

## Ação ovicida do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Enterobius vermicularis*

### Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Enterobius vermicularis* eggs

RIALA6/1225

Fabio Ribeiro BRAGA\*, André Ricardo e SILVA, Juliana Milani ARAUJO, Sebastião Rodrigo FERREIRA, Jackson Victor de ARAÚJO, Luiza Neme FRASSY

\*Endereço para correspondência: Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. Av. P.H.Rolfs, s/n. CEP 36570-000, Viçosa, MG, Brasil. E-mail: fabioribeirobraga@hotmail.com  
Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.  
Recebido: 29.07.2009 – Aceito para publicação: 28.08.2009

#### RESUMO

A capacidade ovicida de dois isolados do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) sobre ovos de *Enterobius vermicularis* foram analisadas e comparadas em meio agar-água 2% (AA2%). Os ovos de *E. vermicularis* foram vertidos para placas de Petri com AA2% contendo os isolados fúngicos crescidos e em placas de Petri sem fungo como controle. Ao completarem 5 e 10 dias de incubação, cem ovos foram removidos e classificados de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. Os isolados fúngicos eficientes na destruição de ovos de *E. vermicularis*, apresentando o efeito do tipo 3 nos 5 e 10 dias de interação ( $p > 0,01$ ). Foi demonstrada a propriedade dos isolados de *P. chlamydosporia* (VC1 e VC4) em atuar de forma negativa sobre os ovos de *E. vermicularis* e, portanto, ser considerado um potencial candidato como produto a ser utilizado no controle biológico desse nematóide.

**Palavras-chave.** controle biológico, *Enterobius vermicularis*, fungos nematófagos, *Pochonia chlamydosporia*.

#### ABSTRACT

The present study compared the ovicidal capacity of two isolates from nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* (VC1 and VC4) on *Enterobius vermicularis* eggs using 2% water-agar (2% WA). *E. vermicularis* eggs were plated on 2% WA Petri dishes containing cultured fungal isolates, and on control plates without fungi. After incubating for 5 and 10 days, 100 eggs were removed and classified according to the following parameters: type 1, biochemical and physiological effect without eggshell morphological damage; type 2, lytic effect with morphological alteration on eggshell and embryo; and type 3, lytic effect with morphological alteration on both eggshell and embryo, in addition to hyphal penetration and internal egg colonization. The fungal isolates were effective in causing complete damage on *E. vermicularis* eggs showing the type 3 effect at 5 and 10 days after being in contact with fungus ( $p > 0.01$ ). Therefore, the *P. chlamydosporia* (VC1 and VC4) isolates negatively influenced on *E. vermicularis* eggs, and this fungus might be considered a potential candidate for being a biological control of nematodes.

**Key words.** biological control, *Enterobius vermicularis*, nematophagous fungi, *Pochonia chlamydosporia*.

## INTRODUÇÃO

*Enterobius vermicularis*, causador da enterobíase ou oxiuríase, infecção parasitária intestinal cosmopolita, é um nematóide bem frequente em crianças com idade escolar. É um habitante comum da porção terminal do intestino delgado (ceco), onde as fêmeas são fecundadas e, quando grávidas, acumulam cerca de 10.000 ovos em seu interior<sup>1,2</sup>. Uma vez fecundada, a fêmea migra para a região perianal onde deposita seus ovos e em seguida morre dessecada e pela atrofia dos órgãos internos devido a grande dilatação uterina<sup>3</sup>. Os ovos, quando mantidos a temperatura e umidade favoráveis tornam-se infectantes em aproximadamente seis horas e permanecem viáveis por várias semanas. Estes são brancos, transparentes e com dupla membrana. Medem aproximadamente 50 a 60µm de largura por 20 a 30µm de comprimento, são resistentes aos desinfetantes comerciais e podem sobreviver em ambientes domiciliares por duas a três semanas.

