



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

JULY LIMA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE ASSOCIAÇÕES DA  
FORMULAÇÃO COMERCIAL DO FUNGO *Duddi gori a  
flagrans* COM COMPOSTOS NATURAIS SOBRE HELMINTOS  
GASTROINTESTINAIS DE BOVINOS**

ILHÉUS - BAHIA  
2024

**JULY LIMA SILVA**

**AVALI AÇÃO DA EFICÁCIA DE ASSOCIAÇÕES DA  
FORMULAÇÃO COMERCIAL DO FUNGO *Dundia gt oria*  
*flagrans* COM COMPOSTOS NATURAIS SOBRE HELMINTOS  
GASTROINTESTINAIS DE BOVINOS**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual  
de Santa Cruz, como parte das exigências para  
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Biodiversidade, Clínica e  
Saúde Animal

Sub-área da Dissertação: Doenças Parasitárias dos  
Animais

Orientador: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza  
Perinotto

**ILHÉUS - BAHIA  
2024**

S586

Silva, Jully Lima.

Avdição da eficácia de associações da formulação comercial do fungo *Dudd gtoria flagrans* com compostos naturais sobre helmintos gastróntestinais de bovinos / Jully Lima Silva – Ilhéus, BA: UESC, 2024.

51 f. : il.

Orientador: Wendell Marcelo de Souza Perinotto  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Referências: f. 47-51.

1. Bovinos – Doenças. 2. Bovinos – Parasitos. 3. Helminto – Controle. Título

CDD 636.20896

## AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer a todos aqueles que fazem o meu propósito ter sentido e ser muito mais belo. Obrigado por todo apoio, incentivo, paciência, vibrações com as conquistas e permanência nos momentos difíceis.

Agradeço e dedico este trabalho à minha família, e em especial a minha avó Marlene Oliveira Lima, a minha mãe Maria Gistina Oliveira Lima, ao meu irmão Jayme Argollo de Albuquerque Lima Neto, a minha sobrinha Lunna Cerqueira Lima, obrigada por sempre me guiarem e apoiarem os meus sonhos.

Agradeço ao meu companheiro e parceiro de vida, Ivan da Silva Silva por todo o companheirismo e compreensão durante todo este ciclo, por todo o apoio, incentivo e motivação para que eu alcance todos os meus objetivos.

Agradeço às minhas amigas Alexandra Bispo da Cruz, Diana Damásio Cabral, Francielly Souza Santos, Laiza Carriço e Rebeca Santos Evangelista que mesmo longe sempre estiveram comigo, meu muito obrigado a todas, pois cada uma ao seu jeito único e particular sempre estiveram presentes, me apoiando e incentivando.

Aos funcionários técnicos e aos terceirizados da Coordenação do Programa de Pós-Graduação da Gênciã Animal e do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz de todos os setores.

À equipe do Laboratório de Parasitologia do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz - Hbspvet UESC e a equipe do Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, obrigado aos professores, técnicos, estagiários e demais discentes por todo auxílio para realização deste trabalho, pelas horas dedicadas à análise e pela colaboração para a execução deste projeto.

À equipe do Projeto do qual esta dissertação é um dos frutos, visto que o apoio, o empenho e a solicitude de cada um dos envolvidos contribuíram significativamente para meu

desenvolvimento pessoal e profissional. Obrigada ao Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto e especialmente à discente Ingrid Moraes, que me auxiliou na execução do experimento *in vitro*, meu muitíssimo obrigada por sua dedicação e apoio, sem sua colaboração bem como da equipe do laboratório o andamento deste projeto não seria o mesmo.

Agradeço ao meu querido mestre, orientador e professor, Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto, pois o amor e respeito que o mesmo transmite pela profissão faz-me referência de profissional e de ser humano. Agradeço por toda sua paciência, por todas as oportunidades de aprendizado, os conhecimentos compartilhados, a confiança depositada em mim e a amizade que foi construída.

Aos funcionários e proprietários da JRM Agropecuária, sempre prestativos e muito acolhedores. Agradeço às estagiárias Maria Celestina, Maria Clara e Karine pelo apoio e companhia durante a execução deste projeto.

Agradeço ainda a empresa Gnergis – Saúde e Nutrição Animal por nos cederem material necessário para a execução deste experimento, bem como também ao professor Dr. Caio Márcio de Oliveira Monteiro, o qual gentilmente nos cedeu e auxiliou na obtenção dos compostos isolados utilizados.

Ao apoio e suporte das instituições fomentadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

# AVALIÇÃO DA EFCÍCIA DE ASSOCIÇÕES DA FORMULAÇÃO COMERCIAL DO FUNGO *Dunndi gt ori a flagrans* COM COMPOSTOS NATURAIS SOBRE HELMINTOS GASTROINTESTINAIS DE BOVINOS

## RESUMO

Os nematoides causam inúmeros prejuízos econômicos e diminuem o bem-estar dos bovinos em virtude de danos diretos e indiretos, como a queda na produção de carne e leite, gastos com medicamentos e manejo. O método mais difundido para controle de endoparasitos é o químico, todavia, pela utilização de maneira indiscriminada, acelerou a seleção de parasitos resistentes. Considerando isto, métodos alternativos para o controle têm sido propostos, como o uso de fungos helmintofagos, bem como utilização de compostos botânicos isolados de óleos essenciais de plantas. Diante disso, este projeto teve como objetivos avaliar a eficácia de compostos naturais (carvacrol, eugenol, nerolidol e timol) nas concentrações de 0,5 e 1% associados ou não à formulação comercial do fungo *Dunndi gt ori a flagrans in vitro*, bem como, avaliar a eficácia da formulação do fungo *D flagrans in vivo* sobre helmintos gastrointestinais de bovinos naturalmente infectados. As análises e ensaios biológicos *in vitro* foram realizados no laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Hospital Universitário de Medicina Veterinária da UFRB, onde foi realizada a técnica de coprocultura quantitativa com fezes dos bovinos da fazenda experimental para obtenção de quantidade de larvas recuperadas, percentual de redução de larvas infectantes e identificação dos gêneros de helmintos, bem como teste de compatibilidade dos compostos botânicos supracitados e *D flagrans*. Para realização do bioensai *in vivo*, uma propriedade (Iguaí – BA) concedeu 24 bovinos que foram divididos em 2 grupos, foi realizado OPG para obtenção dos dados de número de ovos por grama de fezes, bem como pesagem dos animais para estimar a quantidade de formulação fúngica ministrada ao grupo Tratamento, e o ganho de peso dos grupos Tratamento (formulação fúngica) e Controle (tratados com fosfato de levamisol - Rpercol®) quinzenalmente. Nos testes *in vitro* foram obtidos percentuais de redução de larvas significativos e em todos os compostos isolados associados ou não à formulação fúngica, os percentuais variaram entre 93,2 - 100% e 99,5 - 100% respectivamente, enquanto a formulação fúngica obteve um percentual de 84,7%. No teste *in vivo*, ambos os grupos obtiveram valores de OPG de 0 - 300 ovos, e o ganho de peso nos animais dos grupos tratamento e controle chegaram a 30 kg e 50 kg, respectivamente. Assim conclui-se que os biocompostos avaliados no presente estudo apresentaram compatibilidade com o fungo *D flagrans*, e apresentam ação ovicida/larvicida *in vitro*, reduzindo o percentual de larvas infectantes bem como o número de larvas recuperadas, tendo eficácia ao serem utilizadas de forma associada a formulação fúngica, desta forma, essas moléculas podem ter potencial para serem utilizadas na síntese de novos anti-helmínticos. Nos testes *in vivo* a formulação fúngica demonstrou resultados similares ao tratamento de eleição utilizado na propriedade avaliada no presente estudo, o que reitera seu uso no controle parasitário.

**Palavras-chave:** bioensaios; controle biológico; helmintos; inovação.

# EVALUATION OF THE EFFICACY OF ASSOCIATIONS OF THE COMMERCIAL FORMULATION OF THE FUNGUS *Duddingtonia flagrans* WITH NATURAL COMPOUNDS ON GASTROINTESTINAL HELMINTHS IN CATTLE

## ABSTRACT

Nematodes cause countless economic losses and reduce the well-being of cattle due to direct and indirect damage, such as a drop in meat and milk production, medication and management costs. The most widespread method for controlling endoparasites is chemical, but its indiscriminate use has accelerated the selection of resistant parasites. Considering this, alternative methods for control have been proposed, such as the use of helminthophagous fungi, as well as the use of botanical compounds isolated from plant essential oils. With this in mind, this project aimed to evaluate the efficacy of natural compounds (carvacrol, eugenol, nerolidol and thymol) at concentrations of 0.5 and 1% associated or not with the commercial formulation of the fungus *Duddingtonia flagrans in vitro*, as well as to evaluate the efficacy of the formulation of the fungus *D flagrans in vivo* on gastrointestinal helminths of naturally infected cattle. The analyses and *in vitro* biological tests were carried out in the Parasitology and Parasitic Diseases laboratory at the UFRB's Veterinary Medicine University Hospital, where the quantitative coproculture technique was carried out with the feces of cattle from the experimental farm to obtain the amount of larvae recovered, the percentage reduction of infective larvae and the identification of helminth genera, as well as the compatibility test of the aforementioned botanical compounds and *D flagrans*. To carry out the *in vivo* bioassay, a property (Iguaí - BA) granted 24 cattle which were divided into 2 groups, OPG was carried out to obtain data on the number of eggs per gram of feces, as well as weighing the animals to estimate the amount of fungal formulation given to the Treatment group, and the weight gain of the Treatment (fungal formulation) and Control groups (treated with levamisole phosphate - Ripercol®) every two weeks. In the *in vitro* tests, significant percentages of larvae reduction were obtained for all the isolated compounds associated or not with the fungal formulation, the percentages varying between 93.2-100% and 99.5-100% respectively, while the fungal formulation obtained a percentage of 84.7%. In the *in vivo* test, both groups obtained OPG values of 0 - 300 eggs, and the weight gain of the animals in the treatment and control groups reached 30 kg and 50 kg, respectively. Thus, it can be concluded that the biocompounds evaluated in this study were compatible with the *D flagrans* fungus and had an ovicidal/larvicidal action *in vitro*, reducing the percentage of infective larvae as well as the number of larvae recovered, and were effective when used in association with the fungal formulation, so these molecules may have the potential to be used in the synthesis of new anthelmintics. In the *in vivo* tests, the fungal formulation showed similar results to the treatment of choice used on the property evaluated in this study, which reiterates its use in parasite control.

**Key words:** biosupplements; biological control; helminths; innovation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação geral do ciclo biológico monoxeno dos indivíduos pertencentes ao filo Nematoda, ilustrando as fases de vida livre e parasitária ..... 18
- Figura 2** – Visualização dos resultados obtidos no teste de compatibilidade dos compostos botânicos e *D. flagrans*. Onde verifica-se que, carvacrol 0,5% (A) e 1% (B), eugenol 0,5% (C) e 1% (D), nerolidol 0,5% (E) e 1% (F), e timol 0,5% (G) e 1% (H) não inibiram o desenvolvimento de *D. flagrans*. ..... 35
- Figura 3** – Percentual de redução de larvas de terceiro estágio (L3) de strongilídeos recuperadas, após a exposição aos diferentes tratamentos com os compostos botânicos Carvacrol, Eugenol, Nerolidol e Timol a 0,5 e 1,0% associados ou não à formulação comercial de *Duddingtonia flagrans* ..... 37



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Média  $\pm$  desvio padrão e Percentual de Redução de larvas de terceiro estágio de estrogilídeos recuperadas, após a exposição aos diferentes tratamentos com os compostos botânicos Carvacrol, Eugenol, Nerolidol e Timol a 0,5 e 1,0% associados ou não à formulação comercial de *Duddingtonia affragrans* (\*). ..... 36

**Tabela 2** – Demonstração dos grupos tratamento e controle e seus resultados de ovos por grama de fezes (OPG) nas coletas realizadas de 11 de outubro a 28 de novembro. .... 38

**Tabela 3** – Demonstração dos grupos tratamento e controle e sua progressão de peso no período de 11 de outubro a 28 de novembro. .... 39

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

-	Subtração
%	Porcentagem
*	Asterisco
+	Adição
±	Mais ou menos
®	Registered trade mark (Marca Registrada)
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
10 <sup>5</sup>	Cem mil
ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	Análise de Variância
BA	Bahia
BDA	Batata, dextrose e ágar
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (Demanda Bioquímica de Oxigênio)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramas
H <sub>2</sub> O	Água
HD	Hospedeiro Definitivo
HI	Hospedeiro Intermediário
Hospvet UESC	Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L1	Larva de primeiro estágio
L2	Larva de segundo estágio
L3	Larva de terceiro estágio
L4	Larva de quarto estágio
L5	Larva de quinto estágio
LPDP – HUMV	Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Hospital Universitário de Medicina Veterinária
m	Metro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Milograma
mL	Microlitro
mℓ	Microlitro
mm	Milímetro
MO	Missouri
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NaCl	Cloreto de Sódio

NGIs	Ne mat oides Gastrintestinais
nº	Número
Q E	Óleo Essencial
OoPG	Oocistos por Grama
OPG	Ovos por Grama
pH	Potencial hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
PVC	Polidretol de Vnila
R\$	Reais Brasil
rpm	Rotações por minuto
SP	São Paulo
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
WAAVP	<i>World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology</i> (Associação Global para Avanço da Parasitologia Veterinária)
x	Multiplificação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>4 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
4.1 Nematóides gastrointestinais (NGIs) .....	17
4.1.1 Características morfológicas .....	17
4.1.2 Ciclo biológico .....	18
4.1.3 Nematóides gastrointestinais de importância na criação de bovinos.....	19
4.1.4 Controle .....	22
4.1.5 Resistência aos anti-helmínticos .....	24
4.2 Controle biológico .....	25
4.2.1 Fungos helmintofagos .....	25
4.2.2 <i>Duddi goni flagrans</i> .....	26
4.3 Uso de compostos botânicos .....	27
4.3.1 Carvacrol .....	28
4.3.2 Eugenol .....	28
4.3.3 Nerolidol .....	29
4.3.4 Timol .....	29
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
5.1 Considerações éticas .....	30
5.2 Local do estudo e animais utilizados nos experimentos .....	30
5.3 Formulação de <i>D flagrans</i> .....	30
5.4 Compostos botânicos .....	30
5.5 Delimitação experimental .....	31
5.6 Ensaio experimental in vivo .....	33
5.6.1 Coleta e processamento do material fecal .....	33
5.6.2 Pesagem dos animais .....	34
5.7 Análises estatísticas .....	34
<b>6 RESULTADOS</b> .....	35
<b>7 DISCUSSÃO</b> .....	40

<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	47
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as atividades pecuárias de grande importância econômica no Brasil destacam-se a bovinocultura de leite e a de corte. De acordo a Pesquisa da Pecuária Municipal divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2022 o rebanho bovino nacional alcançou o marco de 234,4 milhões de cabeças, sendo que dentre todas as grandes regiões houve aumento absoluto no efetivo, sendo Norte, Nordeste (é o quarto maior rebanho do território nacional, neste ano os estados do Maranhão e Bahia foram responsáveis pela maior parte deste aumento) e Centro Oeste. A produção de leite foi estimada em 34,6 bilhões de litros, o Nordeste foi a única grande região a registrar 16,5% de aumento de produção do total, sendo a terceira região em produção de leite. Os negócios e movimentações relacionados à cadeia produtiva da bovinocultura de corte em 2022 foram responsáveis por R\$ 1.023,04 bilhões, incluindo nesta estimativa desde os valores dos insumos utilizados na pecuária até os investimentos em genética, nutrição (R\$ 23.887,5 milhões), sanidade animal (R\$ 4.492,2 milhões), exportações e vendas no mercado interno (ABI EC, 2023).

