

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**JÉSSICA MOURATO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE *in vitro* DE *Beauveria*  
*bassiana* SOBRE ESTÁGIOS IMATUROS DE HELMINTOS  
GASTROINTESTINAIS DE CAPRINOS**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**Novembro – 2019**

**JÉSSICA MOURATO DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE *in vitro* DE *Beauveria bassiana* SOBRE ESTÁGIOS IMATUROS DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE CAPRINOS**

Trabalho de conclusão submetido ao Colegiado de Graduação de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

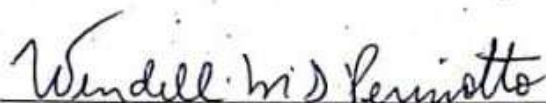
**Novembro – 2019**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CCA106 – TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

JÉSSICA MOURATO DA SILVA

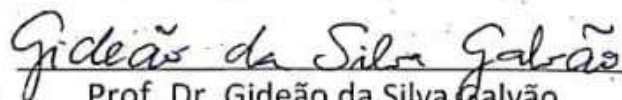
AValiação DA PATOGENICIDADE *IN VITRO* DE *Beauveria bassiana* Sobre  
Estágios Imaturos De Helmintos Gastrointestinais De Caprinos



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



Prof. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. Dr. Gideão da Silva Galvão  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, BA, 26 de novembro de 2019.

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Gilvaci (*in memoriam*) e Josefa, minha irmã Joice, meu sobrinho Gabriel e meu padrasto Josias.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primórdio a Deus, por ter estado ao meu lado em cada instante desse percurso.

À Josefa Mourato, minha mãe, mulher guerreira que sempre esteve ao meu lado, que me educou. Me proporcionou todo o alicerce para chegar até aqui, hoje sei que sorri orgulhosa e chora emocionada.

À Gilvaci Alves da Silva (*in memoriam*) por ter sido o melhor pai e educador em sua passagem rápida na Terra.

A Josias Ribeiro, meu padrasto, sempre me apoiando e ajudando em tudo que eu precisei. Muito obrigada, por fazer um papel de pai tão lindo em minha vida.

À Joice Mourato, minha irmã, que mesmo distante sempre ouvia meus desabafos, aconselhava e ajudava, sempre fez um lindo papel de irmã mais nova. Sendo o meu exemplo de mulher imponderada e independente.

Ao meu sobrinho amado, Lucas Gabriel Mourato, agradeço por ser meu porto seguro.

Obrigada a toda minha família e amigos. Em especial a tio Ambrósio Alves, tia Gilvani Alves, e tia Joásia Dias, que sempre estiveram ao meu lado fazendo muitas vezes o papel de pais, e a tia Gilvânia Alves que sempre foi minha inspiração e nunca mediu esforços para que eu continuasse a estudar.

Agradeço às “Poc’s”: Neivesson Brito e Matheus Antônio Neves, por terem sido meus grandes companheiros nessa caminhada. Os meus irmãos de alma, que sempre foram a minha base forte, o meu cais e por me ensinarem que o amor deve dominar o mundo com a capacidade da auto-cura. Foi um prazer imenso dividir todos esses momentos com vocês e juntos conquistarmos essa vitória.

À Liza Nadine Falcão, que nessa reta final se fez presente em todos os momentos, sendo meu lar, meu cais, e quem acalmava todo o furacão de desespero que habitou em mim. Minha parceira da ciência! Obrigada!

Aos amigos: Rubens da Silva, George William, Letícia Machado, Camila Honorato, Ingrid Loiola, Maria Carolina, por sempre estarem presentes de alguma forma.

A toda equipe que compõe o HUMV, em especial a Manuela Barbosa, Adamas Bonfada, Eurico, Reges, pelos sorrisos em dias de estresse.

A toda equipe do LPDP do HUMV, em especial ao técnico Roque Menezes, que sempre esteve presente em todas as análises me estimulando a não desistir.

A minha orientadora Ana Karina da Silva Cavalcantes, que me acolheu nos primeiros semestres e tornou-se meu guia, minha melhor amiga, MÃE, parceira e o melhor exemplo de humanidade, sensibilidade, afeto carinho e empatia para com o outro. Aquela que toca a sua história com toda sutileza e a muda para melhor. Obrigada!

Ao meu orientador Wendell Perinotto, por todo exemplo profissional, por todos os ensinamentos, obrigada!

Ao corpo docente do curso de medicina veterinária da UFRB por todos os ensinamentos, em especial a Robson Bahia, Natalie Borges, Ricardo Lola e Evani Strada.

A todos, o meu muito obrigado, por cada passagem e parcela de aprendizado que serviram como tijolos na construção do ser humano e da profissional que estou a me tornar.

## EPÍGRAFE

“Somos moldados por nossos pensamentos; nós nos tornamos aquilo que pensamos. Quando a mente é pura, a alegria segue como uma sombra que nunca vai embora.”

Sidarta Gautama

MOURATO DA SILVA, Jéssica, **AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE *in vitro* DE *Beuveria bassiana* SOBRE ESTÁGIOS IMATUROS DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE CAPRINOS**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante

