

# Quitosana fúngica sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos

## *Fungal chitosan on gastrointestinal nematodes larvae of goats*

Francisco Ernesto de Souza Neto<sup>1\*</sup>, Hebert Christian de Azevedo Silva<sup>1</sup>, Wesley de Souza Paiva<sup>1</sup>, Taffarel Melo Torres<sup>1</sup>, Amanda Cristiane Pereira da Rocha<sup>1</sup>, Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra<sup>1</sup>, Anabelle Camarotti de Lima Batista<sup>1</sup>

**RESUMO:** A caprinocultura é representada por um efetivo bastante considerável no Nordeste brasileiro, porém, infecções causadas por nematoides e o sério problema da resistência parasitária se tornaram barreiras para a criação desses animais. Como alternativa, o controle com bioprodutos entra como uma solução sustentável e viável para auxiliar na criação da região. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a atuação da quitosana fúngica sobre o desenvolvimento larval de nematoides gastrintestinais em amostras de caprinos naturalmente infectados. Para tanto, foi realizada a seleção de 5 propriedades e confirmada a positividade do rebanho, além de coproculturas com solução de quitosana a 0,5; 1,0 e 1,5%, com cada tratamento realizado em 5 repetições. As larvas de terceiro estágio (L3) foram recuperadas e cem larvas por tratamento foram contabilizadas e identificadas. Os gêneros identificados foram *Haemonchus*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*. Na análise da inibição do desenvolvimento larval, a concentração de 1,0% impediu o desenvolvimento larval do *Haemonchus* em 35%, porém, os resultados não tiveram diferença estatística significativa. Assim, sugere-se buscar novas concentrações de quitosana fúngica como anti-helmíntico, visto que se apresenta como uma alternativa promissora no controle sustentável desses endoparasitos.

**PALAVRAS-CHAVE:** atividade larvicida; anti-helmínticos naturais; infecção parasitária.

**ABSTRACT:** The goat is represented by a very considerable effective in the Northeastern Brazil, but infections caused by nematodes and the serious problem of parasitic resistance have become barriers to breed these animals. Alternatively, the control with bioproducts comes as a sustainable and viable solution to help breeding in this region. In this context, the present study evaluated the performance of fungal chitosan on the larval development of gastrointestinal nematodes in naturally infected goat samples. Therefore, the selection was performed at five properties. The positive herd was confirmed, and coprocultures were performed with chitosan solution 0.5, 1.0 and 1.5%, with each treatment performed in 5 replicates. The third-stage larvae (L3) were recovered and one hundred larvae/treatment were counted and identified. The identified genera were *Haemonchus*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum* and *Trichostrongylus*. In the analysis of inhibition of larval development, the concentration of 1.0% prevented the development of larval *Haemonchus* by 35%, but the results were not statistically significant. Thus, it is suggested to seek new concentrations of fungal chitosan as anthelmintic, since it appears as a promising alternative to sustainable control of these endoparasites.

**KEYWORDS:** larvicidal activity; natural anthelmintics; parasitic infection.

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Animais. Universidade Federal Rural do Semi-Árido – Mossoró (RN), Brasil.

\*Autor correspondente: fernestosh@gmail.com

Recebido em: 19/06/2015. Aceito em: 06/10/2016

O agronegócio brasileiro vem ganhando ênfase no setor econômico do país por conta da obtenção de resultados comercialmente satisfatórios com destaque para a caprinocultura, ramo comercial em que a região nordeste concentra o maior rebanho, representando 90% do total nacional (PPM-IBGE, 2011). No entanto, a contaminação dos pequenos ruminantes por nematoides gastrintestinais interfere diretamente na sanidade do rebanho, ocasionando prejuízos para os produtores (PINHEIRO *et al.*, 2000). Tal fato é agravado pelo uso intensivo de antiparasitários químicos, auxiliando no surgimento da resistência parasitária (MELO *et al.*, 2003).

Nesse contexto, novas alternativas para o controle de nematoides estão sendo estudadas com resultados satisfatórios na obtenção de percentuais de redução efetivos nos casos de inibição *in vitro* da eclosão dos ovos (FARIAS *et al.*, 2010; MACEDO *et al.*, 2011; FUJIMOTO *et al.*, 2012). Entre essas alternativas, a utilização de fungos se tornou promissora, em razão de sua capacidade de capturar, fixar e penetrar os nematoides, destruindo seus órgãos internos (ALVES *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2007). Provavelmente, essa atividade antiparasitária está relacionada à presença do copolímero quitina na parede celular dos fungos e leveduras (BATISTA *et al.*, 2011).

