective application of anthelmintic treatments in goats. **Small Ruminants Research** 103: 18-22.

RODRIGUES, M.L.A.; 2016. **CLASSIFICAÇÃO E MORFOLOGIA DE NEMATÓIDES EM MEDICINA VETERINÁRIA**. Rio de Janeiro.

RODRIGUES, A.; QUINTANS, L. J.; 2015. Importância da caprinocultura leiteira para o desenvolvimento do cariri paraibano. **Ciência veterinária nos trópicos** 18(2): 15-22.

RODRIGUES, J., BORGES, P.R., FERNANDES, É.K.K., LUZ, C., 2019. Activity of additives and their effect in formulations of *Metarhizium anisopliae* s.l. IP 46 against *Aedes aegypti* adults and on post mortem conidiogenesis. **Acta Tropica** 193: 192–198.

RODRIGUES, M.L.A.; BITTENCOURT, V.R.E.P.; ANJOS, D.H.S.; CASTRO, A.A. 1996. Efeito do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre os estádios pré-parasíticos de Cyathostominae (NEMATODA: STRONGYLIDAE). **Ciência Rural** 26(2): 301-303.

SALGADO, J.A.; SANTOS, C.P. 2016. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 25(1): 3-17.

SANTI, L., SILVA, W. O. B., PINTO, A. F. M., SCHRANK, A., & VAINSTEIN, M. H. 2010. *Metarhizium anisopliae* host–pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology** 114(4): 312–319.

SILVA, H.M. 2008. Parasitismo gastrintestinal em diferentes intensidades de pastejo no capim Tanzânia, em caprinos. 2008. 92f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SILVA, M.E; URIOSTEGUI, M.A.M.; M-O, J.; GIVES, P.M.; HERNÁNDEZ, E.L.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V. 2017. Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária** 26(1): 92-95.

SILVA. H. M. 2014. Nematodioses gastrintestinais de caprinos: uma revisão. **Revista de Ciências Agroveterinárias** 13(2): 199-208.

SWAN, G. E. 1999. The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. **Journal of the South African Veterinary Association** 70(2): 61–70.

TULLOCH, M. 1976. The genus *Metarhizium*. **Transaction of the British Mycological Society** 66: 407-411.

URQUHART, G.M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J.L. 1998. **Parasitologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan (2): 273.

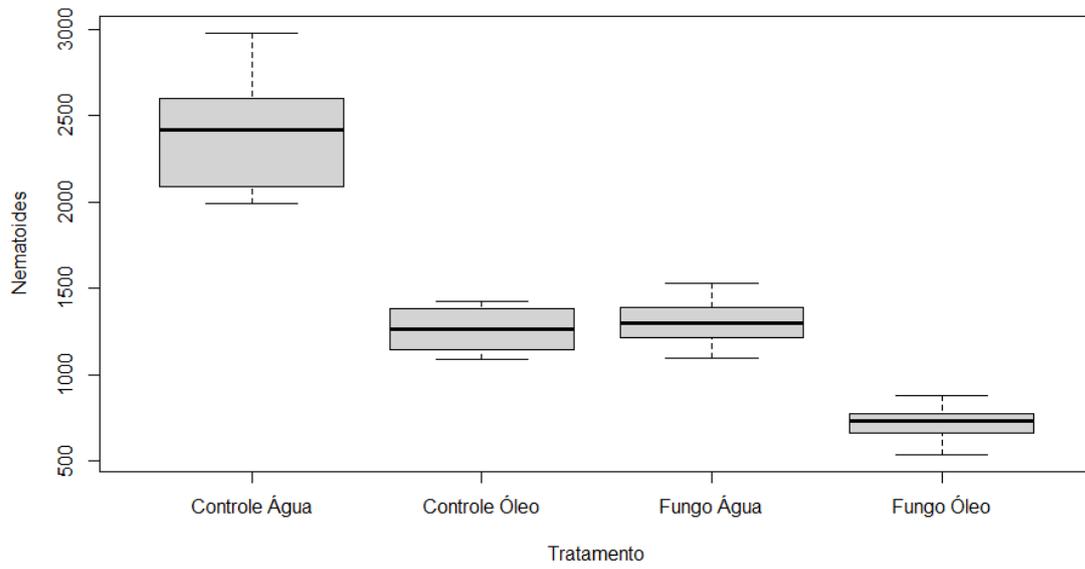
VAN, D.; MORGAN, E. R. 2011. The influence of water on the migration of infective trichostrongyloid larvae onto grass. **Parasitology** 138(6): 780-788.

VERMA, R.; LATA, K.; DAS, G. 2018. An overview of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock and its management: India perspectives. **International Journal of Chemical Studies** 6(2): 1755–1762.