## RESUMO

O cenário da pecuária nacional brasileira vem crescendo significativamente e a caprinocultura, se destacando a cada ano, porém torna-se imprescindível a atenção para com os cuidados na criação de caprinos, no que diz respeito a nutrição, sanidade e ambiência. Entre a grande problemática vivenciada nessas propriedades destaca-se a resitência antihelmíntica ocasionada pela utilização indiscriminada de fármacos com ausência de assistência técnica especializada, isso compete com fornecimento de sub ou sobredoses rotineiramente utilizando o mesmo princípio ativo nessa aplicabilidade sem conhecimentos prévios e vem ocasionando a resitência dos helmintos que parasitam os mesmos. Diante da necessidade do mercado em possuir um rebanho de qualidade, sem grandes perdas econômicas, buscando atender o mercado consumidor e suas exigências, a busca por novas alternativas de controle desses parasitos aumentou significativamente, visando a substituição da alopatia por meios menos artificiais, sendo assim o controle biológico tornou-se uma opção viável como resolução desse agravante. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a patogenicidade *in vitro* do fungo *Beuveria bassiana* sobre os estágios imaturos de helmintos gastrointestinais de caprinos. O trabalho foi realizado no *Campus* da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizado no município de Cruz das Almas - BA. Os testes foram realizados no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV) da UFRB. O experimento foi composto por três grupos, um controle composto pela solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01% e dois tratamentos com formulações aquosas de *B. Bassiana* nas concentrações:  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL e  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL; cada grupo foi composto por seis unidades experimentais. Para avaliar o efeito de *B. Bassiana* sobre os nematoides, foi realizada a técnica de coprocultura quantitativa, utilizando-se dois gramas de fezes contendo ovos de *Trichostrongilídeos*, 2 gramas de serragem e 2ml dos tratamentos supracitados. Após 7 dias de cultivo, foi feita a quantificação das larvas e pode-se observar que o fungo *B. Bassiana* foi capaz de diminuir significativamente o número de helmintos, em ambas as concentrações  $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL, quando comparado ao grupo controle. Através dos resultados conclui-se que *B. Bassiana* é patogênico para estágios imaturos de helmintos gastrointestinais de caprinos, e que a concentração de  $10^8$  conídios/mL é a mais indicada, pois promoveu menor recuperação de larvas. Todavia, salienta-se a necessidade de mais estudos para embasar sua aplicabilidade em campo.

**Palavras-chave:** Caprinocultura; Controle biológico; Fungos nematófagos; Nematoides.



MOURATO DA SILVA, Jéssica, **EVALUATION OF PATHOGENICITY OF *Beauveria bassiana* AGAINST IMMATURE STAGES OF GOAT GASTROINTESTINAL HELMINTHS *in vitro***. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Karina da Silva Cavalcante

## ABSTRACT

The scenario of Brazilian national livestock has been growing significantly and goat farming, standing out each year, but attention to the care of goat breeding is essential, as regards nutrition, health and ambience. Among the major problems experienced in these properties is the antihelmintic resistance caused by the indiscriminate use of drugs without specialized technical assistance, this competes with the provision of sub or overdoses routinely using the same active principle in this applicability without prior knowledge and has been causing the resistance of the helminths that parasitize them. Given the need for the market to have a herd of quality, without major economic losses, seeking to meet the consumer market and its requirements, the search for new alternatives to control these parasites increased significantly, aiming at the replacement of allopathy by less artificial means, thus being Biological control has become a viable option as a resolution of this aggravating factor. Thus, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* on the immature stages of goat gastrointestinal helminths. The work was carried out at the Campus of the Federal University of Recôncavo da Bahia, located in Cruz das Almas - BA. The tests were performed at the Parasitology and Parasitic Diseases Laboratory (LPDP) of the University Hospital of Veterinary Medicine (HUMV) of UFRB. The experiment consisted of three groups, one control composed of sterile distilled water solution and 0.01% Tween 80 and two treatments with aqueous *B. Bassiana* formulations at concentrations:  $1.0 \times 10^7$  conidia / mL and  $1.0 \times 10^8$  conidia / mL; Each group consisted of six experimental units. To evaluate the effect of *B. Bassiana* on the nematodes, the quantitative co-culture technique was performed using two grams of feces containing Trichostrongylid eggs, 2 grams of sawdust and 2ml of the above treatments. After 7 days of cultivation, the larvae were quantified and it can be observed that the fungus *B. Bassiana* was able to significantly reduce the number of helminths in both concentrations  $10^7$  and  $10^8$  conidia / mL when compared to the control group. It is concluded that *B. Bassiana* is pathogenic for immature stages of goat gastrointestinal helminths, and that the concentration of  $10^8$  conidia / mL is the most indicated, since it promoted less larval recovery. However, there is a need for further studies to support its applicability in the field.

**Keywords:** Nematodes; Goat breeding; Biological control; Nematophagous fungi.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Ciclo biológico dos principais nematoides gastrintestinal de caprinos .....	20
Figura 2 – Ciclo biológico de <i>B. bassiana</i> .....	24
Figura 3 – Controle água e <i>Tween</i> (A); Formulação aquosa de <i>B. bassiana</i> , tratado a $1,0 \times 10^7$ conídios/mL (B); Formulação aquosa de <i>B. bassiana</i> , tratado a $1,0 \times 10^8$ (C) .....	26
Figura 4 – Formulações aquosas de <i>B. bassiana</i> nas concentrações de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL (A) e a $1,0 \times 10^8$ (B) .....	26
Figura 5 – Coleta de fezes da ampola retal de caprino .....	27
Figura 6 – Preparo da coprocultura quantitativa (A); Mistura da matéria maravalha com 2g de fezes (B); Adição da solução fúngicas as alíquotas (C) .....	28

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> – Média $\pm$ Desvio padrão de larvas (L3) de Trichostrongilídeos recuperadas sete dias após os tratamentos.....	30

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

HUMV – Hospital Universitário de Medicina Veterinária

L1 – Larva em estágio inicial

L2 – Larva em desenvolvimento

L3 – Larva infectante

LPDP – Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias

OPG – Ovos por gramas de fezes

rpm – Rotações por minuto

UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\leq$  – menor ou igual que

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

% – porcentagem

$\pm$  – mais ou menos

$<$  – menor que

x – multiplicado

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	16
2	OBJETIVOS .....	18
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	HELMINTOS GASTROINESTINAIS DE IMPORTÂNCIA NA CAPRINOCULTURA.....	19
3.2	CONTROLE CONVENCIONAL DE HELMINTOS GRASTROINTESTINAIS EM CAPRINOS .....	20
3.3	FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS.....	21
3.3.1	AÇÃO BIOLÓGICA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS .....	22
3.4	CONTROLE BIOLÓGICO .....	22
3.5	<i>Beauveria bassiana</i> .....	23
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	25
4.2	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS .....	25
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PREPARO DAS SUSPENSÕES FÚNGICAS DE <i>B. bassiana</i> .....	25
4.4	COLETA E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES DE CAPRINO UTILIZADAS NO ENSAIO BIOLÓGICO .....	27
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30

6 CONCLUSÃO ..... 32

REFERÊNCIAS..... 34

## 1 INTRODUÇÃO

Os principais parasitos de importância para pequenos ruminantes são pertencentes à ordem Strongylida, superfamília: Trichostrongyloidea. Dentre as espécies desses nematóides que causam maiores prejuízos na criação de pequenos ruminantes, destacam-se: *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Oesophagostomum spp.* (BRITO et al., 2009).