Sob essa perspectiva, assegurar a saúde dos rebanhos bovinos é essencial e dentre os principais fatores que afetam a produção de ruminantes no Brasil pode-se elencar as endoparasitoses, as quais são recorrentes nos atendimentos de rotina em clínicas e hospitais veterinários. Costumam ser de aparecimento subclínico ou assintomático, usualmente ocorre infecção concomitante com mais de um gênero de parasito e ocasionam diminuição de peso, um menor desempenho reprodutivo, redução na produção de leite e pode-se observar que os animais jovens são altamente susceptíveis às infecções helmínticas, as quais ocasionam atraso no desenvolvimento dos animais, bem como apresentam diarreias, quadros de anemia, uma menor resposta à vacinas, entre outras manifestações, podendo levar ao óbito (CARMO *et al.*, 2022; RAJ; KOHLI, 2022; ŠTRBAC *et al.*, 2022a). Dentre os principais helmintos gastrointestinais dos bovinos destacam-se *Hemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp. e *Strongyloides* spp. (NEVES, 2014; MAIA; MATTOS, 2020).

Os métodos de controle e profilaxia existentes podem ser classificados como de manejo, químicos, imunológicos e biológicos, sendo que dentre estes o método mais difundido para controle de endoparasitos é o químico, entretanto, a maioria dos compostos utilizados para este controle elimina apenas a fase adulta dos parasitas que estão presentes nos órgãos internos dos hospedeiros, desta forma os estágios de vida livre dos parasitos presentes em hospedeiros intermediários ou mesmo nos bolos fecais permanecem viáveis no ambiente por semanas, podendo viabilizar desta forma a continuidade ao ciclo de vida dos parasitos quando as larvas

infectantes são ingeridas por seus hospedeiros intermédios / definitivos (VICI NOT *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2022).

Dentre as opções de anti-helmínticos comercialmente disponíveis os mais utilizados são os pertencentes às classes das lactonas macrocíclicas, benzimidazóis, imidazotiazóis e salicilanilidas (SILVA *et al.*, 2017; BERGAMO; HOLSBACH; WERLE, 2020). Contudo, como resultado do uso frequente e de forma indiscriminada ao longo dos anos, houve a potencialização do surgimento de parasitos resistentes a diversas classes farmacológicas. Na região semiárida da Paraíba Melo *et al.* (2021) relataram elevada resistência a anti-helmínticos nas 20 propriedades avaliadas no estudo, sendo eles: ivermectina e albandazole (95%), closantel (75%), levamisole (20%).

Estando ciente de que o uso de tratamentos supressivos e métodos de controle embasados prioritariamente em formulações químicas gradualmente tem se mostrado ineficazes como solução ao desafio imposto para o controle dos endoparasitos nas fases de vida livre e na fase parasitária, bem como almejando a redução da pressão de seleção de helmintos aos anti-helmínticos alternativas aos métodos tradicionais de controle têm sido propostos (SILVA *et al.*, 2023), podendo-se citar estudos com óleos essenciais e compostos botânicos como potenciais agentes nematocidas (PANDA *et al.*, 2022), bem como o uso de fungos helmintófitos, que tem ação ambiental favorecendo redução de contaminação da pastagem e diminuição da reinfecção dos animais (LI *et al.*, 2022). Dentre as espécies fúngicas com atividade helmintófila comprovada, merecem destaque os gêneros *Mnacrosporium*, *Dunndiagonia* e *Artrobotrys* da família Orbiliaceae, bem como o gênero *Pochonia* da família Clavicipitaceae (SZEWC; WAAL; ZINTL, 2021; LI *et al.*, 2022).

Pesquisas com óleos essenciais e seus compostos botânicos vêm sendo realizadas, demonstrando que estes possuem grande potencial para compor futuras formulações comerciais devido as suas atividades e propriedades biológicas, bem como por sua ampla biodisponibilidade, por ocasionarem menos resíduos no solo devido sua alta biodegradabilidade e menos resíduos em produtos de origem animal, devido a toxicidade inferior quando comparados com produtos químicos (PANDA *et al.*, 2022; ŠTRBAC *et al.*, 2022b). Em estudos realizados, podemos destacar que carvacrol, eugenol, nerolidol (ŠTRBAC *et al.*, 2022b) e Timol (PANDA *et al.*, 2022) demonstraram ação anti-helmíntica ou larvicida tanto em estudos com óleos essenciais tendo como componentes majoritários os dados compostos ou estudos com os compostos botânicos isolados em diferentes concentrações.

O fungo *D. flagrans* pode ser isolado do solo e de tapetes fecais e o mesmo pode ser classificado como um fungo predador, o qual prioritariamente preda as larvas de nematóides (LI *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2022). Sua ação dá-se tendo em vista a capacidade do mesmo em formar dispositivos de armadilha geométricas e mecânicas os quais aprisionam os helmintos às redes tridimensionais. Posteriormente segue-se a penetração das hifas na cutícula do nematóide, onde ocorre o crescimento destas hifas e a digestão dos conteúdos internos, desta maneira mata as formas de vida livre –larvas –recentemente nascidas de ovos e as utiliza como alimento (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

No que se refere a resultados obtidos com fungos helmintofagos, Oliveira *et al.* (2021) ao administrar diariamente *pellets* com a adição de esporos fúngicos de *D. flagrans* para bovinos jovens obtiveram ao 90º dia uma redução significativa de 87,5% nos ovos por grama de fezes quando comparado ao grupo controle. Similarmente, Rodrigues *et al.* (2021) obtiveram resultados satisfatórios no controle de nematódeos gastrintestinais, onde *D. flagrans* apresentou elevada capacidade predatória após a passagem pelo trato gastrintestinal de bovinos. Este fungo é utilizado ainda para o controle de *Ostertagia* sp, *Cooperia* sp, *Dictyocaulus* sp e *H. contortus* (ZARRIN RAHDAR; GHOLAM AN, 2015).

A partir do que foi exposto sentiu-se crescente demanda referente ao controle de helmintos gastrintestinais com métodos sustentáveis e inovadores, de custo reduzido e baixo impacto ambiental.



## 2 OBJETIVOS

Avaliar a eficácia dos compostos naturais carvacrol, eugenol, nerolidol e timol, associados ou não à formulação comercial do fungo *Duddi gtoni aflagrans in vitro*, bem como, avaliar a eficácia da formulação do fungo *D flagrans in vivo* sobre helmintos gastrointestinais de bovinos naturalmente infectados.

## 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a eficácia *in vitro* e *in vivo* da formulação de *D flagrans* sobre os estágios de vida livre de nematoides gastrointestinais de bovinos.

Analisar a compatibilidade *in vitro* dos compostos carvacrol, eugenol, nerolidol e timol com o fungo *D flagrans*.

Avaliar a eficácia *in vitro* dos compostos naturais isolados carvacrol, eugenol, nerolidol e timol sobre helmintos gastrointestinais de bovinos naturalmente infectados.

Avaliar a eficácia *in vitro* dos compostos naturais carvacrol, eugenol, nerolidol e timol e de suas associações com a formulação comercial do fungo *D flagrans* sobre helmintos gastrointestinais de bovinos naturalmente infectados.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Nematóides gastrointestinais (NGIs)

Os nematóides distribuem-se mundialmente e estão entre os animais mais abundantes do planeta. Podem ocasionar as helmintoses em diferentes espécies animais, sendo que alguns apresentam caráter zoonótico (MARTINS, 2019). Os endoparasitos são considerados uns dos maiores responsáveis por gastos com medicações e prevenção nas cadeias de produção, ocasionando danos diretos e indiretos, prejudicando os interesses dos produtores. Estes seres são responsáveis por afetar a saúde dos animais (maior incidência de pneumonia, eosinofilia, anemia e desnutrição podem ser associadas a exposição a helmintos), e pode-se elencar como algumas consequências das helmintoses a redução considerável da produção de leite e carne, retardo no crescimento, atrasos reprodutivos (RAJ; KOHLI, 2022) e para produtores de bovinos de corte podem ocasionar prejuízo estimado em até 20% de redução no ganho de peso (CANÇADO *et al.*, 2019).

#### 4.1.1 Características morfológicas

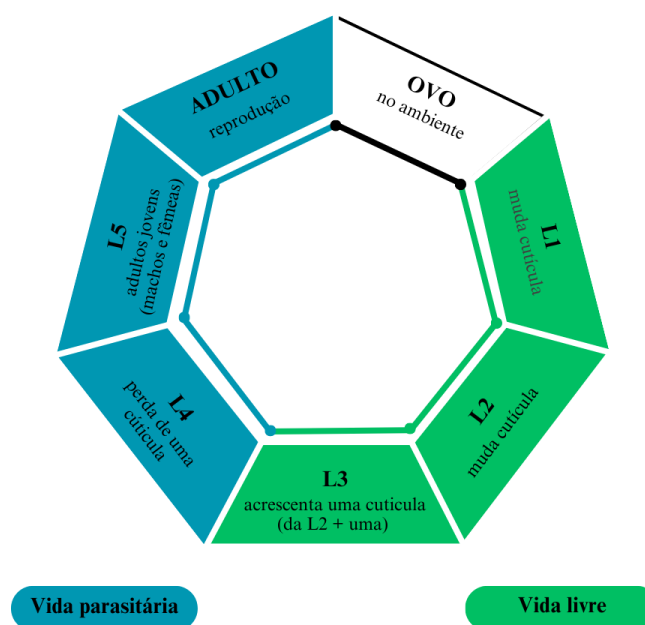
A maioria das espécies pertencentes aos gêneros de helmintos apresenta dimorfismo sexual (embora existam fêmeas partenogênicas), são ovíparas e seu meio de infecção é geralmente pela ingestão de larvas de terceiro estágio (L3). As espécies que parasitam animais geralmente são filariformes e variam em tamanho (espécies apresentando desde 1 mm à outras de até 8 m de comprimento). Os helmintos são seres cilíndricos, com pseudoceloma (cavidade corporal), seus corpos são revestidos por uma cutícula de cor clara e com grande resistência e apresentam simetria bilateral. A cutícula pode apresentar asas (que podem ser cefálicas, cervicais ou caudais), espinhos ou cristas, e abaixo desta cutícula localiza-se a hipoderme, a qual é composta por lipídios, glicogênio e mitocôndrias. Mais internamente localiza-se a camada de fibras musculares, constituída pelos músculos lisos e segmentados. Estes seres possuem um sistema digestivo completo (composto por boca/ vestíbulo oral/ lábios, esôfago, faringe, intestino e ânus ou abertura anal). O tamanho e formato da boca pode sofrer variação de acordo ao gênero do parasito, por isso algumas espécies podem possuir: boca simples (sem cavidade bucal); coroa franjada na parte anterior; cavidade bucal (arredondada, triangular ou hexagonal); lamelas ou dentes no interior da cavidade bucal; boca com dois a seis lábios ou com interlábios. O esôfago pode variar dependendo do grupo taxonômico ao qual o parasita pertence, podendo-se citar por exemplo, que este pode ser simples ou filariforme (típico de strongilídeos) ou possuir expansões anterior e posterior (típico de *Strongylidae*). No que diz

respeito ao sistema genital dos nematódeos a maioria apresenta sexos separados, e os órgãos sexuais ficam livres na cavidade corporal (MONTEIRO 2017; MARTINS, 2019).

#### 4.1.2 Ciclo Biológico

Os indivíduos do filo Nematoda podem apresentar ciclo de vida monoxeno ou heteroxeno. No ciclo monoxeno, há a fase de vida livre (ovos, L1, L2 e L3), na qual os indivíduos costumam desenvolver-se dentro do bolo fecal, utilizando detritos orgânicos e microrganismos como nutrientes e a fase parasitária (L4, L5, adultos), fase na qual os parasitos nutrem-se e realizam mudas de estágios e apenas um hospedeiro. Sendo assim parasitos que apresentam ciclo de vida monoxênico infectam diretamente seu hospedeiro definitivo (HD), sem necessitar de um hospedeiro intermediário (HI), conforme ilustrado na Figura 1. No ciclo de vida heteroxeno pode haver a presença de um ou mais hospedeiros intermediários e a infecção dos HD pode ocorrer através da picada de insetos ou ingestão de HI, por exemplo.

#### CICLO BIOLÓGICO MONOXENO NEMATODA



**Figura 1** – Representação geral do ciclo biológico monóxico dos indivíduos pertencentes ao filo Nematoda, ilustrando as fases de vida livre e parasitária.

De maneira geral, as espécies de NGs de interesse veterinário abordadas no presente trabalho apresentam ciclo de vida monoxeno, neste há a fase de vida livre composta pelos ovos e larvas em diferentes estágios que sofrem muda de cutículas ao decorrer do tempo (a L1

desenvolve-se e mat é 24h, muda cutícula para se tornar L2 a qual permanece com a sua cutícula e ganha mais uma, para assim tornar-se L3. Para transformar-se em L2 e L3 leva em torno de 7 dias após postura) até alcançar sua forma infectante (L3). A L3 possui resistência significativa para superar os desafios impostos pelas condições de vida livre e conseguir dar continuidade ao ciclo, pode sobreviver por meses no ambiente e costuma ser mais ativas e em períodos em que o clima esteja ameno, fresco. Desde que as condições climáticas estejam favoráveis (temperatura, umidade (presença de gotículas de água para que possa subir)), elas por possuírem geotropismo negativo, através de movimentos de serpente, chegam ao ápice da planta. Posteriormente, após a infecção, que em grande parte ocorre pela ingestão de ovos ou larvas L3 (estas podem estar dentro dos ovos ou no ambiente), podendo ocorrer também através de penetração cutânea das larvas na pele, a depender da espécie, inicia-se a fase parasitária, na qual há o desenvolvimento do parasito dentro do HD. A L3 infectante ao chegar no rúmen do animal perderá a sua bainha e fará migração para seu local de ação (abomaso ou intestino delgado) e a L3 se tornará L4, posteriormente L5 (adultos jovens diferenciando-se em machos e fêmeas), e então após o desenvolvimento os adultos fixam-se no local e há a reprodução, gerando ovos que após período de incubação/ maturação se tornam infectantes e aptos para iniciar um novo ciclo parasitário, sendo o período pré-patente estimado em 3 semanas (MONTEIRO, 2017; MARTINS, 2019; FONSECA *et al.*, 2023).