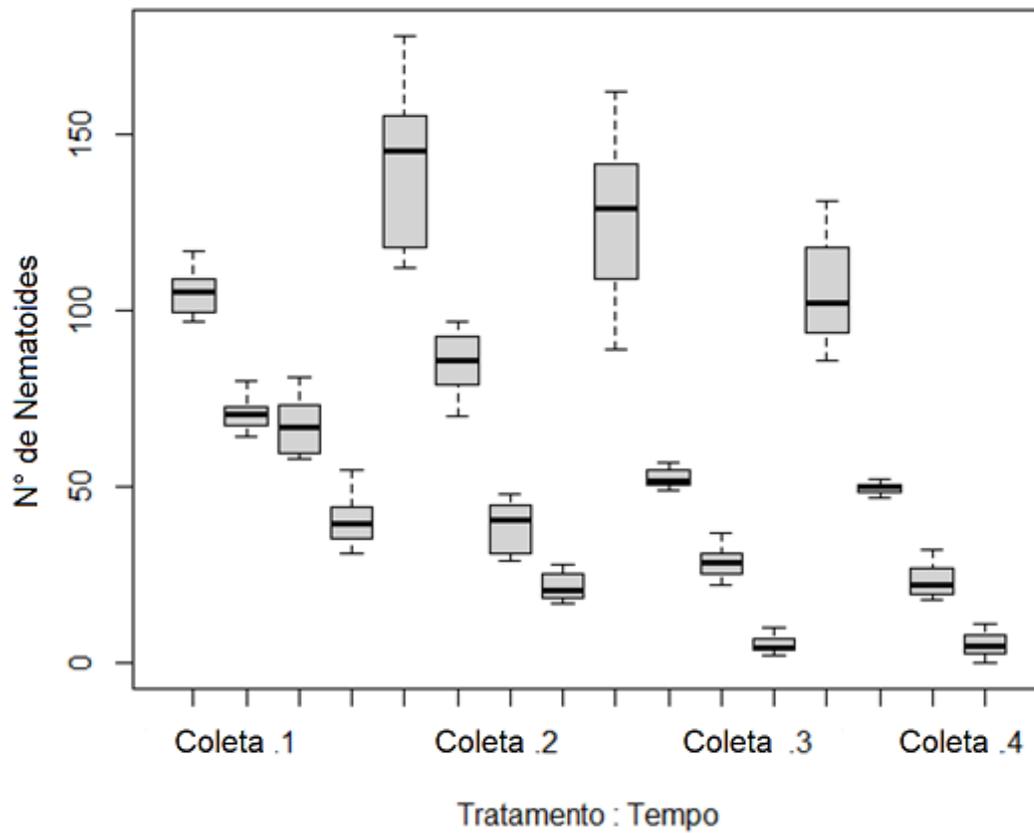
- VIEIRA, L.S.; CAVALCANTE, A.C.R. 1999. Resistência anti-helmíntica em rebanhos de caprinos no estado do Ceará. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30(3): 99-103.
- VIEIRA, P.D.S., SILVA, W.M.T., PAIVA, L.M., LUNA-ALVES LIMA, E.A., CAVALCANTI, E.A. 2009. Estudo da caracterização morfológica, esporulação e germinação de conídios de *Metarhizium anisopliae* var. *acidum* em diferentes temperaturas. **O Biológico** 71(1): 43-47.
- VINCENT, C.; HALLMAN, G.; PANNETON, B.; FLEURAT-LESSARD, F. 2003. Management of agricultural insects with physical control methods. **Annual Review of Entomology**, 48, 261–281.
- WALLER, P.J.; ECHEVARRIA, F.; EDDI, C.; MACIEL, S.; NARIE, A.; HANSEN, J.W. 1996. Prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: General overview. **Veterinary Parasitology** 62: 181–187.
- WALSTAD, J. D.; ANDESON, R. F.; STAMBAUGH, W. J. 1970. Effects of environmental conditio on to species of muscardini fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, **Journal Invertebrate Pathology** 16: 221-226.
- YIP, H. Y.; RATH A. C.; KOEN, T. B. 1992. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae : *Adoyphorus couloni*), **Mycologia**. 96(2): 92-96.
- ZIMMERMANN, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Biocontrol Science and Technology** 17: 879-920.