As características das enfermidades provocadas por helmintos trichostrongilídeos de ruminantes são determinadas por diversos fatores como a susceptibilidade do hospedeiro, a quantidade de larvas infectantes acumuladas nas pastagens e o número de larvas hipobióticas (RADOSTITS et al., 2002).

O uso indiscriminado na utilização de fármacos para combater as diversas hemoparasitoses ocasionou a resistência parasitária, onde os helmintos já não sofrem a injúria esperada pela ação do medicamento. Um reflexo desse uso abusivo é observado em estudos que demonstram que o mercado internacional de insumos veterinários apresenta um gasto de aproximadamente 15 bilhões de dólares, sendo 27% em compostos antiparasitários. O mercado internacional de insumos veterinários apresenta um gasto de aproximadamente 15 bilhões de dólares, sendo 27% em compostos antiparasitários. No Brasil calculam-se custos em torno de 600 milhões de dólares, dos quais 29% são destinados à aquisição de parasiticida. Com isso a procura por alternativas economicamente viáveis e menos agressivas ao meio ambiente ou ao animal vêm crescendo significativamente (MOLENTO; VERISSIMO, 2003).

O ciclo de vida dos nematódeos leva em média de duas a três semanas. Inicia-se quando o parasita adulto elimina os ovos juntamente com as fezes no meio ambiente, ocorrendo à eclosão da larva de primeiro estágio (L1), que se alimenta de microrganismos e muda para o segundo estágio (L2) que também se alimenta e passa para o terceiro estágio (L3) que contém uma bainha protetora e é a fase infectante, a qual não se alimenta e fica no ambiente a espera do hospedeiro (MORAES, 2002).



O controle biológico é uma alternativa ecológica que busca a diminuição populacional parasitária a níveis sub-clínicos desejáveis e manutenção da cadeia produtiva econômica através do uso de antagonistas naturais (GRONVOLD et al., 1996; FERRAZ et al., 2010; OLIVEIRA, 2017).

A maioria dos fungos que contribui para a regulação natural de insetos populações de ácaros pertence às ordens *Hipoconiales* e *Entomoph-thorales* (DOLINSKI; LACEY 2007). Fazendo jus a necessidade de outros métodos para controle de helmintos gastrointestinais em caprinos, devido ao alto custo com produtos farmacológicos, haja vista, que a maioria desses fármacos já apresentam algum nível de resistência para com os nematoides.

Os fungos entomopatogênicos tem aplicações no controle biológico de insetos com grande potencial para o controle no desenvolvimento de populações de insetos sugadores que causam sérios prejuízos à produção de alimentos de origem vegetal (OWNLEY et al., 2008) e animal (KAAYA; HASSAN, 2000), sendo alguns desses fungos testados para o controle de helmintos também (RODRIGUES et al., 1996; PERINOTTO et al., 2018).

A utilização desses microrganismos nesse tipo de controle necessita de quesitos básicos para sua aplicação, tais como, ser de fácil manipulação em laboratório, ser hábil em reduzir populações do patógeno, não ser patogênico a seres humanos e animais, sobreviver no solo em condições adversas, ser fácil de produzir em massa e de baixo custo (GRONVOLD et al., 1996; FERRAZ et al., 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a patogenicidade *in vitro* do fungo *Beauveria bassiana* sobre os estágios imaturos de helmintos gastrointestinais de caprinos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a patogenicidade de *B. bassiana* em duas diferentes concentrações conidiais.
- Avaliar o potencial de ação como bio-nematicida em nematódeos caprinos, em seus estágios imaturos.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE IMPORTÂNCIA NA CAPRINOCULTURA

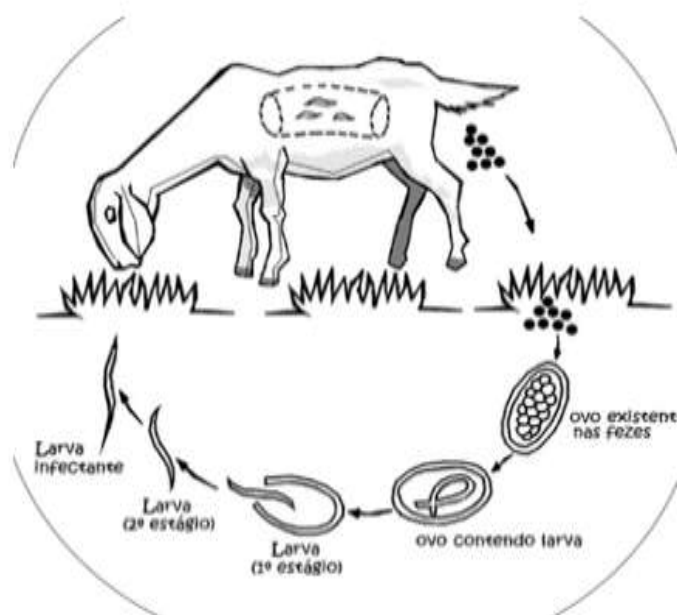
Os principais parasitos de importância para pequenos ruminantes são pertencentes à ordem Strongylida, superfamília: Trichostrongyloidea e dentre as espécies desses nematoides que causam maiores prejuízos na criação de pequenos ruminantes, destacam-se: *Haemonchus spp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Cooperia sp.*, *Oesophagostomum spp.* (BRITO et al., 2009).

As características da doença provocada por helmintos trichostrongilídeos de ruminantes são determinadas por diversos fatores como a suscetibilidade do hospedeiro, a quantidade de larvas infectantes acumuladas nas pastagens e o número de larvas hipobióticas (RADOSTITS et al., 2002).