Como exemplo da aplicação de fungos como agentes antiparasitários, a utilização da espécie *Monacrosporium thaumasium* em doses semanais de 2,0 a 2,5 g foi eficiente no controle de nematoides gastrintestinais de caprinos em regiões semiáridas, tornando o tratamento com anti-helmínticos desnecessário (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Com a quitina, por meio da desacetilação com álcalis ou enzimas, é obtido outro copolímero, a quitosana, um copolímero que, assim como a quitina, apresenta em suas unidades resíduos de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucose (glucosamina) e resíduos de amino-2-desoxi-D-glicose (N-acetilglucosamina) (ARANAZ *et al.*, 2010). A quitosana também pode estar naturalmente na parede celular de alguns fungos, especialmente aqueles pertencentes à classe dos Zygomycetes (KAFETZOULOS *et al.*, 1993).

Dessa forma, com a manipulação e possíveis utilidades em crescimento ascendente desse polímero no campo do conhecimento da agricultura (BERGER *et al.*, 2011) e pecuária, o presente trabalho avaliou o efeito da aplicação da quitosana fúngica sobre larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos naturalmente infectados, a fim de prospectar bioprodutos alternativos relacionados ao controle das endoparasitoses em pequenos ruminantes.

O fungo extraído do solo *Cunninghamella elegans* foi inoculado em meio ágar extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) (10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona bacteriológica, 20 g de glicose e 1.000 mL de água destilada) a 28°C por 7 dias.

Após o cultivo fúngico, foi iniciado o processo de extração de quitosana. Os esporos foram coletados e armazenados em 15 mL de água destilada esterilizada (solução esporica), e  $10^5$  esporos/mL da solução esporica foram adicionados em meio líquido YPD para crescimento da biomassa fúngica a 28°C por 96 horas. Ao término dos 4 dias de agitação, a biomassa foi filtrada, seca em estufa a 60°C, macerada em cadinho visando ao aumento da superfície de contato, característica necessária nas próximas etapas, e pesada em balança analítica. Em seguida, a biomassa foi tratada na proporção de 1:40 (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH) a 1M, e foi colocada em autoclave a 121°C por 15 minutos. Após essa fase, foram realizados ciclos de centrifugações de 15 minutos a 4.000 rpm, até atingir pH 7,0, sendo descartado o sobrenadante a cada ciclo.

Na última etapa da extração da quitosana, foi feita a precipitação em ácido acético 1%, na proporção de 1:100 (m/v). Essa solução foi colocada em autoclave no modo vapor fluente a 100°C por 15 minutos, seguido por uma única centrifugação a 4.000 rpm por 15 minutos. Ao final da centrifugação, pôde-se perceber a separação da quitina (precipitado) e da quitosana (sobrenadante). O sobrenadante foi ajustado para pH 10 e deixado *overnight* a aproximadamente 4°C em geladeira, levando a uma formação da nuvem de quitosana. Por fim, centrifugado a 4.000 rpm, sendo o precipitado coletado, liofilizado e guardado em ambiente com umidade regulada (HU *et al.*, 1999).

Foram selecionadas aleatoriamente cinco propriedades rurais para coleta das amostras fecais. Para seleção dos animais, os critérios adotados foram: o diagnóstico positivo para parasitas gastrintestinais pela contagem do número de ovos por grama de fezes e ausência de tratamento anti-helmíntico por um período mínimo e antecedente de 3 meses (90 dias).

Após confirmação da positividade pelo teste do número de ovos por grama de fezes (GORDON; WHITLOCH, 1939; CHAGAS *et al.*, 2011), as amostras fecais foram acondicionadas em *pool*, trituradas e homogeneizadas para retirada de 2 g de fezes e acréscimo de 2 mL da quitosana diluída, sendo a metodologia modificada daquela descrita por BATATINHA *et al.* (2011) com o acréscimo da quitosana.

As coproculturas por tratamento foram realizadas em cinco repetições e associadas a três controles, tendo como positivo o tiabendazol e negativo a água destilada e o ácido acético. As coproculturas foram feitas de acordo com a técnica proposta por UENO; GONÇALVES (1995). Após sete dias, as larvas de terceiro estágio foram extraídas e cem larvas contabilizadas e identificadas de acordo com identificação de UENO; GONÇALVES (1995).

A normalidade dos dados foi analisada aplicando-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, e as diferenças entre os grupos foram verificadas utilizando-se ANOVA com teste t de Tukey, considerando o nível de significância igual a 0,05.

Averiguaram-se todos os dados com o auxílio do programa PAST (HAMMER; HARPER, 2012).