Cimerman et al.<sup>4</sup> mencionam que, *E. vermicularis* é o parasito de maior poder de infecção, pois seus ovos necessitam de poucas horas para se tornarem infectantes. O tratamento desta parasitose deve ser estendido a todos os indivíduos que residem em uma mesma residência. Por outro lado, a descontaminação ambiental é outro fator que deve ser levado em consideração juntamente com o tratamento, uma vez que a sua transmissão pode ocorrer pela inalação de poeira mesmo pela ingestão dos ovos do parasito<sup>5,6</sup>.

Nesse contexto, algumas medidas alternativas que possam ser empregadas no combate à disseminação ambiental, deste, e de outros parasitos gastrintestinais e suas formas infectantes são bem vindas<sup>7</sup>. Entre essas medidas está o controle biológico com os fungos nematófagos. Esses fungos são cosmopolitas e inofensivos aos seres humanos e aos animais, são conhecidos como antagonistas de helmintos e algumas espécies podem ser utilizadas como potenciais agentes de controle de ovos de helmintos presentes no ambiente<sup>8</sup>. Dentre esses fungos destaca-se a espécie *P. chlamydosporia* considerada ovicida, pois apresenta colonização interna dos ovos parasitados e por consequência seu rompimento levando a sua destruição<sup>9,10</sup>.

Esse estudo procurou avaliar a atividade ovicida do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *E. vermicularis*.

Os isolados VC1 e VC4 do fungo nematófago *P. chlamydosporia* foram mantidos em tubos de ensaio a 4°C contendo corn-meal-ágar 2% e no escuro durante

10 dias. Esses isolados estavam previamente armazenados no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Após o crescimento, discos de cultura de 4mm de diâmetro foram transferidos para placas de Petri de 9cm diâmetro contendo 20mL de ágar-água 2% (AA 2%) e incubados, à temperatura de 26°C durante 10 dias.

Os ovos de *E. vermicularis* foram conseguidos por meio de doação de um laboratório particular de análises clínicas na região de Viçosa, MG e, analisados morfológicamente quanto a sua integridade ao microscópio óptico em objetiva de 10x.

Os ovos foram vertidos sobre a superfície de placas de Petri contendo o meio AA 2% com os isolados fúngicos crescidos por 10 dias e sem fungo como controle, sendo feitas 10 repetições para cada grupo. Cada placa continha mil ovos de *E. vermicularis* com apenas um dos isolados fúngicos. Ao final de 5 e 10 dias, aproximadamente cem ovos foram retirados de cada placa contendo os isolados do fungo e do controle (sem fungo) de acordo com a técnica descrita por Araújo et al.<sup>11</sup> e foram avaliados em objetiva de 40x de acordo com os parâmetros estabelecidos por Lysek et al.<sup>12</sup>: efeito do tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo; efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião; e efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo. Os dados obtidos do intervalo estudado foram submetidos ao teste não paramétrico de Friedman com 1% de probabilidade.

Os resultados percentuais para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 aos 5 e 10 dias de interação dos isolados do fungo *P. chlamydosporia* com os ovos de *E. vermicularis* estão representados na Tabela 1. A análise dos dados revelou diferença ( $P < 0,05$ ) para os efeitos dos tipos 1, 2 e 3 apresentados por *P. chlamydosporia* em relação ao grupo controle. Por meio da microscopia de óptica, objetiva de 40x, foram observadas estruturas vegetativas (hifas) desse fungo colonizando os ovos de *E. vermicularis* e, posteriormente, o seu rompimento (Figuras 1A; B), e com isso caracterizando o efeito do tipo 3<sup>12,9</sup>.

As espécies de fungos ovicidas têm sido utilizadas com sucesso no controle *in vitro* de ovos de helmintos parasitos gastrintestinais de animais. Contudo, existe uma carência de trabalhos que possam comprovar a eficácia desses fungos sobre ovos de helmintos parasitos

gastrintestinais de seres humanos<sup>8,13</sup>. A literatura tem sugerido que fungos nematófagos ovicidas são potenciais agentes de controle biológico de geohelmintos e, sendo assim, esses fungos têm sido utilizados em condições laboratoriais com sucesso sobre ovos de helmintos<sup>14</sup>.