#### 4.1.3 Nematóides gastrointestinais de importância na criação de bovinos

##### 4.1.3.1 *Haemonchus* spp.

O gênero *Haemonchus* pertence à superfamília Trichostrongyloidea, família Trichostrongylidae, subfamília Haemonchiinae, comum em bovinos no Brasil. A extremidade anterior é afilada, possui uma cápsula bucal pequena com uma lanceta minúscula e em seu interior a alimentação destes indivíduos se dá através da espoliação sanguínea, sendo que cada fêmea adulta pode ingerir até 250 mL de sangue/dia. Os parasitos adultos são facilmente localizados na porção glandular do abomaso dos hospedeiros e as fêmeas chegam a medir de 2 a 3 cm chegando a ovipor em média 15 mil ovos/dia (FONSECA *et al.*, 2023). Possui ciclo biológico direto com período pré-patente oscilando de 2 a 3 semanas em ovinos e até 4 semanas em bovinos. Devido ao seu hábito hematofago, ocasiona anemia, principalmente em animais jovens, podendo promover edema submandibular ocasionado pela hipobunemia, e em casos mais severos pode levar os animais a óbito em função da grande perda sanguínea. Normalmente as infecções são concomitantes com outros nematóides, o que agrava o quadro geral do animal,

podendo levar a síndrome da gastroenterite parasitária dos ruminantes (MONTEIRO 2017; MARTINS, 2019; MENDES *et al.*, 2020).

#### 4.1.3.2 *Trichostrongylus* spp.

O gênero *Trichostrongylus* pertencente a superfamília Trichostrongyloidea, família Trichostrongylidae, subfamília Trichostrongylinae é composto por parasitos pequenos, os quais apresentam poro excretor (localizado comumente em uma fenda visível na extremidade anterior). Estes têm como hospedeiros equinos, bovinos, ovinos, suínos, caprinos e localizam-se no estômago de equinos, abomaso de ruminantes e intestino delgado de caprinos e ovinos. Seu ciclo de vida é direto, e possui período pré-patente de 4 semanas nos equinos e 3 semanas nos ruminantes. Pode ocasionar gastrite nos equinos, geralmente associada a pontos de necrose que cursam com uma inflamação crônica. Na ocorrência de uma grande infecção por *Trichostrongylus*, o pH do abomaso ou intestino pode sofrer alterações, o que irá ocasionar crescimento bacteriano acentuado, levando a diarreia (sendo negra e fétida em casos mais severos), podendo cursar ainda com desidratação, e em situações mais graves ocasionar óbito. As infecções graves irão promover rápido e acentuado emagrecimento bem como diarreia em todos os hospedeiros (MONTEIRO 2017; MARTINS, 2019; ALMEIDA *et al.*, 2020).

#### 4.1.3.3 *Cooperia* spp.

O gênero *Cooperia* pertencente a superfamília Trichostrongyloidea, família Trichostrongylidae, subfamília Cooperiinae, e sua maioria são parasitos pequenos (com até 1 cm) com aspecto de “vírgula” e as fêmeas podem ovipor 3 mil ovos/dia. Estes parasitos possuem dilatações cuticulares cefálicas e não há gubernáculo. Entre seus hospedeiros estão bovinos, caprinos e ovinos e localizam-se no intestino delgado destes animais. Possui ciclo biológico direto, e após a ingestão da L3 ocorre migração para as criptas intestinais, onde realiza duas mudas. Os adultos irão desenvolver-se na mucosa e na superfície epitelial do intestino delgado, e este ciclo apresenta período pré-patente de aproximadamente 3 semanas (MONTEIRO 2017; MARTINS, 2019). Em bezerros pode ocasionar inapetência e emagrecimento, mas não representa alta patogenicidade; as infecções moderadas a graves podem ocasionar enterite catarral e edema da mucosa intestinal (AMARAL NETO *et al.*, 2021).

#### 4.1.3.4 *Strongylides* spp.

O gênero *Strongylides* pertence a ordem Rhabditiida, superfamília Rhabditoidea, família Strongylidae, possui forma redonda e são muito pequenos (tendo de 2 a 3 mm de

comprimento). Dependendo da espécie, seus hospedeiros podem ser equinos, cães, gatos, ruminantes (bovinos, caprinos e ovinos), humanos e ratos, por exemplo. Pode apresentar gerações de vida parasitária e de vida livre, as fêmeas que se apresentam na fase de vida parasitária possuem esôfago filariforme e boca trilabiada, são partenogênicas e vivem embebidas na mucosa do intestino delgado, não há parasitos machos no hospedeiro, enquanto que na fase de vida livre existem machos e fêmeas (chegam a medir 1 mm de comprimento), e estes, assim como as larvas (L1, L2 e L3), apresentam esôfago rhabditiforme. As larvas infectantes L3 deste gênero não possuem dupla cutícula, o que lhes confere maior fragilidade as condições ambientais. Seu ciclo de vida pode ser homogônico (fase parasitária) ou heterogônico (fase de vida livre), possuindo um período pré-patente de 7 a 15 dias.

No ciclo homogônico, as fêmeas fazem a postura dos ovos e estes têm contato com o meio ambiente quando saem junto com as fezes e nas condições ambientais há o desenvolvimento deste ovo, tornando-se larvas (L1, L2 e posteriormente L3 infectante). O hospedeiro irá se contaminar por meio da penetração das larvas infectantes na pele (as quais migram através das arteríolas para coração e pulmão, nos bronquíolos L3 torna-se L4 e cursam para os brônquios, traqueia e laringe e posteriormente são deglutidas (ciclo pulmonar). No tubo digestivo estas tornam-se adultas e fixam-se intestino), pela ingestão de alimentos contaminados (L3 chega ao tubo digestivo, ao chegar no tubo digestivo a mesma passa para a circulação e faz o ciclo pulmonar), ou ainda, por meio de transmissão vertical, quando o HD for uma fêmea que está amamentando seus filhotes e seu leite está contaminado. Já no ciclo heterogônico, em condições ambientais ideais, indivíduos de vida livre irão se originar a partir de ovos colocados pela fêmea partenogenética e estes ovos eclodem para larvas L1, as quais, desenvolvem-se até adultos. Os machos e fêmeas após copularem podem originar L3 infectantes ou as larvas de vida livre. De maneira geral, podem ocasionar processos inflamatórios como pneumonia e bronquite devido ao ciclo pulmonar das larvas e as formas adultas que se encontram no intestino podem levar a enterite catarral; pode haver ainda aumento do peristaltismo intestinal o que leva a diarreia, má absorção intestinal e desidratação dos animais, e em casos mais graves pode levar os animais à óbito (MONTEIRO 2017; MARTINS, 2019).

#### 4.1.3.5 *Oesophagostomum* spp.

O gênero *Oesophagostomum* pertence a ordem Strongylida, superfamília Strongyloidea, família Chabertiidae, subfamília Oesophagostominae, estes apresentam cápsula bucal retangular e pequena, dilatações cuticulares, vesícula cefálica, as fêmeas possuem corpos que terminam

afiladamente e estas podem colocar até 10 mil ovos/dia. Sua alimentação é baseada na ingestão de tampões de mucosa e localizam-se no intestino grosso dos hospedeiros, sendo que *O radiatum* tem como hospedeiros bovinos e bubalinos enquanto que *O columbianum* parasita ovinos e caprinos. O ciclo de vida destes é direto e divide-se em fase de vida livre e fase parasitária tendo um período pré-patente de 45 dias. Na fase de vida livre o ovo morulado que está no solo, em condições ambientais ideais de temperatura e umidade relativa, origina a L1 que se desenvolve até L3 num período que varia de 7 a 8 dias. O HD infecta-se por meio da ingestão, presente na pastagem ou em água contaminada, a larva entra na mucosa do intestino delgado ou grosso, onde forma nódulos (na necropsia estes são visíveis) e faz a muda para L4, posteriormente esta irá para a superfície da mucosa, migra para a luz intestinal e desenvolve-se até a forma adulta. De maneira geral, a sintomatologia clínica ocorre quando bezerros possuem até 200 vermes adultos e em bovinos adultos quando esta infecção ultrapassa a quantidade de 1000 vermes adultos, o efeito patogênico é atribuído principalmente a presença dos nódulos que se formam na parede do intestino (delgado ou grosso), e ovinos, por exemplo, a presença destes nódulos inviabiliza o uso comercial desses intestinos para confecção de embutidos, fio de sutura, entre outros produtos. Ao haver o despreendimento desses nódulos há uma grande perda de proteínas levando à hipalbuminemia, podendo haver ainda sinais como aneemia, edema e diarreia verde escura, e magrecimento e edema submandibular, ocasionando queda na produção e prejuízos econômicos (MONTEIRO 2017; MARTINS, 2019; AMARAL NETO *et al.*, 2021).

#### 4.1.4 Controle

O controle dos endoparasitos é um desafio considerável para pecuaristas, pesquisadores e demais interessados, desta forma, compreender as particularidades do ciclo de vida de cada espécie contribui para elaboração de métodos e estratégias de controle mais eficazes para cada caso (particularidades da região, tipo de sistema de produção e empregado, condições financeiras do proprietário, são alguns dos critérios a se observar e m cada situação) (CARMO *et al.*, 2022).

As ferramentas para o controle dos nematoides podem englobar as técnicas de manejo (como o manejo de pastagens, descontaminação prévia das pastagens e pastejo com alternância de categorias e/ou espécies de hospedeiros) (MEDEIROS; FREITAS; PAIVA 2018), uso de tratamentos em períodos específicos (controle estratégico), o uso de formulações sintéticas (controle químico) como lactonas macrocíclicas, dentre outras que são o método de controle mais difundido atualmente, bem como podem-se citar como possibilidades ao método convencionalmente utilizado estratégias novas e inovadoras que vêm sendo estudadas, como,

por exemplo, a estimulação imunológica do hospedeiro (através de estratégias como a manipulação nutricional, seleção genética de indivíduos), controle biológico (uso de fungos nematófagos, besouros, entre outros por exemplo), desenvolvimento de vacinas, bem como também o uso de produtos à base de plantas ou seus componentes vegetais (óleos essenciais, hidrodiluições, bem como uso de compostos bioativos) (STRBAC *et al.*, 2022a).

A estimulação imunológica pode ocorrer através de técnicas como a manipulação nutricional, onde faz-se uso de determinados componentes da nutrição animal visando estimular o sistema imune do hospedeiro, tendo como exemplo, a suplementação proteica. O aporte nutricional promovido pela proteína pode ser capaz de promover uma diminuição na carga parasitária animal bem como uma melhor resposta imunológica frente a novas infecções (MEDEIROS; FREITAS; PAIVA, 2018). Em um rebanho, independente da raça dos animais, há cerca de 10 a 20% de indivíduos que são considerados naturalmente resistentes às infecções parasitárias (CARMO *et al.*, 2022), tendo isto em vista, a seleção genética dos indivíduos, que consiste na seleção de animais resistentes e pela diversidade genômica do hospedeiro, surge como uma alternativa. Todavia, estes métodos carecem de estudos mais aprofundados, tanto para estabelecer a associação na relação parasito/proteína, bem como de estudos genéticos para validar estas estratégias alternativas (MEDEIROS; FREITAS; PAIVA, 2018).

Dentre os métodos de controle biológico podem-se citar alguns organismos que são antagonistas naturais dos helmintos gastrointestinais, estando presentes no ambiente e possuem capacidade de ocasionar patogenicidade sobre os parasitos, dentre estes, podemos citar o uso de besouros de esterco, minhocas, ácaros nematófagos, nemátodes predadores (SZEWC; WAAL; ZINTL, 2021) bem como o uso de fungos entomopatogênicos (MOURA *et al.*, 2023) e fungos helmintóforos (destacando-se o uso dos gêneros *Mnacrosporium*, *Dunddigtonia* e *Arthrobotrys Pochonia*), que possuem potencial aplicação sobre os parasitos gastrointestinais (LI *et al.*, 2022).

Referente ao uso das vacinas, há atualmente três comercialmente disponíveis (contra *Echinococcus granulosus* (Providen® Hdatil EG95, Tecnovax), *Dictyocaulus viviparus* (Bovilis® Huskvac, MSD Animal Health) e *H. contortus* (Barbervax®, Wrevax®)) (CLAEREBOUT; GELDHOF, 2020). Em estudos conduzidos por Bassetto *et al.* (2014), que realizaram a vacinação com glicoproteínas da membrana intestinal de *H. contortus*, sugeriu-se que houve redução substancial da transmissão de *H. placei* e de *H. similis*, desta forma, foi conferida proteção contra estes parasitos em bezerros a pasto, tendo em vista que, ao reduzir o número de ovos viáveis que são excretados no ambiente, os quais determinam o número de larvas infectantes no pasto, mais tarde os animais e pastoreio se infectaram menos ou não se



infetar a população e estar menos controlado, todavia, esta vacina não foi registrada para uso em gado. Diversos grupos de pesquisa têm identificado potenciais candidatos a antígenos vacinais, com isso, espera-se que em breve outras vacinas contra diversos endoparasitos estejam disponíveis comercialmente (CLAEREBOUT; GELDHOF, 2020).

A utilização de plantas e seus componentes bioativos como estratégia anti-helmíntica data de muito antes da existência dos compostos orgânicos sintéticos (controle químico). Os metabólitos de plantas podem ser utilizados em diversas apresentações (estando presentes no óleo essencial, hidrolato, extratos hidroetanólicos, como compostos isolados, ultrafiltrações com princípios homeopáticos, por exemplo), e resultados promissores foram alcançados em estudos que buscam elucidar seus potenciais usos no controle dos helmintos que impactam a produção animal e/ou a saúde pública. Compostos como carvacrol, eugenol e timol demonstraram eficácia contra *H. contortus* (PANDA *et al.*, 2022), entretanto, mais estudos são necessários para obter-se validação científica de demais compostos e seus efeitos, bem como verificar se há viabilidade em utilizar estes compostos bioativos como componentes de formulações comerciais associadas ou não aos compostos orgânicos sintéticos.