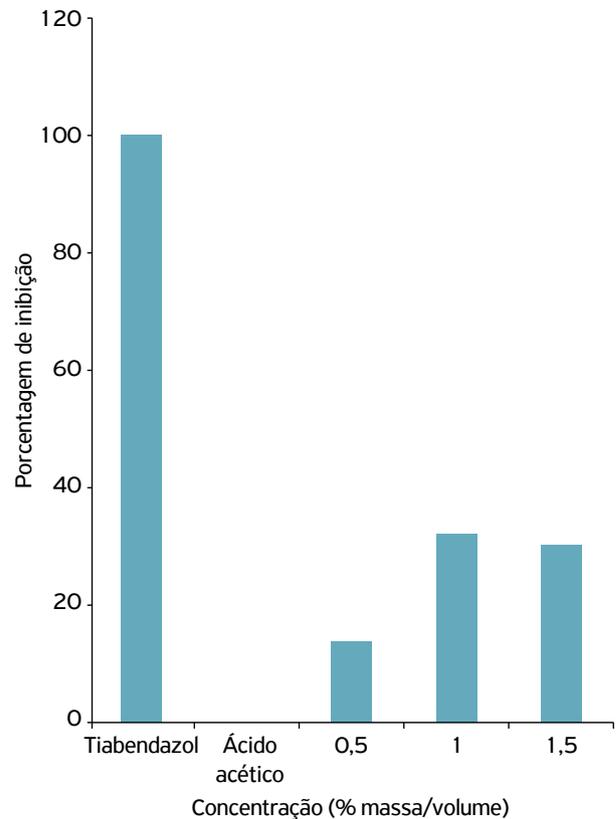
Os gêneros identificados foram: *Haemonchus*, *Strongyloides*, *Oesophagostomum* e *Trichostrongylus*, considerados os principais gêneros de parasitas gastrintestinais que infectam criações caprinas na região. A presença constante desses gêneros perdurando durante o ano agravam as doenças gastrintestinais (COSTA *et al.*, 2011). Apesar da disponibilidade comercial de uma variedade de medicamentos anti-helmínticos, os nematoides continuam a ser um dos maiores fatores limitantes para a produção (PERRY; RANDOLPH, 1999), por conta principalmente do agravamento da resistência anti-helmíntica relatada em vários países do mundo (PRICHARD *et al.*, 1980; PRICHARD, 1990; COLES, 2005).

Analisando os gráficos gerados com base nos resultados estatísticos, estes sem diferença significativa, podemos perceber uma pequena eficácia na inibição do gênero *Haemonchus*. Ação similar foi observada em nematoides de solo; a eficácia da quitosana contra larvas foi comprovada na redução do nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* na fase L2 em 69,87%, quando comparada ao controle positivo, que reduziu em 86,84% (RADWAN *et al.*, 2012).

Analisando biologicamente as concentrações por gênero, *Haemonchus* apresentou menor desenvolvimento na concentração de 1,0%, na qual foi vista porcentagem de inibição de 35%, enquanto a 0,5% e 1,5% os valores ficaram entre 16% e 31%, respectivamente (Fig. 1). Visto que o gênero *Haemonchus* é tido como o maior patógeno do abomaso dos pequenos ruminantes (O'CONNOR *et al.*, 2006), a descoberta de que fungos podem inibir o seu desenvolvimento pode ser visualizada como alternativa biológica ao controle natural desse gênero.

No gênero *Trichostrongylus* foram observadas porcentagens inibitórias de 11, 9 e 8% para concentrações de quitosana a 0,5, 1,0 e 1,5%, respectivamente. Esses valores sinalizam indícios insatisfatórios para a quitosana testada nessas concentrações, pois a porcentagem de inibição ficou em torno de 10%, concentração indicada para controle negativo em testes com bioprodutos (CHAGAS *et al.*, 2011). *Trichostrongylus* é um gênero que vem ganhando importância, em razão da sua resistência parasitária, principalmente a benzamidazóis, lactonas macrocíclicas e imidazóis (LE JAMBRE *et al.*, 2005). Os sintomas causados pela sua ação são bastante severos ao animal, tornando sua inibição um importante objetivo a ser alcançado (AL-ROFFAI *et al.*, 2012; MORENO-GONZALO *et al.*, 2013).

Os dados do gênero *Oesophagostomum* demonstraram valor inibitório para as concentrações 0,5; 1,0 e 1,5% de quitosana com inibição de 10, 8 e 10%, respectivamente, considerado insatisfatório. Mesmo sendo um gênero com baixa incidência, *Oesophagostomum* apresenta resistência a drogas químicas. Assim, a importância da busca de alternativas viáveis para a inibição desses gêneros é imprescindível



**Figura 1.** Teste de inibição do desenvolvimento larval *in vitro* em amostras de caprinos naturalmente infectados utilizando quitosana fúngica em *Haemonchus*, principal gênero infectante gastrintestinal de caprinos.

para a diminuição das perdas de rebanhos de caprinos (LIMA *et al.*, 2010).