Braga et al.<sup>8</sup> demonstraram a eficácia de isolados VC1 e VC4 do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides*, nematóide gastrointestinal comum

de seres humanos, nos intervalos de sete, 10 e 14 dias, encontrando percentuais para a atividade ovicida, efeito do tipo 3, acima de 26% ao final do experimento para ambos os isolados testados. Em outro trabalho, Braga et al.<sup>13</sup> demonstraram a ação de *P. chlamydosporia* sobre ovos de *Schistosoma mansoni* registrando resultados percentuais ao final de vinte e um dias para o efeito do tipo 3 de 25,6%.

**Tabela 1.** Percentuais da atividade ovicida do fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (VC1 e VC4) e o grupo controle sem fungos sobre ovos de *Enterobius vermicularis* nos intervalos de cinco e 10 dias de interação.

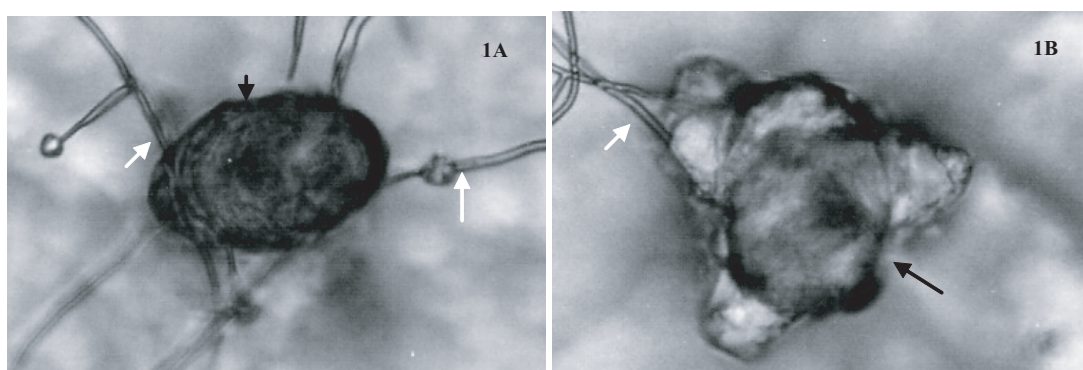
Isolados	Efeito aos cinco dias		
	Efeito do Tipo 1*	Efeito do Tipo 2**	Efeito do Tipo 3***
VC1	37,28 <sup>A</sup> ± 15,0	23,4 <sup>A</sup> ± 8,3	35,0 <sup>A</sup> ± 11,0
VC4	36,0 <sup>A</sup> ± 14,0	25,1 <sup>A</sup> ± 8,4	33,6 <sup>A</sup> ± 11,7
Controle	0 <sup>B</sup> ± 0	0 <sup>B</sup> ± 0	0 <sup>B</sup> ± 0
Isolados	Efeito aos 10 dias		
	Efeito do Tipo 1*	Efeito do Tipo 2**	Efeito do Tipo 3***
VC 1	28,4 <sup>A</sup> ± 16,8	24,9 <sup>A</sup> ± 9,7	40,0 <sup>A</sup> ± 16,2
VC 4	31,9 <sup>A</sup> ± 13,8	25,7 <sup>A</sup> ± 9,8	38,0 <sup>A</sup> ± 11,3
Controle	0 <sup>B</sup> ± 0	0 <sup>B</sup> ± 0	0 <sup>B</sup> ± 0

Percentuais seguidos de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem estatisticamente (P>0,01)-teste de Friedman.

\* Efeito do tipo 1, efeito fisiológico e bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo;

\*\* Efeito do tipo 2, efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião;

\*\*\* Efeito do tipo 3, efeito lítico com alteração morfológica do embrião e da casca, além de penetração de hifas e colonização interna do ovo



**Figura 1.** A - Hifas de *Pochonia chlamydosporia* (seta branca) colonizando o ovo de *Enterobius vermicularis* (seta preta); B - Destruição do ovo do nematóide pelo fungo aos 10 dias de interação (Microscopia óptica com aumento de 40x).