#### 4.1.5 Resistência aos anti-helmínticos

O controle químico é amplamente utilizado, sendo a principal forma de controle de infecções parasitárias no mundo, ainda que haja ressalvas no que se diz respeito à preocupação pública e mtormos de resíduos na carne e no leite, a poluição ambiental bem como da crescente resistência anti-helmíntica (SILVA *et al.*, 2023). Como resultado do uso frequente e de forma indiscriminada ao longo dos anos, houve a potencialização do surgimento de parasitos resistentes aos compostos químicos, tendo em vista o número restrito de moléculas para elaborar formulações que atualmente consigam superar o desafio imposto para o controle de helmintos (MEDEIROS; FREITAS; PAIVA, 2018).

A resistência anti-helmíntica aos compostos sintéticos pode ser compreendida como a capacidade do parasito em sobreviver por meio de mecanismos metabólicos de perda de sensibilidade a estes compostos, o que favorece assim sua adaptabilidade pois supera os efeitos críticos e letais ocasionados por estas moléculas (CARMO *et al.*, 2022). Entre os mecanismos de resistência expressos pelos parasitos podemos ter a regulação positiva do efluxo celular, a rápida metabolização dos compostos, ou ainda, os parasitos podem modificar os receptores onde as moléculas interagem com o mesmo (seja por diminuir sua expressão e/ou modificar a estrutura do receptor, por exemplo) (HSSHA; KINDE, 2021), bem como

considerando a pressão de seleção motivada pela exposição de uma grande parte dos indivíduos às doses terapêuticas ou subdoses de agentes antiparasitários pode ocorrer a transmissão dos alelos de resistência às gerações subsequentes, selecionando no ambiente indivíduos com maior adaptabilidade, perpetuando assim espécies resistentes a uma ou mais classes farmacológicas (CARMO *et al.*, 2022; STRBAC *et al.*, 2022b). Fissaha e Kinde (2021), em revisão de literatura, descreveram que foi observada resistência de cepas de *H. contortus* e *Trichostrongylus*, por exemplo, a diversas bases farmacológicas rotineiramente utilizadas (benzimidazóis, lactonas macrocíclicas, imidazotiazóis, monopantel), havendo inclusive cepas multirresistentes às classes farmacológicas.

## 4.2 Controle Biológico

O controle biológico pode ser descrito como o emprego de inimigos naturais das pragas ou parasitos, com intuito de promover a regulação natural da sua população e reduzir a pressão de infecção sobre as plantas ou animais, ocasionando menor impacto ao macro e ao microambiente. Seu uso na agricultura já está bem estabelecido desde a antiguidade, relatando-se o emprego de formigas para o controle de pragas do *Gtrus*, bem como de palmeiras, por exemplo, e estudos referentes à sua aplicação contra parasitos que afetavam os seres humanos bem como os animais e as lavouras ganharam força a partir de 1960 (SILVA *et al.*, 2023). Vale ressaltar que, atualmente, o biocontrole como ação isolada pode não ser uma solução autônoma, no entanto, é uma ferramenta crucial frente ao enfrentamento do desafio que as helmintososes representam desta forma, podendo compor os programas integrados de controle de parasitos.

Os organismos que se tem mostrado mais promissores para o biocontrole de NQs atualmente incluem as minhocas, besouros coprófagos, ácaros nematófagos, nemátodes predadores (SZEWC; WAAL; ZINTL, 2021), fungos entomopatogênicos (MOURA *et al.*, 2023), bem como fungos helmintóforos, dos gêneros *Mnacrosporium*, *Duddingtonia*, *Artrobotrys* e *Pochonia* (LI *et al.*, 2022), os quais tiveram sua eficácia relatada contra estágios de vida livre de NQs de bovinos, equinos, caprinos e ovinos.

### 4.2.1 Fungos helmintóforos

Os fungos helmintóforos são espécies predadoras de fungos distribuídos por todo o mundo que predam nemátodes (ovos, larvas, fêmeas de nemátodes), presentes no ambiente ou no hospedeiro com intuito de desenvolverem-se a partir dos nutrientes obtidos das mesmas e dividem-se em cinco grupos, podendo ser produtores de toxinas, produtores de dispositivos especiais de ataque, endoparasitários, oportunistas ou ovicidas e predadores, sendo os dois

últimos grupos citados os que possuem mais estudos realizados considerando suas aplicabilidades no biocontrôle (LI *et al.*, 2022).

Dentre alguns gêneros pertencentes aos grupos de fungos nematófagos, destacam-se os estudos com *Pochonia* da família *Clavicipitaceae* (fungo ovicida/opportunista), bem como *Monacrosporium Dunddigonia* e *Arthrobotrys* da família *Orbiliaceae* (composta por fungos predadores) (SILVA *et al.*, 2023). Dentre os fatores desejáveis que são considerados e corroboram para que determinados gêneros e espécies possam ter potencial utilização frente aos NGS, estão a especificidade de predação sobre espécies alvo (para que afete apenas espécies de interesse e não prejudique o equilíbrio ambiental), resistência à passagem pelo trato gastrointestinal, resistência às mudanças climáticas (favorecendo um bom crescimento e manutenção dos seus mecanismos de predação no ambiente independente das oscilações de temperatura e/ou umidade), possuir um ciclo de vida curto e um grande potencial reprodutivo (produção de clamidósporos), bem como também sejam capazes de manter populações viáveis no ambiente mesmo quando a quantidade de nematoides no ambiente estiver baixa (SZEWC; WAAL; ZINTL, 2021; CARMO *et al.*, 2022).

#### 4.2.2 *Dunddigonia flagrans*

Dentre os integrantes do grupo dos fungos nematófagos predadores a espécie *Dunddigonia flagrans*, tem sido amplamente estudada por possuir características desejáveis para aplicabilidade e formulações com potencial comercial. Esta espécie pode ser isolada do solo e de tapetes fecais, cresce melhor em fezes úmidas e pode suportar uma faixa de pH de 6,3–9,3, embora o crescimento ideal ocorra em pH 7–8 (SZEWC; WAAL; ZINTL, 2021), e prioritariamente preda as larvas de nematoides. Sua ação dá-se tendo em vista a capacidade do fungo em formar dispositivos de armadilha mecânicas e mecânicas (como redes adesivas, botões, hifas, anéis constritores e não constritores ao longo do micélio para capturar o alvo) os quais aprisionam os helmintos às redes tridimensionais e logo após segue-se a penetração das hifas na cutícula do nematoide, onde ocorre o crescimento destas hifas e a digestão dos conteúdos internos, desta forma matam as formas de vida livre – larvas – recentemente nascidas de ovos e as utilizam como alimento (OLIVEIRA *et al.*, 2021; CARMO *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2023).

A potencial atividade anti-helmíntica foi demonstrada por diversos pesquisadores em diferentes bioensaios com diferentes hospedeiros (bovinos, equinos, caprinos, ovinos, galinhas) e variados gêneros e espécies de nematoides (*Ostertagia* sp., *Cooperia* sp., *Dityocaulus* sp. e *H. contortus* (ZARRIÑ RAHDAR; GHOLAM AN, 2015)), podendo citar, por exemplo os

resultados de Oliveira *et al.* (2021) ao administrar diariamente pellets com a adição de esporos fúngicos de *D. flagrans* para bovinos jovens obtiveram ao 90º dia uma redução significativa de 87,5% nos ovos por grama de fezes quando comparado ao grupo controle. Similarmente Rodrigues *et al.* (2021) obtiveram resultados satisfatórios no controle de nematódeos gastrointestinais, onde *D. flagrans* apresentou elevada capacidade predatória após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos.

Formulações fúngicas a base de *D. flagrans* são as únicas atualmente sendo comercializadas para controle biológico dos NGIs, o BioWor<sup>®</sup> que entrou no mercado em 2018-2019 é produzido pela empresa australiana International Animal Health, o qual teve resultados significativos para redução de larvas em pastagens quando avaliado para os hospedeiros equinos, bovinos, caprinos e ovinos (SZEWC; WAAL; ZINTL, 2021) e o Biover<sup>®</sup> o qual utiliza a cepa AC001 isolada de *D. flagrans* para sua produção entrou no mercado em 2019 (sob permissão do MAPA licenciado pelo número nº SP- 10.261/2019), sendo fabricado pela empresa brasileira Gnergis (BRAGA *et al.*, 2020). Mais estudos acerca destas formulações são necessários a fim de determinar sua eficácia e condições a campo nas diferentes regiões bem como avaliar seus impactos a curto e longo prazo para o meio ambiente.

### 4.3 Uso de compostos botânicos

Com a finalidade de tratar diversas enfermidades humanas e veterinárias desde a antiguidade o uso das plantas é descrito como um recurso terapêutico, sendo que muito antes do desenvolvimento dos compostos orgânicos sintéticos o uso destas substâncias naturais como o óleo de chenopodium, santonina e a papaína já eram difundidas para o tratamento de helmintíases (CARMO *et al.*, 2022). As substâncias bioativas com intuito de defesa contra micro-organismos, insetos e herbívoros que muitas dessas plantas apresentam são resultantes da metabolização de compostos orgânicos. Estes compostos bioativos são originados através do metabolismo secundário das plantas, por meio de complexos processos bioquímicos em seu interior, com intuito de proporcionar a interação da planta com o meio ambiente. Este metabolismo por sua vez possui importância comercial em diversas áreas, com ênfase à fitoterapia, nutracêutica e aplicações industriais na área da saúde pública (CASANOVA; COSTA, 2017).

#### 4.3.1 Carvacrol

O carvacrol ou cimofenol ( $C_9H_8O$ ), é um monoterpeno fenólico isomérico ao timol. Atribui-se a ele o odor característico do orégano (*Origanum vulgare*), e também pode ser identificado como componente majoritário presente nos óleos essenciais de

*Mentha spicata* (mentha), *Thymbra capitata* (tomilho), dentre outros (PANDA *et al.*, 2022). Este componente bioativo apresenta uma alta toxicidade, entretanto, conforme demonstrado em estudos de André *et al.* (2020), a acetilação pode ser uma alternativa para potencializar a atividade biológica do carvacrol, bem como aumentar a segurança toxicológica. Podem ser citadas como algumas propriedades associadas a este composto a atividade anti-helmíntica direta, com efeito ovicida bem como larvicida (STRBAC *et al.*, 2022a) e a atividade antibacteriana, que está associada a inibição do biofilme bacteriano, bem como por alguns outros meios, como inibição da bomba de efluxo (GANDOVA *et al.*, 2023).

A potencial atividade nematocida associada a este composto bioativo bem como ao timol, sugere-se em estudos conduzidos por Strbac *et al.* (2022a), estar associada a danos ocasionados à cutícula e ao aparelho digestivo em larvas, bem como estes compostos provavelmente também se relacionam a efeitos neurotóxicos sobre nematoides de vida livre.

#### 4.3.2 Eugenol

O eugenol (C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>) é um derivado fenólico volátil, um guaiacol com cadeia alil substituída, conhecido por ser um dos componentes majoritários do óleo essencial da planta *Syzygium aromaticum* (também conhecida popularmente como cravo-da-índia, sendo o eugenol responsável pelo aroma desta especiaria), podendo também ser extraído dos óleos de *Mysticica fragrans* (noz moscada), *Gnammomum verum* (canela), *Ocimum basilicum* L (manjeriçã) e *Laurus nobilis* L (louro) ou ainda ser produzido de forma sintética devido a alilação do guaiacol como alilcloroto. O eugenol é um ácido fraco, sendo solúvel e insolúvel em solventes orgânicos (NEJAD, ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2017). Dentre as propriedades associadas a este composto bioativo podem ser citados os efeitos antimicrobiano, inseticida, antibacteriano, analgésico e antisséptico, além de possuir potencial acaricida e nematocida (PANDA *et al.*, 2022; SILVA *et al.*, 2024). Tem grande aplicabilidade na medicina pois o mesmo promove um aumento na penetração cutânea de diversos medicamentos (NEJAD, ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2017).

A potencial atividade nematocida associada ao eugenol foi apontada, por exemplo, nos bioensaios realizados por Pessoa *et al.* (2002), que ao avaliarem diferentes concentrações do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* Linn e de seu principal componente eugenol contra *Haemonchus contortus*, puderam verificar que nos testes *in vitro* o composto bioativo apresentou inibição máxima da eclodibilidade na concentração de 0,5%

#### 4.3.3 Nerolidol

O nerolidol ( $C_{15}H_{26}O$ ) é um sesquiterpeno acídico que apresenta alta volatilidade e baixa solubilidade aquosa, sendo comumente encontrando de forma majoritária em OEs obtidos das folhas (fonte de extração mais comum para obtenção do nerolidol), flores, hastes, partes aéreas, raízes, resinas, galhos, sementes e frutos de diferentes plantas como por exemplo da *Lippia origanoides* Kunth (alecrim-pimenta), *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), *Zingiber officinale* Roscoe (gingibre), *Lavandula angustifolia* Miller (lavanda) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (capim-limão) (DINZ *et al.*, 2016) e é aprovado pela FDA dos EUA como agente aromatizante de alimentos. Dentre as diversas propriedades biológicas associadas a este composto podem-se citar sua ação antioxidante, antimicrobiana, larvicida, seu efeito contra protozoários (inibição de crescimento *in vitro* de *Babesia* spp, bem como sua ação leishmanicida) e seu efeito potencializador para permeação de drogas terapêuticas na forma transdérmica (ŠTRBAC *et al.*, 2022b).

#### 4.3.4 Timol

O timol ( $C_{10}H_{14}O$ ) é um terpeno que possui baixa dispersibilidade em água (hidrofóbico) e pode ser obtido nos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Lippia sidoides* (alecrim-pimenta), por exemplo. Este composto possui comprovada ação inseticida, antioxidante e antifúngica bem como ação anti-helmíntica, com efeito ovicida demonstrado sobre nematódeos, como *H. contortus* e acredita-se que este composto possa ter ação sobre os receptores de acetilcolinesterase (AChE) encontrados em vertebrados e invertebrados, produzindo danos neurotóxicos semelhantes aos dos organofosforados (KATI KI *et al.*, 2017; ŠTRBAC *et al.*, 2022a).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Considerações éticas

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais – CEUA da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), e aprovado sob número de protocolo 23007.00015182/2023-67.

### 5.2 Local do estudo e animais utilizados nos experimentos

As análises laboratoriais referentes ao experimento *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (LPDP – HUMV) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) Campus de Cruz das Almas. As análises referentes ao experimento *in vivo* foram realizadas na infraestrutura laboratorial presente no Hospital Universitário de Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Santa Cruz - Hospvet UESC

Para o experimento *in vitro* foram utilizadas amostras fecais coletadas de bovinos da fazenda experimental da UFRB que estavam em pastejo e eram animais naturalmente infectados por helmintos, sem tratamento prévio com anti-helmínticos por 90 dias.