**ANEXOS**

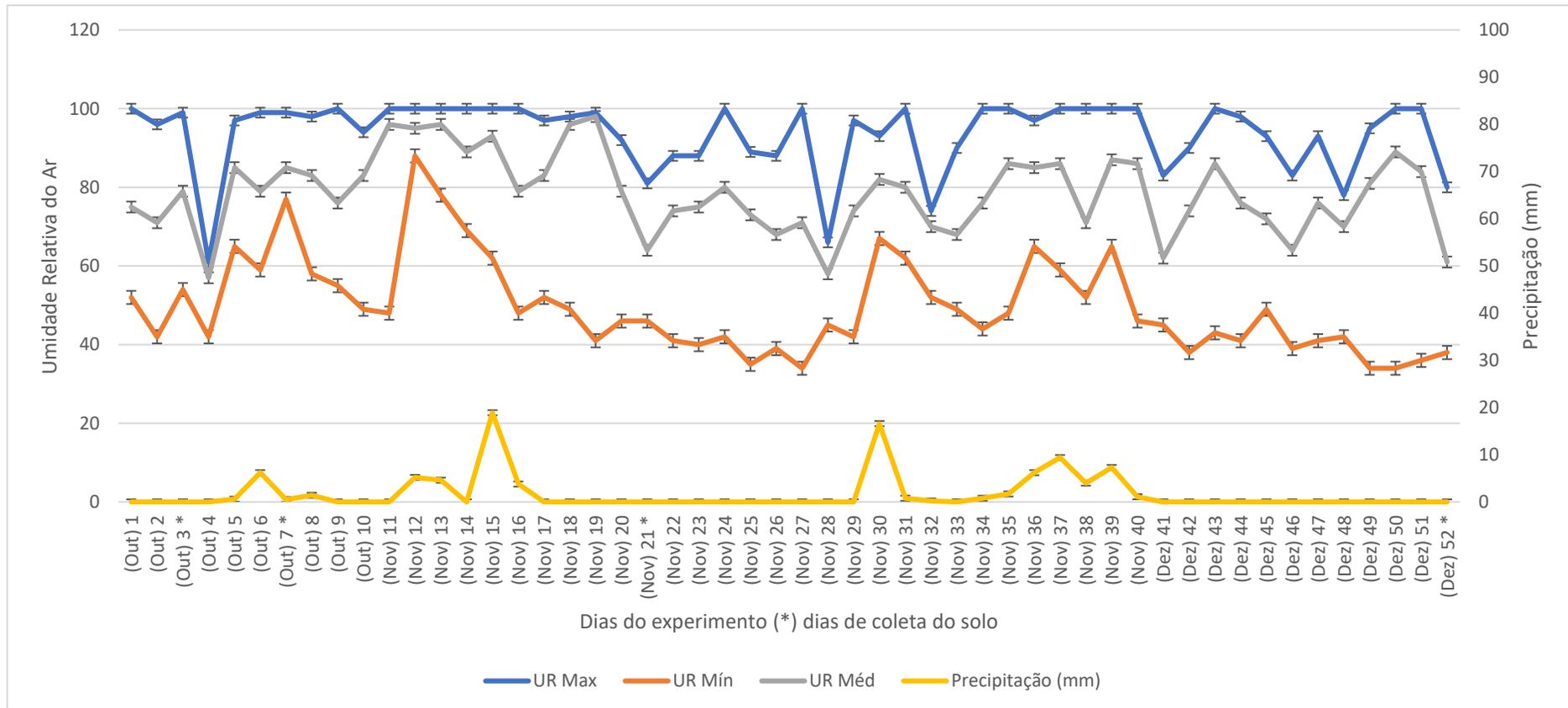
Anexo A Gráfico Box plot dos valores de larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos recuperados do teste *in vitro*



Anexo B Gráfico Box Plot dos valores de larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos recuperados nas 4 semanas em condições seminaturais



Anexo C Variação diária da umidade relativa (UR), máxima (Max), média (Méd), mínima (Mín) e precipitação (mm) durante os 52 dias de avaliação experimental, nos meses de outubro (Out), novembro (Nov) e dezembro (Dez), com destaque (\*) nos dias de coletas de solo para o acompanhamento da presença de *Metarhizium anisopliae* no solo dos vasos mantidos em condições seminaturais.



**APENDICE**

## ITENS EXIGIDOS

<b>PARTE EXTERNA</b>	
CAPA	<b>Obrigatório</b>
LOMBADA	Opcional
<b>PARTE INTERNA – ELEMENTOS PRÉ-TEXTUAIS</b>	
FOLHA DE ROSTO	<b>Obrigatório</b>
FICHA CATALOGRÁFICA	
FOLHA DA COMISSÃO EXAMINADORA	
DEDICATÓRIA	Opcional
AGRADECIMENTOS	
EPIGRAFE	
TÍTULO/RESUMO/PALAVRAS CHAVE	<b>Obrigatório</b>
TITLE/ABSTRACT/KEYWORDS	
LISTA DE ABREVIATURAS, FIGURAS, QUADROS E/OU TABELAS	Opcional
SUMÁRIO	<b>Obrigatório</b>
<b>PARTE INTERNA – ELEMENTOS TEXTUAIS</b>	
INTRODUÇÃO (com Hipótese e Objetivos)	<b>Obrigatório</b>
REVISÃO DE LITERATURA	
MATERIAL E MÉTODOS	
RESULTADOS	
DISCUSSÃO	
CONCLUSÃO	
<b>PARTE INTERNA – ELEMENTOS PÓS-TEXTUAIS</b>	
REFERÊNCIAS	<b>Obrigatório</b>
APÊNDICES	
INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES	Opcional