Vieira (2007) relatou que das parasitoses gastrointestinais, aquelas de maior intensidade de infecção e de maior importância econômica, em pequenos ruminantes, são pertencentes ao gênero *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Strongyloides* e *Oesophagostomum*. Alguns aspectos podem interferir no efeito do parasitismo em um rebanho sendo eles: a intensidade de infecção, categoria dos parasitas existentes, estado fisiológico e nutricional do hospedeiro além da resposta imunológica do mesmo. As respostas imunológicas contra a reinfecção se desenvolvem de forma lenta e incompleta, deixando os rebanhos sujeitos a reincidência das formas clínicas e subclínicas dessa parasitose (PADILHA et al., 2000).

O ciclo de vida dos nematódeos (Figura 1) leva em média de duas a três semanas. Inicia-se quando o parasito adulto elimina os ovos juntamente com as fezes no meio ambiente, ocorrendo a eclosão da larva de primeiro estágio (L1), que se alimenta de microrganismos e muda para o segundo estágio (L2) que também se alimenta e passa para o terceiro estágio (L3) que contém uma bainha protetora e é a fase infectante, a qual não se alimenta e fica no ambiente a espera do hospedeiro (MORAES, 2002).

**Figura 1** – Ciclo biológico dos principais nematoides gastrointestinal de caprinos.



Fonte: BOWMAN, 2010

### 3.2 CONTROLE CONVENCIONAL DE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS EM CAPRINOS

Dentre as estratégias mais utilizadas para o controle das helmintoses, destaca-se a utilização de anti-helmínticos. Entretanto, sua aquisição gera altos custos aos produtores, além de que, quando utilizado de forma indiscriminada pode acelerar o mecanismo de seleção de populações com resistência parasitária, devido seu uso inadequado (AMARANTE, 2008; COSTA; VIEIRA, 2014).

No Brasil, a resistência dos parasitos aos anti-helmínticos tem sido assinalada nas regiões Nordeste (MELO et al., 1998). Onde o tratamento estratégico preconiza que haja quatro vermifugações ao ano, sendo a primeira no início do período seco, a segunda sessenta dias após, a terceira no penúltimo mês do período seco e a quarta em meados do período chuvoso. Este método tem em vista, o conhecimento de que as larvas no período seco têm menor sobrevivência no ambiente, em contrapartida no período chuvoso há maior migração para a forragem e posterior infecção (COSTA; VIEIRA, 1994).

Entretanto, esta prática pode acelerar o aparecimento da resistência antiparasitária, o que coloca em risco o controle da verminose, já que todo rebanho é vermifugado (KAPLAN et al., 2004; MOLENTO, 2004).

O desenvolvimento da resistência junto à redução da poluição ambiental e a produção de alimentos mais saudáveis, contendo menos resíduos geraram grandes desafios, com isso, diversos estudos têm sido realizados visando desenvolver estratégias alternativas de controle para se reduzir a utilização de quimioterápicos. O controle biológico e a homeopatia fazem parte dessas opções descritas (WALLER, 2003; THAMSBORG et al., 1999; WALLER; THAMSBORG, 2004).

O mercado internacional de insumos veterinários apresenta um gasto de aproximadamente 15 bilhões de dólares, sendo 27% em compostos antiparasitários. No Brasil calculam-se custos em torno de 600 milhões de dólares, dos quais 29% são destinados à aquisição de parasiticida (MOLENTO, 2009). Com isso a procura por alternativas economicamente viáveis e menos agressivas ao meio ambiente e/ou ao animal vêm crescendo significativamente.

### 3.3 FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

A maioria dos fungos que contribui para a regulação natural de insetos populações de ácaros pertence às ordens *Hipocreales* e *Entomophthorales* (DOLINSKI; LACEY 2007). A busca de formulações destes microrganismos, de modo a propiciar melhores condições ao fungo, aumentando seu efeito patogênico a campo e o seu uso em programas de manejo integrado, devem ser pesquisados (MONTEIRO; BAHIENSE E BITTENCOURT, 2003).

Os fungos entomopatogênicos tem aplicação no controle biológico de insetos com grande potencial para o controle no desenvolvimento de populações de insetos sugadores que causam sérios prejuízos à produção de alimentos de origem vegetal (OWNLEY et al., 2008) e animal (KAAYA e HASSAN, 2000).

### 3.3.1 Ação biológica dos fungos entomopatogênicos

Os conídios constituem a forma assexuada dos fungos, aderem à cutícula e desenvolvem apressórios infectantes que produzem e liberam enzimas extracelulares como proteases, lipases e quitinases, em resposta à constituição química da cutícula (ANDERSEN, 2002). Pathanet al. (2007) e Wang; Gang e St. Leger (2005) observaram que os fungos *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* em meios de cultivo suplementados com cutículas de insetos e hemolinfa proporcionaram uma expressão significativa dos genes de proteínas responsáveis pelo crescimento dos fungos e colonização do mesmo, propiciando fatores benéficos a sua reprodução.

## 3.4 CONTROLE BIOLÓGICO

Denomina-se de controle biológico natural a regulação espontânea, por organismos vivos (antagonistas), da população de outras espécies animais sem a necessidade de intervenção humana. Este tipo de controle não deve ser subestimado, já que populações de muitos protozoários, artrópodes e helmintos parasitos podem apresentar crescimento descontrolado na ausência de seus respectivos antagonistas naturais (GRONVOLD, 1996)

Com a necessidade da utilização da técnica de controle biológico, diversas espécies de fungos hipocreales estão disponíveis comercialmente para o controle de pragas, insetos ou ácaros indesejados nas diversas plantações existentes, sendo estas pertencentes aos gêneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Aschersonia*, *Hirsutella* e *Lecaninillium* (ALVES,1998; INGLIS et al., 2001; GOETTEL et al., 2005).

Os fungos são patógenos de largo espectro, responsáveis por epizootias naturais. Sua grande variabilidade genética pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de artrópodes (ALVES, 1998).

Com técnicas apropriadas de bioensaios é possível selecionar isolados de fungos altamente virulentos, específicos ou não, com características

adequadas para serem utilizados como inseticidas microbianos (AZEVEDO, 1998).

Bittencourt et al. (1995) verificaram a patogenicidade *in vitro* dos isolados 986 e 747 de *B. bassiana* em ovos e larvas não alimentadas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, observando uma diminuição acentuada do percentual de eclosão e também maior taxa de mortalidade das larvas.