Para o experimento *in vivo* foram utilizados 24 bovinos da raça Grolando grau de sangue ½ sangue e ¾ devidamente registrados na Associação Brasileira de Criadores de Grolando, naturalmente infectados por helmintos e sem tratamento prévio com anti-helmínticos por no mínimo 90 dias, de uma propriedade localizada no município de Iguai – BA

### 5.3 Formulação de *D. flagrans*

A formulação comercial foi desenvolvida à base de clamidósporos do fungo *D. flagrans*, esta formulação já está registrada e seu uso licenciado pelo MAPA (sob nº SP-10.261/2019) e sendo comercializada no Brasil. A formulação foi gentilmente cedida pela empresa CNERGIS Saúde e Nutrição Animal, com sede administrativa na cidade de Paulínia – SP.

### 5.4 Compostos botânicos

As soluções padrão de carvacrol, eugenol, nerolidol e timol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA) para a execução do experimento *in vitro*. Com estes foram elaboradas suspensões dos compostos associadas e não associadas a formulação fúngica a base de *D. flagrans*.

## 5.5 Delimitação experimental

O experimento foi dividido em duas etapas: a primeira sendo *in vitro* e a segunda sendo *in vivo*. O ensaio *in vitro* foi composto por 16 grupos, sendo o Grupo 1: Controle (água e Tween 80 a 3%), Grupo 2: Formulação fúngica à base de *D. flagrans* ( $1 \times 10^5$  clâmidosporos) na quantidade de 3g, Grupo 3: Carvacrol 1%, Grupo 4: Carvacrol 1% + Formulação fúngica, Grupo 5: carvacrol 0,5%, Grupo 6: carvacrol 0,5% + Formulação fúngica, Grupo 7: eugenol 1%, Grupo 8: eugenol 1% + Formulação fúngica, Grupo 9: eugenol 0,5%, Grupo 10: eugenol 0,5% + Formulação fúngica, Grupo 11: timol 1%, Grupo 12: timol 1% + Formulação fúngica, Grupo 13: timol 0,5%, Grupo 14: timol 0,5% + Formulação fúngica, Grupo 15: nerolidol 0,5%, Grupo 16: nerolidol 0,5% + Formulação fúngica ( não houve composto isolado disponível o suficiente para realização dos grupos nerolidol 1% e nerolidol 1% + Formulação fúngica e suas repetições por este motivo, os mesmos não constam no presente trabalho) e consistiu em avaliar a compatibilidade do fungo com os diferentes compostos botânicos e também avaliar a eficácia dos compostos isolados de óleos essenciais associados ou não à formulação fúngica comercial em estudo, constituída por *D. flagrans*.

No teste de compatibilidade dos compostos botânicos com *D. flagrans*. Os padrões de carvacrol, eugenol, nerolidol e timol foram dissolvidos separadamente em soluções aquosas contendo tween 80 (10%) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a fim de obter soluções padrão de trabalho em concentrações de  $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As soluções foram armazenadas a  $4^\circ\text{C}$  até o momento de uso. O fungo utilizado foi a formulação comercial Boverin®. Posteriormente foi realizado a avaliação do crescimento micelial. Para tanto, em uma placa de Petri contendo meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) foram adicionados  $500 \mu\text{L}$  de cada composto botânico testado (em placas separadas) e  $100 \text{ ng}$  de formulação fúngica contendo *D. flagrans*, sendo o teste realizado em triplicata. Em seguida as placas foram mantidas em BOD por 14 dias e avaliadas em microscópio.

Para avaliar o efeito dos tratamentos com os compostos botânicos associados ou não à formulação fúngica, foi utilizada a técnica de coprocultura quantitativa (UENO, GONÇALVES, 1998), com adaptações. Após a coleta das amostras de fezes, fez-se um pool com as amostras fecais positivas e o OPG deste teve como resultado contagem de 450 ovos. Os grupos a serem tratados compuseram-se por 2g de fezes provenientes do pool acrescidas de 2mL dos preparados diluídos e homogeneizados (compostos botânicos + Tween 3% + água destilada) nas respectivas concentrações, 2g de narvalha e os grupos que continham a formulação fúngica, era adicionado 3 g do produto. O controle negativo foi composto por 2g



de fezes, 2g de maravalha, 2 mL de água destilada e Tween 3%. Os copos foram fechados com plástico filme de PVC, no qual foram feitos pequenos furos para manter aeração. Cada grupo foi formado por seis unidades experimentais.

As coproculturas foram cultivadas por 10 dias em temperatura ambiente no Laboratório Multifuncional do HUMV da UFRB e, quando necessário, umidificados com água destilada, a fim de manter o ambiente propício à ecodibilidade e consequente surgimento dos estágios larvais.

Decorridos 10 dias à montagem da coprocultura, fez-se o resgate das larvas preenchendo cada microambiente até à borda com água destilada a 40 °C, cobrindo-o com placa de Petri e fazendo a inversão rápida, deixando levemente inclinado. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água destilada nas laterais do copo. Após 2h, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, fez-se a coleta de todo o conteúdo da placa, o qual foi acondicionado em tubos de Falcon de 15 mL identificados e armazenados em temperatura de refrigeração.

Centrifugou-se as amostras por 5 minutos com velocidade de 2000 rotações por minuto (rpm). Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, desprezou-se o sobrenadante do tubo após centrifugação, preservando 2mL do conteúdo. Procedendo à leitura, o conteúdo foi depositado na câmara Counting Cell - Sedgwick Rafter Cell S50 com uma gota de lugol e visualizado em microscópio óptico na objetiva de 10x.

Para avaliar a eficácia dos tratamentos, utilizou-se a fórmula de redução de larvas, conforme Rodrigues et al. (1996):

A segunda etapa deste experimento consistiu no teste *in vivo* e foi composto por dois grupos: Grupo 1: animais que receberam a formulação comercial à base de *D. flagrans* ( $1 \times 10^5$  clamidósporos) e Grupo 2: Controle, animais que não receberam a formulação, e sim tratamento de eleição da propriedade, fosfato de levamisol (Ripercol®). Cada grupo foi composto por 12 animais, considerando-se a portaria nº 35 de 31 de Janeiro de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA que contém o Regulamento Técnico Sobre Produtos Antiparasitários de Uso Veterinário, com os critérios e os procedimentos para o registro para efeito de licenciamento para comercialização no Brasil, o qual preconiza no anexo II, marcador

“2.2.2.3 - Estudos controlado com infecção natural e OPG” um mínimo de dez animais por grupo para atender as necessidades de comprovação de eficácia em estudos com infecção natural (BRASIL, 2020).

## 5.6 Ensaio experimental *in vivo*

No início do experimento, seguindo orientações da bula da formulação de fungos a ser testada, todos os 24 animais foram tratados como anti-helmíntico à base de fosfato de leva nisol usando a dose preconizada pelo fabricante para administração em bovinos, antes da administração da formulação comercial de fungos visando a redução significativa da quantidade de parasitos presente nos animais. Após sete dias do tratamento e após confirmação de resultados negativos da presença de ovos de helmintos nas fezes dos animais, as quais foram coletadas diretamente da ampola retal, os bovinos foram divididos aleatoriamente em dois grupos contendo 12 indivíduos cada e em cada grupo ficou em um piquete distinto.

O ranqueamento dos animais ocorreu de acordo ao que se recomenda no anexo II da portaria nº 35 de 31 de janeiro de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, onde os dois animais com contagem mais elevadas de parasitos em seu OPG pré tratamento foram alocados nos grupos tratamento (grupo 1) e controle (grupo 2) por meio de sorteio. Após essa definição, repetiu-se o procedimento até que cada grupo tivesse o nº de animais (BRASIL, 2020).

No grupo 1 cada animal foi tratado com 1g da formulação contendo  $1 \times 10^5$  clamidósporos de *D. flagrans* para cada 100 kg de peso vivo animal, a qual foi fornecida juntamente com ração comercial, diariamente por 60 dias. O grupo 2 recebeu tratamento com fosfato de leva nisol durante o período do experimento (duas doses, uma a cada 30 dias).

Após a seleção e divisão em grupos, cada um deles ficou em um piquete distinto, naturalmente contaminados com larvas de helmintos, pelo histórico de pastejo prévio por animais jovens e adultos. Toda a metodologia proposta está de acordo com os *guidelines of World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (WAAVP) seguindo as orientações para avaliar a eficácia de anti-helmínticos e mruinantes descrita por Powers *et al.* (1982).

### 5.6.1 Colheita e processamento do material fecal

No experimento *in vivo*, após a introdução dos animais nos pastos por um período de 60 dias, a cada 15 dias amostras de fezes de todos os animais de cada grupo foram coletadas

diretamente da ampola retal. Nessas amostras foram determinadas as contagens de ovos por grama de fezes (OPG) pelo método de Gordon e Whitlock (1939) modificada por Lima (1989).

#### 5.6.2 Pesagem dos animais

Para obtenção dos pesos dos animais utilizados no presente estudo, foi utilizada uma balança de pesagem para gado instalada no curral da propriedade JRM Agropecuária, a qual concedeu o uso destes animais para o experimento. Cada animal subiu a balança e teve seu peso aferido, o qual foi relacionado juntamente com o brinco de identificação e em uma lista. Estas pesagens ocorreram quinzenalmente, totalizando 4 pesagens. Os resultados foram utilizados para quantificar a quantidade de formulação fúngica comercial a ser ministrada diariamente para os animais grupo Tratamento (1g a cada 100 kg de peso vivo), bem como para estimar o ganho de peso dos animais dos grupos Tratamento e Controle durante a realização do estudo.

#### 5.7 Análises estatísticas

A análise estatística dos dados obtidos no experimento *in vitro* considerou as variáveis quantificação das larvas infectantes (L3) recuperadas nas fezes bem como o percentual de redução das larvas foram submetidas aos testes de normalidade e posteriormente à análise de variância (ANOVA). As médias das variáveis foram comparadas utilizando o teste de Tukey, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

## 6 RESULTADOS

No teste para verificar a compatibilidade dos compostos botânicos e *D. flagrans* notou-se que os compostos botânicos carvacrol (Figura 2 A e B), eugenol (Figura 2 C e D), nerolidol (Figura 2 E e F) e timol (Figura 2 G e H) a 0,5 e 1,0% quando comparados ao controle (neste caso, a formação fúngica de *D. flagrans*) não ocasiona a inibição do crescimento do fungo *D. flagrans* (Figura 2).

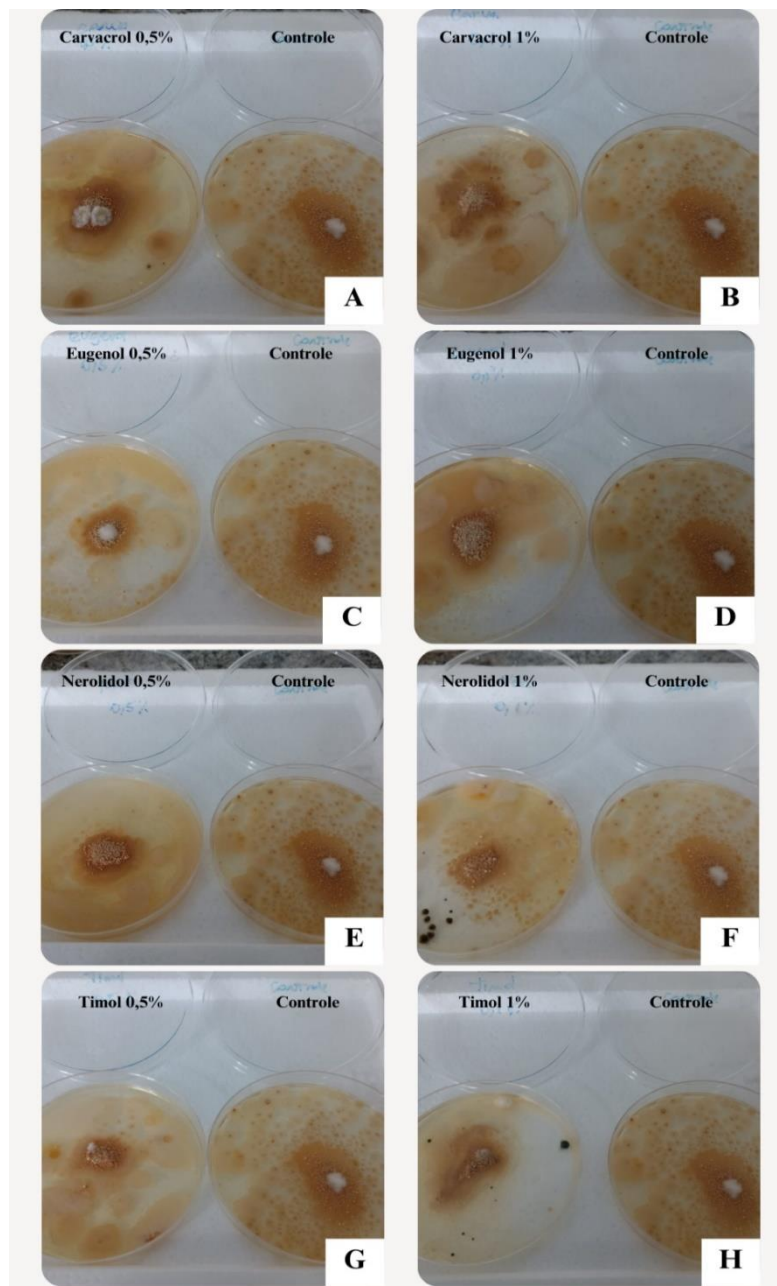


Figura 2 – Visualização dos resultados obtidos no teste de compatibilidade dos compostos botânicos e *D. flagrans*. Onde verifica-se que, carvacrol 0,5% (A) e 1% (B), eugenol 0,5% (C) e 1% (D), nerolidol 0,5% (E) e 1% (F), e timol 0,5% (G) e 1% (H) não inibem o desenvolvimento de *D. flagrans*.

Na realização dos bioensaios referentes aos testes *in vitro* para avaliação da eficácia da formulação fúngica de *D. flagrans* e dos compostos isolados associados ou não à formulação fúngica, obteve-se diversos valores nas coproculturas quantitativas. No grupo controle (H<sub>2</sub>O + Tween 80 (10%)) a quantidade de larvas recuperadas foi de  $531,7 \pm 150,3$ , e no grupo formulação fúngica este valor foi de  $81,2 \pm 121,0$  (Tabela 1).

Nos grupos tratados com os compostos botânicos carvacrol, eugenol e timol na concentração de 1% os valores de larvas infectantes de terceiro estágio recuperadas tiveram valores que variaram de 1,5 a 2,7 larvas, e na concentração de 0,5% os grupos carvacrol, eugenol, nerolidol e timol obtiveram valores que variaram de 0 a 1,5 larvas recuperadas.