Recentemente, Braga et al.<sup>14</sup> observaram a atividade ovicida de *Paecilomyces lilacinus*, sobre ovos de *Taenia saginata*, com percentuais para o efeito do tipo 3 de 25,5% ao final de 10 dias. Segundo Lysek<sup>9</sup> um fungo é considerado ovicida se apresentar sobre os ovos parasitados o efeito do tipo 3.

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os resultados registrados por Braga et al.<sup>8,13</sup> nota-se semelhança no modo de ação dos isolados VC1 e VC4 do fungo *P. chlamydosporia* sobre ovos de *E. vermicularis*, uma vez que, houve a observação do efeito do tipo 3 de 40,0% e 38,0% respectivamente, ao final de 10 dias. Os autores sugerem que qualquer um dos isolados desse fungo poderia ser utilizado com sucesso na destruição de ovos de helmintos parasitos gastrintestinais. Contudo, segundo O'Hara e Jatala<sup>15</sup> a frequência e o sucesso da penetração em ovos por fungos são aparentemente dependentes da composição da cutícula do ovo e no caso específico de ovos de *E. vermicularis*, que apresenta dupla membrana e são muito resistente, a eficácia de penetração ovicida pode ser dificultada. Por outro lado, a penetração de *P. chlamydosporia* nos ovos desse nematóide foi comprovada no presente trabalho. Esse fungo poderia ser utilizado como uma ferramenta para auxiliar no combate à disseminação ambiental, deste, e de outros parasitos gastrintestinais, uma vez que, pode diminuir a presença dos ovos de helmintos gastrintestinais e por consequência a descontaminação ambiental<sup>7,8,13</sup>.

---

#### AGRADECIMENTOS

À Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro.

---

#### REFERÊNCIAS

1. Lee SC, Hwang KP, Tsai WS, Lin CY, Lee N. Detection of *Enterobius vermicularis* eggs in the submucosa of the transverse colon of a man presenting with colon carcinoma. *Am J Trop Med Hyg*. 2002; 67(5): 546-8.
2. Borquez C, Lobato I, Montalvo MT, Marchant P, Martinez P. Enteroparasitosis in schoolchildren of Illuta valley, Arica, Chile. *Parasitol Latinoam*. 2004; 59(3-4):175-8.
3. Rey L. Bases da Parasitologia Médica 2nd ed. (RJ): Guanabara Koogan, 2001.
4. Cimerman B, Cimerman S. Enterobíase. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais*. 2nd ed (RJ): Atheneu, 2001.
5. Cimerman S, Cimerman B. Enterobiasis. *Rev Panamericana Infectol*. 2005; 7(3):27-30.
6. Botero D, Restrepo M. Parasitosis intestinales por ne-matodos. En: *Parasitosis Humanas*. 3rd ed. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, 1998.
7. Araújo JV, Mota MA, Campos AK. Controle biológico de helmintos parasitos de animais por fungos nematófagos. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2004; 13(1):165-70.
8. Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS. Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007; 40(3):356-8.
9. Lysek H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. *Acta Univ Palack Olomue*. 1976; 76(1):9-13.
10. Fieldler ZA, Sosnowska D. Nematophagous fungus *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson is also a biological agent for control of greenhouse insects and mite pests. *Biol Control*. 2007; 52(4):547-58.
11. Araújo JV, Santos MA, Ferraz S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. *Arq Bras Med Vet Zoot*. 1995; 47(1):37-42.
12. Lysek H, Fassatióvá O, Pineda NC, Hernández N, Lorenzo. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol* 1982; 29(3):265-70.
13. Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, Correa DN, Pereira CAJ. *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. *World J Microb Biotechnol*. 2008; 24(11):2713-16.
14. Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(6): 686-8.
15. O'Hara CM, Jatala P. Ultrastructure of *Meloydogine*, *Globodera* and *Nacobus* eggs shells as related to the activities of biocontrol fungi. *J Nematol*. 1985; 17(1):508.