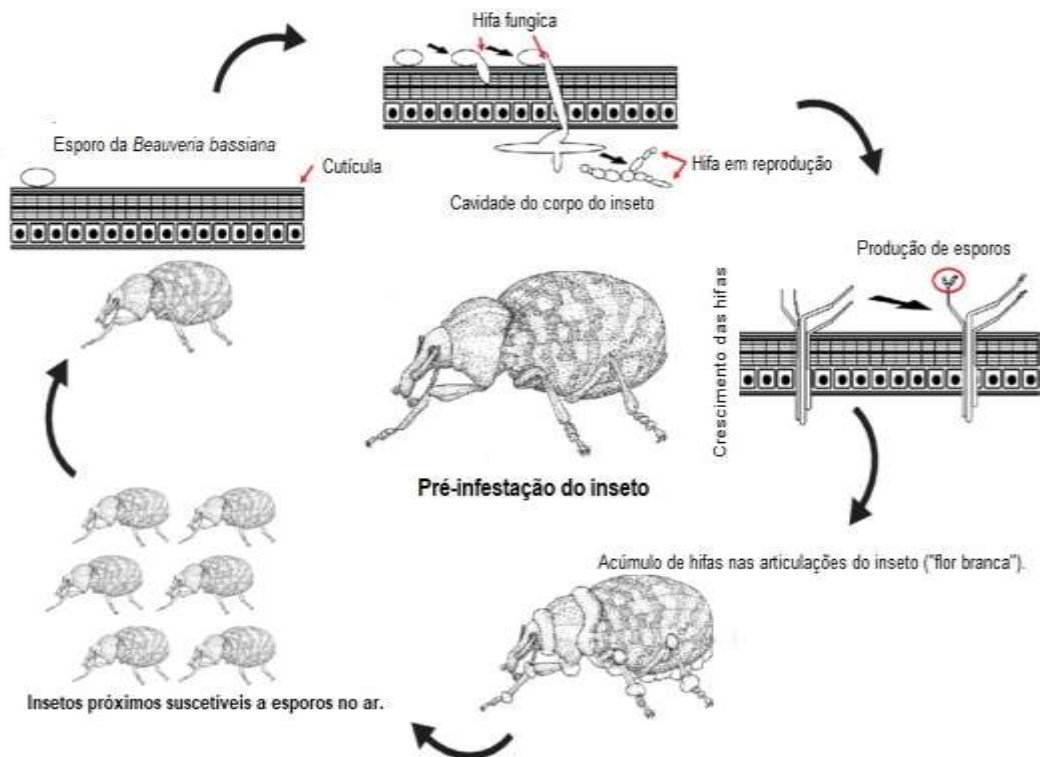
### 3.5 *Beauveria bassiana*

A grande variabilidade genética dos fungos entomopatogênicos pode ser considerada uma das principais vantagens no controle microbiano de artrópodes (YOSHIDA, 2007).

*Beauveria bassiana* é um fungo entomopatogênico pertencente à classe *Deuteromycetes*, de distribuição cosmopolita, amplamente aplicado no controle de pragas (BELL; HAMELLE, 1970). Apresenta conídios globosos ou subglobosos com 2,0 a 3,0 x 2,5 micrômetros, com conidióforos formando densos cachos. A germinação dos conídios ocorre, em geral, num período de 12 horas após inoculação. Em insetos, o fungo penetra no hospedeiro pelo tegumento (Figura 2) devido a ação mecânica de suas hifas e ao efeito de enzimas, em aproximadamente 12 horas. Após 72 horas da inoculação, o hospedeiro se encontra totalmente colonizado, apresentando grande quantidade de conidióforos e conídios característicos da espécie. Causador de epizootia se caracteriza pela alta taxa de crescimento, produção elevada de unidades infectivas, capacidade de sobrevivência no ambiente, facilidade para penetrar pelo tegumento e alcançar a hemolinfa do hospedeiro, reafirmando sua alta patogenicidade (FUXA, 1987).

Segundo Samish; Glazer (1991), o gênero *Beauveria* é um dos mais promissores agentes para controle biológico de artrópodes, pois é de fácil dispersão, possui grande variedade de hospedeiros e habilidade de penetrar pela cutícula.

**Figura 2** – Ciclo biológico de *B. bassiana* em hospedeiro invertebrado.



**Fonte:** Todd Murray, 2013. Adaptado.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O experimento foi realizado após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UFRB, com o número de protocolo: 23007.00030643/2018-26.

### 4.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

O trabalho foi realizado no *Campus* da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizado no município de Cruz das Almas - BA. Os testes foram realizados no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias (LPDP) do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV) da UFRB.

### 4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PREPARO DAS SUSPENSÕES FÚNGICAS DE *B. bassiana*

O experimento foi composto por três grupos: Controle água e *Tween*, tratado com solução de água e *Tween* 80 a 0,01%; Formulação aquosa de *B. bassiana*, tratado a  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL da solução fúngica diluída em água e *Tween* 80 a 0,1%; Formulação aquosa de *B. bassiana*, tratado a  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL da solução fúngica diluída em água e *Tween* 80 a 0,1% (Figura 3); cada grupo foi composto por seis unidades experimentais.

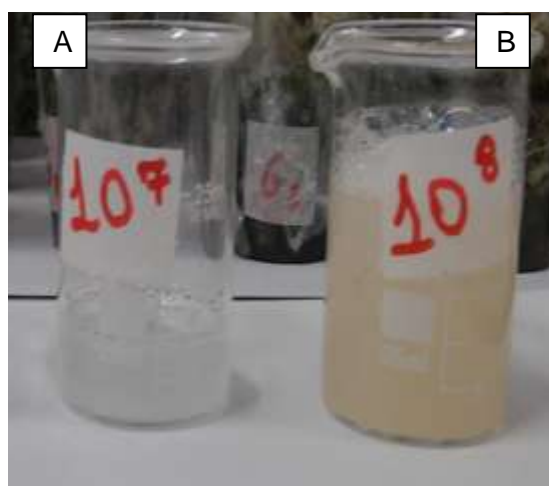
**Figura 03** – Controle água e Tween (A); Formulação aquosa de *B. bassiana*, tratado a  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL (B); Formulação aquosa de *B. bassiana*, tratado a  $1,0 \times 10^8$  (C).