Nos grupos tratados com os compostos isolados carvacrol, eugenol e timol associados à formulação fúngica de *D. flagrans* na concentração de 1% a quantidade de larvas de terceiro estágio recuperadas variaram de 0,2 a 4,0 larvas, e na concentração de 0,5% os grupos carvacrol, eugenol, nerolidol e timol obtiveram valores que variaram de 0 a 36,2 larvas recuperadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Média  $\pm$  desvio padrão e Percentual de Redução de larvas de terceiro estágio de estrongilídeos recuperadas, após a exposição aos diferentes tratamentos com os compostos botânicos carvacrol, eugenol, nerolidol e timol a 0,5 e 1,0% associados ou não à formulação comercial de *Duddingtonia flagrans* (\*)

Grupos	Larvas L3	% de redução de Larvas L3
Controle (H <sub>2</sub> O + Tween 10)	$531,7 \pm 150,3$ a	-
Formulação fúngica	$81,2 \pm 121,0$ b	84,7
Carvacrol 1%	$1,5 \pm 2,3$ b	99,7
Carvacrol 1% + Formulação fúngica	$0,2 \pm 0,4$ b	99,9
Carvacrol 0,5%	$0 \pm 0$ b	100
Carvacrol 0,5% + Formulação fúngica	$1,3 \pm 1,5$ b	99,7
Eugenol 1%	$2,7 \pm 5,6$ b	99,5
Eugenol 1% + Formulação fúngica	$4,0 \pm 9,8$ b	99,3
Eugenol 0,5%	$0,8 \pm 0,8$ b	99,8
Eugenol 0,5% + Formulação fúngica	$36,2 \pm 47,1$ b	93,2
Nerolidol 0,5%	$1,5 \pm 1,6$ b	99,7
Nerolidol 0,5% + Formulação fúngica	$0,2 \pm 0,4$ b	99,9
Timol 1%	$1,7 \pm 3,2$ b	99,7
Timol 1% + Formulação fúngica	$2,8 \pm 3,8$ b	99,5
Timol 0,5%	$0,2 \pm 0,4$ b	99,9
Timol 0,5% + Formulação fúngica	$0 \pm 0$ b	100

\* Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Os grupos obtiveram percentuais de redução de larvas infectantes de terceiro estágio de estrongilídeos que variaram de 84,7 a 100% sendo 84,7 o percentual de redução de larvas do

grupo for mulação fúngica e 100 % os percentuais obtidos pelos tratamentos com carvacrol 0,5% e timol 0,5% + Formulação fúngica (Figura 3).

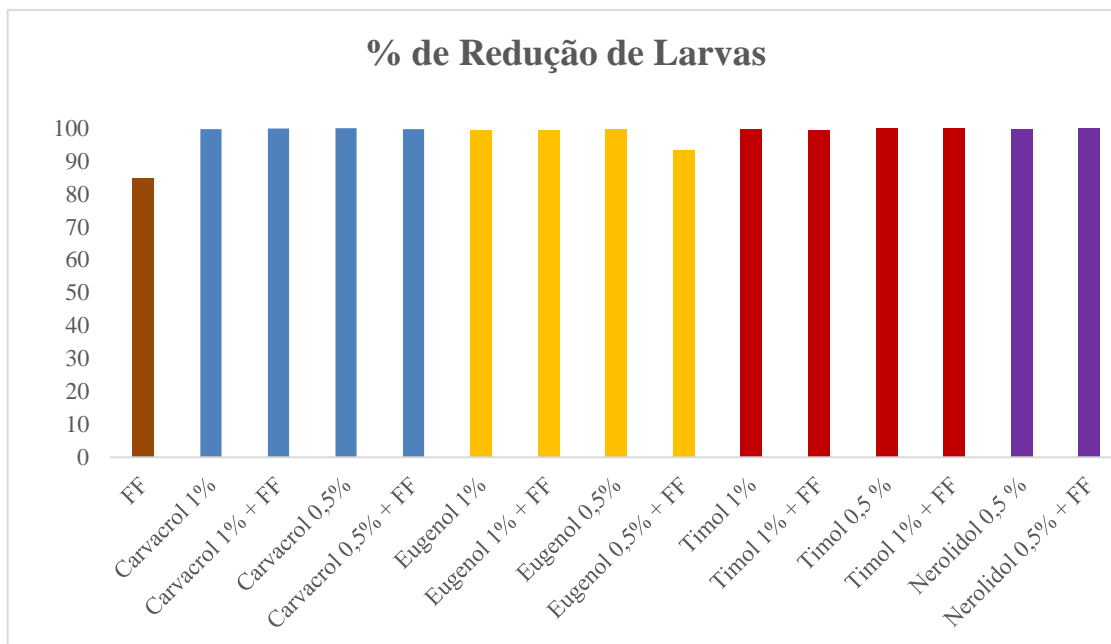


Figura 3 - Percentual de redução de larvas de terceiro estágio (L3) de estrogilídeos recuperadas, após a exposição aos diferentes tratamentos com os compostos botânicos carvacrol, eugenol, nerolidol e timol a 0,5 e 1,0% associados ou não à formulação comercial de *Duddingia flagrans*

Efetou-se ainda a quantificação e identificação de larvas infectantes encontradas no presente bioensai e dentre os gêneros de estrogilídeos encontrados, pode-se citar a ocorrência de *Haemonchus* spp. e *Trichostrongylus* spp., entretanto, devido à baixa ocorrência das larvas nas amostras que continham os tratamentos estimativas de predominância de gênero não puderam ser estabelecidas.

Na realização dos bioensaios referentes aos testes *in vivo*, os animais do grupo tratamento após administração de 1g da formulação fúngica de *D flagrans* a cada 100 kg de peso vivo animal apresentaram resultados negativos ou abaixo de 300 ovos por grama de fezes nas coletas efetuadas no período entre 11 de outubro e 28 de novembro. Neste mesmo período os animais do grupo controle que receberam doses de fosfato de levamisol (Ripercol®) e apresentaram resultados negativos ou abaixo de 50 ovos por grama de fezes nas coletas efetuadas. Os espaços em branco na Tabela 2 representam que a amostra coletada foi insuficiente para mensuração do OPG ou ainda, que a ampola retal do animal estava vazia.

Tabela 2 - Demonstração dos grupos tratamento e controle e seus resultados de ovos por grama de fezes (OPG) nas coletas realizadas de 11 de outubro a 28 de novembro

Grupo	Brinco	OPG 11/10	OPG 01/11	OPG 14/11	OPG 28/11
Tratamento	989	0	0	0	
Tratamento	995	0	0		0
Tratamento	1001	0		0	0
Tratamento	1039	0	0	0	
Tratamento	1061	0	0	0	50
Tratamento	1076	0	0	0	0
Tratamento	1085	0	50	0	0
Tratamento	1095		0	0	200
Tratamento	1096		0	0	
Tratamento	1100		0	0	
Tratamento	1105		0	0	300
Tratamento	1115		0	0	
Controle	742	0	0	0	
Controle	860	0	0	0	0
Controle	900	0	0	0	0
Controle	902	0	0		0
Controle	926	0	0	0	0
Controle	936	0	0		0
Controle	940	50	0	0	0
Controle	947	0	0	0	0
Controle	949		0		0
Controle	923			0	0
Controle	695			0	0
Controle	931			0	0

Ao avaliar peso dos animais utilizados no experimento *in vivo* na pesagem inicial os indivíduos do grupo tratamento (formulação fúngica de *D. flagrans*) tinham de 95 a 110 kg (média de 105 kg) de peso vivo, e na pesagem final os animais apresentaram pesos que variaram de 100 a 130kg (média de 117 kg), no que se refere ao ganho de peso, estes chegaram a ganhar 30 kg de peso vivo. Os animais do grupo controle (fosfato de levamisol - Ripercol<sup>®</sup>) na pesagem inicial tinham de 160 a 270 kg (média de 195,6 kg) de peso vivo, e na pesagem final os animais apresentaram pesos que variaram de 175 a 290 kg (média de 211 kg), no que se refere ao ganho de peso, um animal chegou ao marco de 50 kg ganhos enquanto os demais ganharam em torno de 15 a 23 kg de peso vivo (Tabela 3).

Tabela 3- Demonstração dos grupos tratamento e controle e sua progressão de peso no período de 11 de outubro a 28 de novembro.

Grupo	Brinco	Peso 11/10	Peso 01/11	Peso 14/11	Peso 28/11	Ganho de peso
Tratamento	989	110	110	115	130	20
Tratamento	995	95	93	102	110	15
Tratamento	1001	100	110	117	130	30
Tratamento	1039	100	100	106	125	25
Tratamento	1061	100	100	110	100	0
Tratamento	1076	110	110	119	122	12
Tratamento	1085	110	115	120	130	20
Tratamento	1095	105	115	120	122	17
Tratamento	1096	110	105	110	113	3
Tratamento	1100	100	92	100	100	0
Tratamento	1105	110	112	117	115	5
Tratamento	1115	110	100	100	108	-2
Controle	742	203	220	215	226	23
Controle	860	240	251	268	290	50
Controle	900	217	230	240	240	23
Controle	902	190	200	205	205	15
Controle	926	160	170	185	176	16
Controle	936	180	180	185	180	0
Controle	940	162	170	173	176	14
Controle	947	185	185	185	188	3
Controle	949	190	200	202	204	14
Controle	923	161	160	170	175	14
Controle	695	270	270	280	267	-3
Controle	931	190	195	250	210	20



## 7 DISCUSSÃO

Com base na análise dos resultados obtidos referentes ao percentual de redução de larvas, pode-se inferir que a maioria dos grupos foram eficazes quando comparados (percentual de redução de larvas superior a 90% e testes *in vitro*, são considerados eficazes para controle de nematoides de acordo com WAAVP) ao grupo controle. Nota-se pequena quantidade de larvas recuperadas ou ausência das mesmas em alguns tratamentos, o que, pode-se inferir estar atrelado a tamanha eficácia dos tratamentos, resultando em baixa população de larvas nas amostras fecais com os tratamentos ministrados, supondo-se então que os tratamentos possam ter inibido a continuidade do ciclo biológico, e que a baixa população de larvas possa ser atribuída à predação pelo fungo, bem como pelos mecanismos de ação dos compostos isolados que levaram a interrupção da fase de vida livre do ciclo biológico dos helmintos.

A formulação fúngica de *D. flagrans* no presente experimento obteve um percentual de redução de 84,7% de larvas infectantes de terceiro estágio. Em experimentos conduzidos por Veira et al. (2020), foram obtidos percentuais de redução de larvas infectantes (L3) que variaram de 61,9% a 96,8% em diferentes faixas de temperatura (15°, 20°, 25°, 30° e 35° C) em testes com *D. flagrans*. No presente trabalho, durante a execução do experimento as temperaturas em Cruz das Almas, Bahia, Brasil variaram entre máximas em torno de 29° C enquanto a variação mínima alcançou valores entre 22° C e 26° C. Ao considerar estes valores e compará-los aos encontrados por Veira et al. (2020), com os percentuais de redução obtidos nas temperaturas de 25° C (96,8%) e 30° C (94,5%) ainda assim o valor obtido no presente trabalho é inferior (84,7%) ao observado no outro estudo.

Esta variação nos resultados obtidos nos experimentos pode estar atrelado a diversos fatores, podendo-se elencar dentre eles a dosagem de esporos fúngicos utilizados (pode-se supor que a quantidade (3g) possa não ter sido proporcional para conter o desafio (quantidade de ovos de nematódeos presentes na amostra), o mecanismo do fungo pode ter sido comprometido ou ainda o crescimento fúngico, os quais, podem ser afetados pela variação de temperatura ambiental bem como por variações na temperatura do bolo fecal contendo os clâmidos poros do fungo. Em seu trabalho Sze wc, Wal e Zrtl (2021), descrevem que altos níveis de intensidade de luz, como o tempo ensolarado de verão reduzem a eficácia deste fungo, bem como temperaturas muito elevadas aceleram a formação das redes tridimensionais e reduzem sua resistência (em temperaturas mais frias (abaixo de 10 °C), as redes crescem de forma lenta ou não se formam), ou ainda que sua ação pode ser afetada por condições anaeróbicas (o que pode ocorrer naturalmente nas camadas mais profundas do bolo fecal) levando a inibição da formação das redes.

Nos grupos tratados com o composto isolado carvacrol 0,5% e 1% os percentuais de redução de larvas foram excelentes (100% e 99,7% respectivamente), desta forma o efeito ovicida pode estar atrelado a sua alta toxicidade bem como às propriedades deste componente bioativo quando em contato com as larvas dos nematoides. O componente isolado provavelmente desencadeou um efeito biológico sobre os ovos e/ou larvas pelos danos ocasionados à cutícula (que provavelmente aumenta a permeabilidade cuticular) e aparelho digestivo das larvas bem como pelos efeitos neurotóxicos (pela interação com receptores tiramina SER-2), podendo ainda ocasionar alterações estruturais que levam a paralisia e morte do nematódeo (ŠTRBAC *et al.*, 2022a), ressalta-se também que em estudos realizados por Tong *et al.* (2013), foi demonstrado que este composto possui ação dose dependente sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChR) em insetos, promovendo inibição da ligação [14C]-nicotina em membranas contendo receptores neuronais da acetilcolina. Desta forma, demonstrando a eficiência do composto sobre o ser vivo e mestudo, validando-se por meio da inibição e/ou quebra do ciclo de vida deste parasito.

Nos grupos tratados com o composto isolado eugenol 0,5% e 1% os percentuais de redução de larvas foram excelentes, sendo de 99,8% e 99,5% respectivamente, assim foi verificada ação ovicida/larvicida significativa nos grupos, que pode ser atestada também em bioensaios realizados por Pessoa *et al.*, (2002), onde óleo essencial contendo eugenol como um dos componentes majoritários (*Ocimum gratissimum* Linn.) e o eugenol quanto composto isolado em diferentes concentrações (0,0625, 0,12, 0,25, 0,5 e 1,0%) foram avaliados sobre ovos de *H. contortus*, sendo que o composto isolado nas concentrações de 0,5 e 1% apresentaram percentuais de inibição de eclodibilidade de  $100,0 \pm 2,26$  e  $100,0 \pm 2,59$ , respectivamente, sendo similares inclusive ao controle positivo utilizado no estudo dos nemos (tiabendazole), e quando comparados ao presente estudo, os valores encontram-se bem próximos.

A ação ovicida e larvicida deste bioativo pode estar atrelada ao aumento da permeabilidade cutânea que o nemos promove (NEJAD, ÖZGÜNEŞ; BAŞARAN, 2017) assim como a indução de diversas alterações neurológicas e estruturais, podendo-se supor que seu mecanismo de ação provavelmente possa ser atribuído à sua interação com o tegumento do nematóide, agindo em suas enzimas (digestivas e neurológicas) ocasionando a inibição da enzima Acetilcolinesterase – AchE que é responsável pela hidrólise da acetilcolina nas sinapses colinérgicas, o que culmina com a paralisia, entre outros sintomas podendo ocasionar a morte, bem como é descrito para artrópodes (SILVA *et al.*, 2024). Em nematoides ele poderia impactar

ainda a sobrevivência e vitalidade, tendo em vista que pode afetar o sistema reprodutivo, causando baixa fertilidade e podendo influenciar no processo da oviposição (ŠTRBAC *et al.*, 2022a).

No grupo tratado com o composto isolado nerolidol 0,5% o percentual de redução de larvas infectantes foi excelente, sendo de 99,7%. Este composto bioativo possui uma baixa solubilidade aquosa, e tem um efeito potencializador para permeação cutânea (ŠTRBAC *et al.*, 2022b), estes fatores complementam-se, tendo em vista que quanto maior a propriedade lipofílica do biocomposto, maior será a permeabilidade desta membrana celular do parasito, o que poderia conferir melhores resultados em estudos *in vivo* (GOMES *et al.*, 2016). Tendo isto em vista e considerando-se que estes compõem majoritariamente os óleos essenciais extraídos de diversas plantas, pode-se supor que, tal qual observado em óleos essenciais e por sua constituição lipofílica, sua ação poderia estar atrelada a efeitos mecânicos simultâneos devido à natureza hidrofóbica do bioativo, cursando com a morte dos parasitos devido ao estresse hídrico ou asfixia ocasionados pelo composto (ELLSE, WALL, 2014).

Nos grupos tratados com o composto isolado timol 0,5% e 1% estes obtiveram um percentual de redução de larvas excelente, sendo 99,9% e 99,7% respectivamente. A atividade ovicida do mesmo foi demonstrada em estudos de Katiiki *et al.* (2017), e o efeito anti-helmíntico associado a este terpeno (que é um sesquiterpeno do eugenol) pode ser resultante de um mecanismo de ação semelhante ou igual ao do Eugenol e aos organofosforados, onde atua sobre os receptores de acetilcolinesterase (AChE) de vertebrados e invertebrados, o que resulta em danos neurotóxicos (ŠTRBAC *et al.*, 2022a). Tal qual o nerolidol, este composto é lipofílico, o que resulta numa melhor interação com as membranas celulares, potencializando sua ação sobre os nematoides, como exposto anteriormente.

No grupo da associação de carvacrol e *D. flagrans* 0,5% e 1% os percentuais de redução de larvas foram de 99,7 e 99,9% respectivamente. Quando comparado com os grupos tratados com este composto isolado, notamos que na concentração de carvacrol 1% a associação demonstrou um efeito superior, aproximando-se da inibição máxima, o que pode indicar haver um efeito sinérgico nesta concentração com a formulação fúngica (a qual quando administrada isoladamente obteve um percentual de redução de 84,7%). Isto pode estar atrelado ao mecanismo de ação do carvacrol que exacerba os danos na cutícula do nematoide o que auxilia no mecanismo de ação do fungo predatório *D. flagrans*, de modo que ocorra uma maior permeabilidade e proliferação das hifas na cutícula dos nematoides, bem como também garantindo que aqueles nematoides que não foram predados pelo fungo terão sua vida interrompida pela ação do biocomposto.

No grupo da associação de eugenol e *D. flagrans* 0,5% e 1% os percentuais de redução de larvas foram equivalentes a 93,2 e 99,3% respectivamente, nota-se que para este composto os percentuais foram maiores nos grupos tratados como composto de forma isolada e no grupo associado a formulação fúngica na concentração de 0,5% (sendo o percentual do biocomposto isolado 99,8%), demonstrando que a concentração de 0,5% é suficiente para obtenção de uma boa taxa de controle. Este composto promoveu uma ação sinérgica frente a associação com o fungo e estudou o mecanismo de ação do eugenol ocasiona a inibição da acetilcolinesterase, como já descrito anteriormente e, tal qual o carvacrol, promove aumento da permeabilidade cutânea, podendo agir de forma semelhante ao que supusesse estar associado ao sinergismo que ocorreu nos grupos da associação de carvacrol e *D. flagrans*.

Na associação de nerolidol e *D. flagrans* 0,5% o percentual de redução de larvas infectantes foi de 99,9% um valor que se aproxima da inibição máxima. Este composto botânico caracteriza-se por ser lipofílico, e esta propriedade o confere uma maior atuação sobre as membranas celulares, mudando significativamente sua estrutura e o uso deste composto de maneira isolada promoveu uma atividade satisfatória conforme foi demonstrado no presente estudo. Desta forma, pode-se sugerir que sua associação com o fungo resultou numa ação sinérgica, exacerbando esta característica do mesmo e complementando o efeito com o mecanismo de ação do fungo, fazendo com que as hifas deste possam ter permeado de maneira mais agressiva os nematódeos, resultando na morte destes parasitos.

Nas associações de timol e *D. flagrans* 0,5% e 1% o percentual de redução de larvas, foi, respectivamente, 100 e 99,5% alcançando a inibição máxima na concentração de 0,5%. Tendo em vista que o timol tem propriedades antifúngicas comprovadas, o mesmo aparenta ter ocasionado pouca ou nenhuma redução de função frente ao fungo *D. flagrans*. Este biotivo é um isômero do carvacrol, e supõe-se que os mesmos atuam seguindo o mesmo princípio, ocasionando danos à cutícula e ao aparelho digestivo em larvas (STRBAC *et al.*, 2022a). Os resultados sugerem que os mecanismos de ação do timol e do fungo predador complementaram-se, conseguindo desta forma preda significativamente os ovos e as larvas presentes nas amostras fecais, conseguindo desta maneira interromper o ciclo de vida do nematódeo.

Tendo em vista os resultados expostos, nota-se que os compostos isolados carvacrol, eugenol, nerolidol e timol tem como característica em comum serem lipofílicos o que lhes promove uma maior permeabilidade cuticular (GOMES *et al.*, 2016), o que é devesas importante para desenvolvimento de formulações bem como para potencializar a veiculação de drogas/ fármacos/ constituintes na hipoderme dos nematódeos, a qual é constituída por lipídios, glicogênio e mitocôndrias, e pela camada de fibras musculares (presença de músculos lisos e

segmentares) que localiza-se mais internamente (MONTEIRO 2017), deste modo, nas larvas expostas aos tratamentos é necessário que primeiro ocorra a dissolução da cutícula para que o tratamento penetre nas camadas mais polares da hipoderme, constituídas de proteínas hidrossolúveis. Quanto mais lipossolúvel se apresenta o produto a ser aplicado sobre o nematode, maior será a facilidade inicial que encontrará para penetrar a cutícula.

No que se refere ao experimento *in vivo*, os resultados de ovos por grama de fezes (OPG) nos grupos que receberam o tratamento com a formulação fúngica e no qual foi administrado o tratamento de eleição utilizado na propriedade (Ripercol<sup>®</sup>), a ambos os grupos apresentaram um bom controle, possuindo estimativas negativas na maior parte das coletas efetuadas. Em exames coproparasitológicos realizados antes de outubro quando foi iniciada a administração da formulação fúngica para o grupo tratamento os animais encontraram-se parasitados, foi administrado o anti-helmíntico de acordo as recomendações presentes para uso do Eover<sup>®</sup>, desta forma pode-se inferir que no grupo tratamento o resultado correspondeu ao esperado, tendo em vista, que nas coletas quinzenais realizadas de outubro a novembro a infecção manteve-se baixa, comprovando que não houve reinfecção significativa dos animais com as larvas presentes nas pastagens.

O Eover<sup>®</sup> é ministrado juntamente com a ração ou sal mineral fornecido ao animal, os clamidósporos de *D. flagrans* são resistentes a passagem pelo trato gastrointestinal dos bovinos, mantendo-se assim viáveis após a passagem, estes então são dispersados no ambiente juntamente com as fezes dos bovinos (neste caso os bovinos atuam como veículos para que estes fungos possam se espalhar pelo perímetro), este fungo predador então cresce neste bolo fecal que está no ambiente e em condições adequadas desenvolve seus mecanismos de armadilhas mecânicas e enzimáticas com intuito de predação os nematodes e nutrir-se destes (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Ao predação as larvas, há uma diminuição da reinfecção pois existirão menos larvas infectantes viáveis no solo, desta forma promove-se quebra no ciclo de vida do nematode, inviabilizando a fase de vida parasitária, reduzindo progressivamente a quantidade de nematodes, reduzindo desta forma também o intercuro de patologias ocasionadas por infecções massivas, restaurando o equilíbrio ecológico.

O peso dos animais não manteve uma homogeneidade, considerando que a idade dos animais variou de três a seis meses, em decorrência da viabilidade de alocação dos animais na propriedade (divisão dos piquetes e rotação das pastagens para cada categoria), de toda sorte, a ambos os grupos apresentaram-se parasitados, mas a conversão alimentar varia de acordo a idade do animal, sendo assim correlações de eficácia da formulação fúngica e acréscimos no

ganho de peso não podem ser sugeridos com uma certeza maior, contudo houve um bom desempenho no ganho de peso dos animais do grupo tratado com a formulação fúngica.

Tendo em vista os dados expostos, o emprego do controle biológico contribui para utilização nos programas integrados bem como, aplicado de forma estratégica, auxilia para redução de cepas resistentes aos anti-helmínticos, ajudando a manter a pastagem com baixos índices de contaminação. Além disso, pode-se destacar a redução da dispersão de resíduos tóxicos no ambiente, a redução de custos com controle parasitário, o menor período de carência para abate e retirada de leite bem como um melhor desempenho do rebanho.

## 8 CONCLUSÃO

Os compostos isolados carvacrol, eugenol, nerolidol e timol foram compatíveis com o fungo *D. flagrans*.

A utilização dos compostos isolados carvacrol, eugenol, nerolidol e timol associados ou não a formulação fúngica de *D. flagrans* nas concentrações de 0,5% e 1% apresentou ação antihelmíntica sobre ovos e larvas de nematoides gastrintestinais *in vitro*. Sendo assim são potenciais candidatos ao desenvolvimento de formulações no controle desse parasito.

A utilização do biocomposto eugenol associado ou não a formulação fúngica de *D. flagrans* nas concentrações de 0,5% e 1% é capaz de proporcionar índices de controle sobre larvas de nematoides gastrintestinais *in vitro* e estima-se que seja economicamente viável e mais acessível, tendo em vista a alternativa de produção sintética desse biocomposto.

A utilização do nerolidol associado ou não a formulação fúngica de *D. flagrans* na concentração de 0,5% proporcionou índices de controle sobre larvas em estudo *in vitro* e presume-se que seja um potencial candidato para uso considerando-se sua propriedade lipofílica bem como por sua ampla biodisponibilidade.

No experimento *in vivo* os grupos tratamento e controle, obtiveram baixos índices de ovos por grama de fezes, ambos se mostrando eficazes para conter o desafio imposto pelos nematódeos, entretanto, não se pode estabelecer a correlação ganho de peso *versus* tratamento utilizado.

Portanto, o teste simultâneo de diferentes compostos isolados e suas associações aos métodos de controle biológico pode contribuir para encontrar e selecionar os mais adequados para uma avaliação mais ampla e estudos adicionais, bem como mais estudos *in vivo* devem ser efetuados para identificar particularidades bem como avaliação da relação ganho de peso e utilização da formulação fúngica a base de *D. flagrans*.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados promissores com os compostos isolados carvacrol, eugenol, nerolidol e timol e suas associações com a formulação fúngica à base de *D. flagrans* em diferentes concentrações foram observados no presente trabalho tornando-os candidatos ao desenvolvimento de formulações, fornecendo biomoléculas com propriedades anti-helmínticas, voltadas especialmente para a fase de vida não parasitária do nematódeo, necessitando de estudos mais aprofundados para verificação de potencial uso para fase de vida parasitária, enquadrando-o como potencial método inovador ao uso de formulações sintéticas.

Os resultados obtidos no experimento *in vivo* sugere a eficácia da formulação fúngica de *D. flagrans* sob as condições climáticas de Iguai, localizada na região da bacia do Rio de Contas, Sul do estado da Bahia. Sendo assim sugere-se que seria válido dos mais estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliação de potencial ação dos compostos botânicos, bem como do fungo *D. flagrans* em outras formulações, inclusive formulações associadas a outros componentes isolados e/ou óleos essenciais. Propõe-se ainda que deva ser considerado realização de novos estudos com intuito de avaliar os melhores métodos para administração destas formulações (uso ambiental ou no hospedeiro), o impacto micro e macro que podem ocasionar ao ambiente, os veículos para administração destas formulações, dentre outras questões que corroboram para o melhor entendimento das variáveis que podem afetar a eficácia e viabilidade de uso destas moléculas, bem como realização de mais estudos na aplicação da formulação fúngica *in vivo* em diferentes condições ambientais para averiguar interações deste fungo com diversas variáveis, tal qual estabelecer se há correlação da utilização deste método de controle com ganho de peso.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C. D. F.; CHAGAS, J. D. R.; ÁMLA, L. M.; MARQUES, T. L. P.; MORAES, R. F. F.; GOMES, L. P. M.; ROIER, E. C. R.; BAÊTA, B. A. Diagnóstico e controle químico das helmintoses em bovinos: revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, e4089119908, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.9908>
- AMARAL NETO, L. F. G.; REIS, B. M. E. S.; SIQUEIRA, R. S.; SOUSA, C. C. R. P. M.; ROCHA, F. S. B.; PRAZERES, M. P. C. S.; FONSECA, L. S. Estudo retrospectivo das Helmintoses diagnosticadas em ruminantes baseado em pesquisas realizadas no estado do Maranhão nos últimos 20 anos. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 56557 – 56571, 2021. DOI: [10.34117/bjdv7n6-186](https://doi.org/10.34117/bjdv7n6-186)
- ANDRÉ, W. P. P.; PAIVA JR, J. R.; CAVALCANTE, G. S.; RIBEIRO, W. L. C.; ARAÚJO FILHO, J. V.; CAVALCANTI, B. C.; MORAIS, S. M.; OLIVEIRA, L. M. B.; BEVILAQUA, C. M. L.; ABREU, F. O. M. S. Chitosan Nanoparticles Loaded with Carvacrol and Carvacryl Acetate for Improved Anthelmintic Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 8, p. 1614–1622, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20200047>
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES (ABIEC). **Beef Report 2023 Perfil da Pecuária no Brasil**. 2023. Disponível em <<https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2023/>>. Acesso em 14 de dez. 2023.
- BASSETTO, C. C.; SILVA, M. R. L.; NEULANDS, G. F. J.; SMITH, W. D.; RATTI JÚNIOR, J.; MARTINS, C. L.; AMARANTE, A. F. T. Vaccination of grazing calves with antigens from the intestinal membranes of *Haemonchus contortus*: effects against natural challenge with *Haemonchus placei* and *Haemonchus similis*. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 10, p. 697–702, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.04.010>
- BERGAMO, G. P.; HOLSBACH, V. T. K.; WERLE, C. H. Análise múltipla de vermes fúgos em bovinos de corte. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecia**, v. 3, n. 1, p. 73–80, 2020. Disponível em <<http://www.temascientia.fag.edu.br/index.php/ABMVZAG/issue/view/42>>. Acesso em 4 mai. 2024.
- BRAGA, F. R.; FERRAZ, C. M.; SILVA, E. N.; ARAÚJO, J. V. Eficiência da formulação fúngica Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) no controle in vivo e in vitro de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* em bovinos. **3 Biotech**, v. 10, 2020. DOI: [10.1007/s13205-019-2042-8](https://doi.org/10.1007/s13205-019-2042-8)
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº 35 de 0 de Janeiro de 2020**. 2020. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/acao-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/documentos/MinutaRegulamentoTecnicoProdutosAntiparasitarios.pdf>>. Acesso em 23 jun. 2023.
- CANÇADO, P. H. D.; CATTI, J. B.; SOARES, C. O.; MIRANDA, P. A. B.; SOUZA, T. F.; PIRANDA, E. M. Controle parasitário de bovinos de corte e sistemas de integração. Cap.