Fonte: Arquivo pessoal.

Para realização deste projeto foi utilizado um produto comercial composto por conídios do isolado ESALQ E9 de *B. bassiana*, produzido pela empresa *Koppert Biological Systems*. Foi preparada uma solução aquosa composta de água destilada estéril e 0,01% de Tween 80, na qual foram adicionados os conídios de acordo com a recomendação do fabricante e em seguida (Figura 4), a suspensão foi quantificada em microscópio óptico com o auxílio da câmara de Neubauer, segundo Alves (1998), tendo as concentrações ajustadas para  $10^7$  conídios/mL e  $10^8$  conídios/mL.

**Figura 4** – Formulação aquosa de *B. bassiana*, tratado a  $1,0 \times 10^7$  conídios/mL (A); Formulação aquosa de *B. bassiana*, tratado a  $1,0 \times 10^8$  (B).



Fonte: Arquivo Pessoal.

#### 4.4 COLETA E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE FEZES DE CAPRINO UTILIZADAS NO ENSAIO BIOLÓGICO

Para esta etapa do experimento, as amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal de caprinos naturalmente infectados e sem tratamento prévio com anti-helmíntico por 60 dias (Figura 5). As amostras foram avaliadas pela contagem do número de ovos por grama de fezes (OPG), de acordo com técnica de Gordon e Whitlock (1939), que consiste em pesar 2g de fezes coletada diretamente da ampola retal do animal, diluir em 58mL de solução hipersaturada de açúcar, homogeneizar, aderir a lamínula e preencher a câmara de Mc Master, proceder com a leitura microscópica em aumento de 10x. O valor da contagem dos dois campos da câmara é então multiplicando pelo fator de correção 100 obtendo assim a quantidade de ovos contidos em 1g de fezes. Em seguida as amostras que apresentassem  $OPG \geq 300$  seriam submetidas à confecção do *pool* das amostras e direcionada para a coprocultura quantitativa.

**Figura 5** – Coleta de fezes da ampola retal de caprino.



Fonte: Arquivo Pessoal.

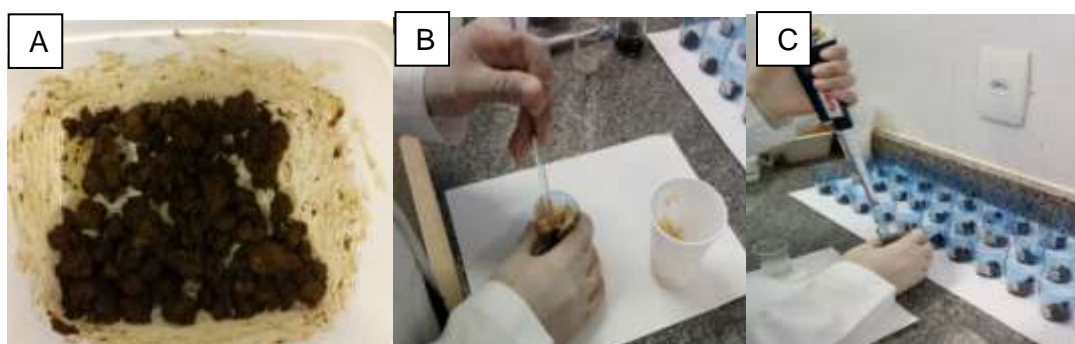
#### 4.5 BIOENSAIO POR COPROCULTURA QUANTITATIVA

Para esta etapa, o *pool* de fezes (Figura 06) foi dividido em 18 alíquotas de 2g para realização da coprocultura quantitativa de acordo com a metodologia de

UENO E GONÇALVES (1998), que constitui em 2g de fezes, 2mL de água destilada e 2g de serragem. Sendo assim, no grupo controle foi adicionada água destilada e *Tween* 80 a 0,01%, junto com as fezes e a serragem e nos grupos tratados adicionou-se as suspensões fúngicas a  $1,0 \times 10^7$  e  $1,0 \times 10^8$  conídios/mL de *B. bassiana*. Após a homogeneização, as amostras foram tampadas com plástico filme contendo pequenos furos e ficaram acondicionadas em estufa climatizada tipo B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*) a 27°C e UR  $\geq$  80% por sete dias.

Após esse período, foi feita a retirada das larvas, adicionando-se água destilada até preencher todo o copo da amostra, o qual foi tampado com uma placa de Petri e invertido, em seguida adicionou-se 10mL de água destilada ao redor do copo e o mesmo ficou em repouso por três horas. Passado esse período, a água destilada foi recolhida, adicionada em tubo tipo *Falcon* e centrifugado por cinco minutos a 1500rpm. Para a quantificação das larvas, foi realizada a leitura de três alíquotas de 10 $\mu$ L cada da amostra retirada do precipitado do tubo após a centrifugação e adicionada uma gota de Lugol, dos valores obtidos foi feita a média aritmética.

**Figura 6** – Pool de fezes caprinas (A); Mistura da matéria maravalha com 2g de fezes (B); Adição da solução fúngicas as alíquotas (C).



Fonte: Arquivo Pessoal.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise descritiva e posteriormente feito a distribuição da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para os dados

paramétricos foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para a comparação entre as médias a 5% de significância. A utilização de símbolos para o sistema de unidade está de acordo com o sistema internacional de unidades (INMETRO, 2003).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para preparar as coproculturas quantitativas realizou-se previamente a análise do número de ovos por grama de fezes dos caprinos, por meio da técnica de Mc Master. Como descrito na metodologia, foi utilizado um *pool* de fezes, cujo valor de OPG foi de 1000 ovos de trichostrongilídeos/g/fezes. Sendo assim, as amostras estavam aptas a serem utilizadas, pois de acordo com Coles et al. (2006) o valor de OPG deve ser  $\geq 300$  para fezes de caprinos.

Na quantificação das larvas pode-se observar que o fungo *B. bassiana* foi capaz de diminuir significativamente o número de helmintos, em ambas as concentrações ( $10^7$  e  $10^8$  conídios/mL), quando comparado ao grupo controle (Tabela 1).

**Tabela 1** – Média  $\pm$  Desvio padrão de larvas (L3) de *Trichostrongilídeos* recuperadas sete dias após os tratamentos.

Tratamentos	Larvas (L3)
Controle	492,3 $\pm$ 73,8 a
<i>B. bassiana</i> $10^7$	113,8 $\pm$ 20,71 b
<i>B. bassiana</i> $10^8$	0,08 $\pm$ 0,08 c

Médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si, pelo teste de *Tukey*, ( $p \leq 0,05$ ).

O motivo da diminuição no número de larvas infectantes nos grupos tratados com o fungo, ainda não está claramente elucidado. Todavia, em estudos prévios utilizando este microrganismo sobre outros parasitos, verificou-se que a força mecânica causada pelo crescimento das hifas e a cutícula fragilizada pela hidrólise enzimática, permitem que o fungo atravesse a cutícula e alcance a hemolinfa do hospedeiro, causando danos mecânicos e morte (BIDOCHKA, St. LEGER; ROBERTS, 1997). Outro fator que infere na patogênese do fungo é que os conídios aderem à cutícula e desenvolvem apressórios infectantes que

produzem e liberam enzimas extracelulares como proteases, lípases e quitinases, em resposta à constituição química da cutícula (ANDERSEN, 2002). Justificando assim a destruição dos helmintos em fase larval como resultados obtidos no presente trabalho.

Apesar de ter poucos relatos na literatura sobre o uso de fungos entomopatogênicos para uso no controle de helmintos, Rodrigues et al. (1996) demonstraram que a espécie *M. anisopliae*, um fungo de ação similar a de *B. bassiana*, foi capaz de diminuir a população de helmintos ciatostomíneos de equinos.

Ao avaliar o efeito da concentração de conídios, verificou-se que foi na suspensão contendo  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana*, que a recuperação de larvas foi menor, diferindo significativamente entre os grupos ( $P < 0,001$ ), confirmando a ação destrutiva do fungo sobre os estágios imaturos de helmintos gastrointestinais de caprinos em concentração maiores. Segundo Gimenes (2014) as larvas de *A. aegypti* foram um dos melhores agentes indutores de proteases. Sabendo das semelhanças das diversas espécies, o presente relato corrobora com os resultados encontrados no presente trabalho, em que a alta quantidade de larva favoreceu a indução do aumento na produção das proteases, beneficiando a ação da *B. bassiana* com entomopatogenicidade do controle biológico do parasita-alvo provocando a destruição do mesmo.

O aumento da patogenicidade do fungo em concentração de  $10^8$  conídios/mL de *B. bassiana* justifica-se devido a biodisponibilidade de matéria orgânica utilizada na coprocultura, a umidade controlada e temperatura favorável para o seu desenvolvimento, colonização e destruição do hospedeiro. Como o nitrogênio é essencial para o crescimento de fungos e não está disponível livremente no solo onde o carbono é abundante, a captura direta de compostos de nitrogênio de outras formas vivas é uma vantagem (ZHANG; HYDE 2014), com isso as larvas em seus diferentes estados são presas fáceis, facilitando a ação bio-nematicida do fungo. Além disso, pode-se inferir também a possível ação interna do fungo no trato digestivo da larva, uma vez que esta se alimenta de microrganismos.

## 6 CONCLUSÃO

Através dos resultados conclui-se que *B. bassiana* é patogênica para estágios imaturos de helmintos gastrointestinais de caprinos, e que a concentração de  $10^8$  conídios/mL é a mais indicada, pois promoveu menor recuperação de larvas. Sendo assim, *B. bassiana* apresenta potencial para ser utilizado em programas de controle biológicos dos helmintos gastrointestinais, visando à diminuição da alopatia de forma indiscriminada, concomitantemente evitando a resistência parasitária nesses animais, melhorando de forma benéfica a produção. Todavia, salienta-se a necessidade de mais estudos para embasar sua aplicabilidade em campo.



## REFERÊNCIAS

- ALVES, S. B. Controle microbiano de insetos. Piracicaba: Fealq, p. 289-381. **Fungos entomopatogênicos**, 1998.
- AMARANTE, A. T. Fatores que afetam a resistência dos ovinos à verminose. In: **Alternativas de controle da verminose em pequenos ruminantes**. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, p. 15-19, 2008.
- ANDERSEN, S. O. Characteristic properties of proteins from pre-ecdysial cuticle of larvae and pupae of the mealworm *Tenebrio molitor*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1077-1087, 2002.
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: UFG, 1998. 490p.
- MURRAY, T. Natural insecticides. 2013. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/309479947\\_Natural\\_Insecticides](https://www.researchgate.net/publication/309479947_Natural_Insecticides). Acesso em: 27 de Nov. 2019.
- BELL, J. V.; HAMELLE, R. J. Three fungi tested for control of the cowpea curculio, *Chalcodermusaeneus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 15, p. 447-50, 1970.
- BIDOCHKA, M.J., KHACHATOURIANS, G.G. N-Acetyl-D-Glucosamine-Mediated Regulation of Extracellular Protease in the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 2699-2704, 1988.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; PERALVA, S.L.F. da S.; VIEGAS, E. de C. Eficácia In vitro dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 86, 1995.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C. L.; LIMA, A. F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista da Universidade Rural**, Série Ciências da Vida, v. 17, p. 83-88, 1995.
- BOWMAN, D.D. **Georgi's Parasitology for veterinarians**. 9.ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, 432p.
- BRITO, D. R. B; SANTOS, A. C. G.; TEIXEIRA, W. C.; GUERRA, R. M. S. N. C.; Parasitos gastrintestinais em caprinos e ovinos da microrregião do Alto Mearim e Grajaú, no estado do Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 3, p. 967-974, 2009.

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

COSTA, C.A.; VIEIRA, L. S. Controle de nematódeos gastrintestinais de caprinos e ovinos do estado de Ceará. Comunicado técnico, 13, **EMBRAPA-CNPC**, 1984, 6p.

DOLINSKI, C.; LACEY, L. Microbial control of arthropod pests of tropical tree fruits. **Neotropical Entomology**. v. 36, p. 161-179, 2007.

FERRAZ, S., FREITAS, L.G., LOPES E. A., DIAS-ARIEIRA, C.R. **Manejo sustentável de fito nematóides**. Viçosa: UFV, 2010, 306 p.