35. In: BUNGENSTAB, D. J.; ALMEIDA, R. G. de; LAURA, V. A.; BALBINO, L. C.; FERREIRA, A. D. (Eds.). **ILPF: inovação com integração de lavoura, pecuária e floresta**. Brasília, DF: Embrapa, 2019.

CARMO, T. A.; MENA, M. O.; CIPRIANO, I. A.; FAVARE, G. M.; GUELPA, G. J.; ROMÃO, D. S.; DIAS, Y. S.; HINTO, S. C.; HLHO, C. V. S.; SOUTELLO, R. V. G. Prophylaxis of helminths in cattle in Brazil. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, 2022. DOI: [10.33448/rsd-v11n14.36638](https://doi.org/10.33448/rsd-v11n14.36638).

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações sinérgicas e produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, 2017. Disponível em <http://static.sites.sbq.org.br/rvq.sbq.org.br/pdf/v9n2a09.pdf>. Acesso em 20 mar. 2024

CLAEREBOUT, E.; GELDHOF, P. Helminth Vaccines in Ruminants: From Development to Application. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 36, n. 1, p. 159 – 171, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.10.001>

DINIZ, E. F. C.; MOURA, L. R.; CARVALHO, R. B. F.; NUNES, L. C. C. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA SOBRE COMPLEXO DE INCLUSÃO DO NEROLIDOL COM A  $\beta$ -CICLODEXTRINA. **Cad. Prospec.**, v. 9, n. 3, p. 307 – 315, 2016. DOI: [dx.doi.org/10.9771/S\\_CPROSP.2016.009.033](https://doi.org/10.9771/S_CPROSP.2016.009.033)

ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: A review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, n. 3, p. 233-243, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12033>.

FISSHA, W.; KINDE, M. Z. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, 5403-5410, 2021. DOI: [10.2147/IDR.S332378](https://doi.org/10.2147/IDR.S332378).

FONSECA, B. L.; OLIVEIRA, C. A. A.; OLIVEIRA, G. A.; MARANHÃO, A. C. P. M.; ALVES, L. L. P.; GUIMARÃES, D. S.; CRUZ, R. K. S.; FIMENDEL, M. M. L.; BASTOS, F. J. F.; BASTOS, I. V. M. ESTUDO DA PATOGENIA DAS PRINCIPAIS ENDOPARASITÓSES GASTROINTESTINAIS DE BOVINOS: Revisão de Literatura. Cap. 07. In: FIMENDEL, M. M. L.; BASTOS, I. V. M.; CRUZ, R. K. S.; DIAS, R. V. C.; MEIRELES, C. M. M. O.; OLIVEIRA, C. A. A.; CÂMARA, F. V. (Eds.). **Atualizações em clínica, reprodução e diagnóstico laboratorial de grandes animais** ed. 1. Brazilian Journals, São José dos Pinhais, 2023.

GANDOVA, V.; LAZAROV, A.; HDAN, H.; DIMOV, M.; STANKOV, S.; DENEV, P.; ERCSLI, S.; STOYANOVA, A.; GULEN, H.; ASSOUGUEM, A.; FARAH, A.; ULLAH, R.; KARA, M.; BARI, A. Physicochemical and biological properties of carvacrol. **Open Chemistry**, v. 21, n. 1, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1515/chem-2022-0319>

GOMES, P. R. B.; SILVA, A. L. S.; PINHEIRO, H. A.; CARVALHO, L. L.; IIMA, H. S.; SILVA, E. F.; SILVA, R. P.; LOUZEIRO, C. H.; OLIVEIRA, M. B.; HLHO, V. E. M. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale Roscoe* (gingibre) frente ao mosquito *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Parasitologia Médica**, v. 18, n. 2, p. 597–604, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1590/1983-084X15\\_214](https://doi.org/10.1590/1983-084X15_214)

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific Industrial Research**, v. 12, n. 1, p. 50-52

1939. Disponível em

<<https://publications.csiro.au/rpr/pub?list=BRO&pid=prcite:21259a33-8a8e-4add-9315-f8338091a3e6>>. Acesso em 2 jun. 2023.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção da Pecuária Municipal 2022**. v. 50, p. 1-12, 2023. Disponível em <[https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm\\_2022\\_v50\\_br\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2022_v50_br_informativo.pdf)>. Acesso em 18 fev. 2024.

KATI KI, L. M.; BARBIERI, A. M. E.; ARAUJO, R. C.; VERÍSSIMO, C. J.; LOUVANDI N, H.; FERREIRA, J. F. S. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47–51, 2017. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.06.008

LI, S.; WANG, D.; GONG, J.; ZHANG, Y. Individual and combined application of nematophagous fungi as biological control agents against gastrointestinal nematodes in domestic animals. **Pathogens**, v. 11, p. 172, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11020172

LI MA, W. DOS S. **Dinâmica das populações de nematoides parasitos gastrintestinais e bovinos de corte, alguns aspectos da relação parasito-hospedeiro e do comportamento dos estádios de vida livre na região do Vale do Rio Doce, MG, Brasil**. 1989. 178 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1989.

MAI, A. D.; MATTOS, M. J. T. Nematodeoses gastrintestinais em bovinos no Brasil: revisão de artigos publicados no período de 2012 a 2020. **Revista Agrária Acadêmica**, v. 3, n. 3, p. 296-307, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.32406/v3n32020/296-307/agrariacad>

MARTINS, I. V. F. **Parasitologia Veterinária**. 2 ed. Vitória: EDUFES, 2019.

MEDEIROS, M. L. S.; FREITAS, L. B. N.; PAIVA, K. M. Controle alternativo de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes. Cap. 4. In: BEZERRA, A. C. D. S., SILVA, M. D. C., (Eds.). **Fitoterapia e a Ovinocaprinocultura: uma associação promissora**. Mossoró: EdUFERSA, 2018.

MELO, L. R. B.; SOUSA, L. C.; OLIVEIRA, C. S. M.; ALVARES, F. B. V.; FERREIRA, L. C.; BEZERRA, R. A.; ATHAYDE, A. C. R.; FEITOSA, T. F.; MLELA, V. L. R. Resistance of bovine gastrointestinal nematodes to four classes of anthelmintics in the semi arid region of Paraíba state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária [online]**, v. 30, n. 3, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612021077>.

MENDES, J. P.; TSUZUKI, T. T.; FERREIRA, M. B.; GARCIA, W. R.; VALENTI, M. J. K.; PIETRAMALE, R. T. R. *Haemonchus contortus* e Métodos Estratégicos de Controle para Ovinos. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 24, n. 2, p. 105 – 110, 2020. DOI: 10.17921/1415-6938.2020v24n2p105-110

MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2017.

MOURA, I. A.; PEREIRA, I. S.; PIRES, R. A.; RIBEIRO, O. L.; MONTEIRO, C. M. O.; ROCHA, L. S.; PERINOTTO, W. M. S. First report of *Metarrhizium anisopliae* s.l. action on gastrointestinal ruminant nematodes in the free living stage and its persistence in soil.

**Biocontrol Science and Technology**, v. 33, p. 539, 2023. DOI: 10.1080/09583157.2023.2207789.

NEJAD, S. M.; ÖZGÜNEŞ, H.; BAŞARAN, N. Propriedades farmacológicas e toxicológicas do eugenol. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, p. 201-206, 2017. DOI: 10.4274/tjps.62207.

NEVES, J. H. D. **Diagnóstico de resistência anti-helmíntica em bovinos**. 72p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Botucatu, 2014.

OLI VEIRA, I. C.; MEIRA, I. S.; FREITAS, S. G.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V. *Monacroporium sinense* e *Pochonia chlamydosporia* para o controle biológico de larvas infectantes bovinas em pastagem de *Brachiaria brizantha*. **Controle biológico**, v. 171, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104923>.

OLI VEIRA, L. D. S. S. C. B. de; DIAS, F. G. S.; MELO, A. L. T.; CARVALHO, L. M. de; SILVA, E. N.; ARAÚJO, J. V. Biocontrol of Nematodes in Beef Cattle Raised in the Central-West Region of Brazil. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 548, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens10050548>.

PANDA, S. K.; DAEMEN, M.; SAHOQ, G.; LUYTEN, W. Essential Oils as Novel Anthelmintic Drug Candidates. **Molecules**, v. 27, n. 23, 8327, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27238327>.

PESSOA, L.; MORAIS, S.; BEVILAQUA, C. M.; LUCIANO, J. H. Atividade anti-helmíntica do óleo essencial de *Citrus gratissimum* Linn. e eugenol contra *Hemonchus contortus*. **Parasitologia Veterinária**, v. 109, n. 1-2, p. 59-63, 2002. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00253-4.

POWERS, K. G.; WOOD, J. B.; GIBSON, T.; SMITH, H. J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine and ovine). **Veterinary Parasitology**, v. 10, n. 4, p. 265-284, 1982. DOI: 10.1016/0304-4017(82)90078-4

RAJ, R.; KOHLI, A. A Comprehensive Study on Anthelmintic Activity of Some Herbal Plants and Its Essential Oil. **Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology**, v. 1, n. 5, p. 102-109, 2022. DOI: <https://doi.org/10.55544/jrash.1.5.11>.

RODRIGUES, J. A.; ROQUE, F. L.; ÁLVARES, F. B. V.; SILVA, A. L. P.; IMA, E. F.; SILVA FILHO, G. M.; FEITOSA, T. F.; ARAÚJO, J. V. D.; BRAGA, F. R.; MILELA, V. L. R. Efficacy of a commercial fungal formulation containing *Duddingia flagrans* (Biocontrol) for controlling bovine gastrointestinal nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 30, n. 2, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-29612021025>.

SILVA, J. L.; HESPOLD, C. L.; RIBEIRO, G. B.; FERREIRA, A. K. A. C. V.; SANTANA, V. S.; PEREIRA, I. S.; MOURA, I. A.; FARIAS, L. E. M.; PERINOTTO, W. M. S. CONTROLE BIOLÓGICO DE HELMINTOS EM ANIMAIS DE PRODUÇÃO. Cap 5. In:

FREITAS, G B L (Eds.). **Doenças Infecciosas e parasitárias** ed IX Editora Pasteur, Irati. 2023.

SILVA J. L.; NEVES, G W C; HSPQ C D L; RIBEIRO M O; SILVA F; ARMOUND C; PERINOTTO W M S EFFICIENCY OF ESSENTIAL OILS AND HOMEOPATHIC FORMULATIONS FROM *Syzygium aromaticum* AND *Crotalaria argyrophylla* AGAINST *Rhipicephalus microplus* IN VITRO **Revista Contemporânea**, v. 4, n 6, p 01-19, 2024. DOI: 10.56083/RCV4N6-105.

SILVA W W; DELFINO L J. B; MEDEIROS, M C; SILVA JP. Multiple resistances of gastrointestinal nematodes to anthelmintic groups in cattle of semi arid of Paraíba, Brazil. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 2, p 29, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.22571/actabra12201735>.

ŠTRBAC, F; BOSCO, A; MAURELLI, M P; RATAJAC, R; STOJANOVIĆ, D; SIMIĆ, N; ORČIĆ, D; PUŠIĆ, I.; KRNJAIĆ, S; SOJRAKI, S; SARALI, G; CRINGOLI, G; RINALDI, L. Propriedades anti-helmínticas de óleos essenciais para controlar nematódos gastrointestinais em ovelhas - estudos in vitro e in vivo. **Ciências Veterinárias**, v. 9, n 2, p 93, 2022a. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9020093>

ŠTRBAC, F; KRMAJIĆ, S; STOJANOVIĆ, D; NOVAKOV, N; BOSCO, A; SIMIĆ, N; RATAJAC, R; STANKOVIĆ, S, CRINGOLI, G; RINALDI, L. Botanical Control of Parasites in Veterinary Medicine. In: AGUILAR- MARCELIÑO L; YOUNUS, M; KHAN, A; SAEED, N M; ABBAS R Z (eds), **One Health Triad**, Unique Scientific Publishers, Faisalabad, Pakistan, v. 3, p 215-222, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.47278/book.oh/2023.98>

SZEWIC, M; WAAL, T; ZINTL, A. Biological methods for the control of gastrointestinal nematodes. **The Veterinary Journal**, v. 268, 2021. DOI: 10.1016/j.tvj.2020.105602

TONG, F; GROSS, A D; DOLAN, M C; COATS, J. R. The phenolic monoterpene di-carvacrol inhibits the binding of nicotine to the housefly nicotinic acetylcholine receptor. **Pest Management Science**, v. 69, n 7, p 775–780, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.3443>

UENO, H; GONÇALVES, P. C. Manual para diagnóstico das helmintososes de ruminantes. 4 ed Tokyo: Japan International Cooperation Agency, 1998. 143 p

MEIRA, I. S; OLIVEIRA, I. C; CAMPOS, A K; ARAÚJO, J. V. Controle biológico in vitro de nematódos parasitas bovinos por *Artrobotrys cladodes*, *Duddingtonia flagens* e *Pochonia chlamydosporia* em diferentes condições de temperatura. **Journal of Helminthology**, v. 94, p e194, 2020. DOI: 10.1017/S0022149X20000796

VOINOT, M; CAZAPAL- MONTEIRO, C; HERNÁNDEZ, J. A; PALOMERO, A M; ARROYO, F L; SANCHÍS, J; PEDREIRA, J.; SÁCHEZ – ANDRADE, R; PAZ – SILVA, A; ARIAS, M S. Integrating the control of helminths in dairy cattle: Deworming, rotational grazing and nutritional pellets with parasiticide fungi. **Veterinary Parasitology**, v. 278, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109038>

ZARRIN, M; RAHDAR, M GHOLAM AN. A Biological Control of the Nematode Infective larvae of Trichostrongylidae Family With Filamentous Fungi. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n 3, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5812/jjm17614>