FUXA, J.R. *Spodoptera frugiperda* susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration. **Environmental Entomology**, v. 16, n. 1, p. 218-223, 1987.

GIMENES, D. C.; ALEXANDRINO, T. D.; MACHADO, A. C.; VARÉA, G. S.; induction of proteases from *Beauveria bassiana* by *Aedes aegypti* larvae and cuticle cicadas. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 3, n. 1, p. 41-47, 2014.

GOETTEL, M.S.; INGLIS, G.D.; WRAIGHT, S.P. Fungi. In: **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Amsterdam: Kluwer Academic. cap. 4, p. 255-282, 2000.

GORDON, H. MCL.; WHITLOCK, H. V. A. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**, v. 12, p. 50, 1939.

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

INGLIS, G.D.; GOETTEL, M.S.; BUTT, T.M.; STRASSER, H. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents: Progress, Problems and Potential**. Wallingford: CAB, p. 23-69, 2001.

INMETRO. Portaria Inmetro N° 064, de 11 de abril de 2003. **Disponível em:** <http://www.inmetro.gov.br/legislacao/rtac/pdf/RTAC000826.pdf> . Acesso em: 06 Dez 2019.

KAAYA, G., HASSAN, S. Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. **Experimental & Applied Acarology**, v. 24, n. 12, p. 913-926, 2000.

KAPLAN, R.M.; BURKE, J. M.; MILLER, J. E.; GETZ, W. R.; MOBINI, S.; VALENCIA, E.; WILLIAMS, M. J.; WILLIAMSON, L. H.; LARSEN, M.; VATTA,

A. F.; Validation of the FAMACHA© eye color chart for detecting clinical anaemia in sheep and goats on farms in southern United States. **Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 1, p. 105-120, 2004.

MELO, A. C. F. L.; BEVILAQUA, C. M. L.; SELAIVE, A.V.; GIRÃO, M. D. Resistência a anti-helmínticos em nematoides gastrintestinais de ovinos e caprinos, no município de Pentecoste, estado do Ceará. **Ciência Animal**, v. 8, n. 1, p. 7-11, 1998.

MOLENTO, M. B.; VERÍSSIMO, C. J.; Método Famacha – nova estratégia no controle de endoparasitoses em pequenos ruminantes. **Veterinária in Foco**. p. 17-18. 2003.

MOLENTO, M.B.; TASCA, C.; FERREIRA, M.; BONONI, R.; STECCA E. Método Famacha como parâmetro clínico individual de infecção por *Haemonchus contortus* em pequenos ruminantes. **Ciência Rural**, n. 34, p. 1139-1145, 2004.

MONTEIRO, S. G.; BAHIENSE, T. C.; BITTENCOURT, V. E. R. P. Ação do fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 sobre a fase parasitária do carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) Schulze, 1937 (*Acari: ixodidae*). **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 559-563, 2003.

MORAES, F. R. Uso de marcadores imunológicos na avaliação da resposta imune dos ovinos à infecção natural por nematódeos e na seleção de animais resistentes às parasitoses. Curitiba, 2002. 194f. Universidade Federal do Paraná. **Dissertação (Mestrado)** - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

O'SULLIVAN, B.M.; DONALD, A.D. A field study of nematode parasite populations in the lactating ewe. **Parasitology**, v. 61, p. 3301-315, 1970.

OLIVEIRA, I. C.; Controle biológico de nematóides gastrointestinais de bovinos através da utilização de fungo nematófago *Arthrobotrys cladodes*. **Dissertação**. Universidade Federal de Viçosa, MG, 2017.

OWNLEY, B.H.; GRIFFIN, M.R.; KLINGEMAN, W.E.; GWINN, K.D.; MOULTON, J.K.; PEREIRA, R.M. *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, p. 267-270, 2008.

PADILHA, T.; MARTINEZ, M.L.; GASBARRE, L.; VIEIRA, L.S. Genética: a nova arma no controle de doenças. **Balde Branco**, v. 36, n. 229, p. 58, 2000.

PATHAN, A.A.K.; DEVI, K.U.; VOGEL, H.; REINEKE, A. Analysis of differential gene expression in the generalist entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin grown on different insect cuticular extracts and synthetic medium through cDNA-AFLPs. **Fungal Genetics and Biology**, Germany, n. 44, p. 1231-1241, 2007.

PERINOTTO, W. M. S.; Ação de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* sobre populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes localidades. 61 f. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Seropédica, RJ Fevereiro de 2010.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária: Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 778-791, 2002.

SAMISH, M.; GINDIN, G.; ALEKSEEV, E.; GLZER, I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 6, p.1355-1359, 2001.

SAMISH, M.; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**. v. 129, p. 389-413, 2004.

St. LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Description of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives Biochemistry Biophysites**, v. 253, p. 221-232, 1987.

St. LEGER, R.J.; COOPER, R. M; CHARNLEY, A. K. Distribution of chymoelastase and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives Biochemistry Biophysites**, v. 258, p. 123-131, 1987.

THAMSBORG, S. M.; ROEPSTORFF A.; LARSEN M. Integrated and biological control in organic and conventional production systems. **Vet. Parasitol.**, v. 84, p. 169-186, 1999.

UENO, H.; GONÇALVES, P. C. **Manual para diagnóstico de helmintoses de ruminantes**. 4. ed., Tokyo: JICA, 1998, 143p.

VIEIRA, L. S. Métodos alternativos de controle de nematoides gastrintestinais em caprinos e ovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE OVINOS E CAPRINOS DE CORTE, 3, 2007, **Anais...** III Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, João Pessoa, p. 1-8, 2007.

WALLER, P. J. Global perspectives on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with the special emphasis on biological control. **Animal Health Research Reviews**, v. 4, p. 35-43, 2003.

WALLER, P. J.; THAMSBORG, S. M. Nematode control in 'green' ruminant production systems. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 493-497, 2004.

WANG, C., GANG, H., St. LEGER, R.J. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 704-718, 2005.

YOSHIDA, L. Atividade patogênica dos fungos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces fumosoroseus* para *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae). 102f. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 2007.