No caso do gênero *Strongyloides*, a porcentagem de inibição para as concentrações da solução de quitosana foi de 0%, 2% e 1% nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 1,5%, nessa ordem. A espécie *Strongyloides papillosus* é de grande preocupação pelo fato de uma de suas vias de transmissão ser a transmamária (SOULSBY, 1971; ANDRADE *et al.*, 2013). Os resultados de ANDRADE *et al.* (2013) comprovaram a importância desse parasita como um agente preocupante de surtos epidemiológicos, destacando a relevância de novos estudos com dosagens apropriadas à inibição no desenvolvimento dessas larvas.

Com esses resultados, podemos salientar a importância de mais estudos com fungos e seus bioprodutos sobre nematoides gastrintestinais de caprinos, principalmente o gênero *Haemonchus*. Além disso, a ação da quitosana fúngica com esse gênero demonstrou, mesmo sem diferença estatística significativa, eficácia visível. Dessa forma, ratifica-se a importância do surgimento de novos estudos para auxiliar no controle sanitário desses rebanhos, buscando sempre a substituição de fármacos sintéticos e residuais por produtos biológicos e biodegradáveis.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, P.H.; ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; ASSIS, R.C.L.; SARTI, P.; CAMPOS, A.K. Aplicação de formulação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) no controle de nematóides de bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, p.568-573, 2003.
- AL-ROFAAI, A.; RAHMAN, W.A.; SULAIMAN, S.F.; YAHAYA, Z.S. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of methanolic leaf extract of *Manihot esculenta* (cassava) on susceptible and resistant strains of *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology*, v.1, p.127-135, 2012.
- ANDRADE, F.D.; SILVA, W.W.; OLINTO, F.A. Transmissão transmamária de larvas de *Strongyloide papillosus* (Nematoda: Rhabditidae) em vacas leiteiras no semiárido paraibano. *Agropecuária Científica no Semiárido*, v.9, p.57-61, 2013.
- ARANAZ, I.; HARRIS, R.; HERAS A. Chitosan Amphiphilic Derivatives. Chemistry and Applications. *Current Organic Chemistry*, v.14, p.308-330, 2010.
- ARAÚJO, J.V.; FREITAS, B.W.; VIEIRA, T.C.; CAMPOS, A.K. Avaliação do fungo predador de nematóides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de *Haemonchus contortus* e *Strongyloides papillosus* de caprinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.15, p.76-79, 2006.
- ARAÚJO, J.V.; GUIMARÃES, M.P.; CAMPOS, A.K.; SÁ, N.C.; SARTI, P.; ASSIS, C.L. Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural*, v.34, p.457-463, 2004.
- ARAÚJO, J.V.; RODRIGUES, M.L.A.; SILVA, W.W.; VIEIRA, L.S. Controle biológico de nematóides gastrintestinais de caprinos em clima semi-árido pelo fungo *Monacrosporium thaumasium*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.1177-1181, 2007.
- BATATINHA, M.J.M.; ALMEIDA, G.N.; DOMINGUES, L.F.; SIMAS, M.M.S.; BOTURA, M.A.; DA CRUZ, A.C.F.G.; ALMEIDA, M.A.O. Efeitos dos extratos aquoso e metanólico de algaroba sobre culturas de larvas de nematódeos gastrintestinais de caprinos. *Ciência Animal Brasileira*, v.12, p.514-519, 2011.
- BATISTA, A.C.L.; DANTAS, G.C.; SANTOS, J.; AMORIM, R.V.S. Antimicrobial effects of native chitosan against opportunistic gram-negative bacteria. *Microbiology Journal*, v.1, n.3, p.105-112, 2011.
- BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, v.12, p.195-215, 2011.
- COLES, G.C. Anthelmintic resistance — looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary Science*, v.78, p.99-108, 2005.
- COSTA, V.M.M.; SIMÕES, S.V.D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, p.65-71, 2011.
- CHAGAS, A.C.S.; NICIURA, S.C.M.; MOLENTO, M.B. Manual prático: metodologia de diagnóstico da resistência e de detecção de substâncias ativas em parasitas de ruminantes. Brasília: EMBRAPA, 2011. 153p.
- FARIAS, M.P.O.; TEIXERA, W.C.; WANDERLEY, A.G.; ALVES, L.C.; FAUSTINO, M.A.G. Avaliação *in vitro* dos efeitos do óleo da semente de *Carapa guianensis* Aubl. sobre larvas de nematóides gastrintestinais de caprinos e ovinos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.12, p.220-226, 2010.
- FUJIMOTO, R.Y.; COSTA, H.C.; RAMOS, F.M. Controle alternativo de helmintos de *Astyanax cf. zonatus* utilizando fitoterapia com sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) e mamão (*Carica papaya*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p.5-10, 2012.
- GORDON, H.M.; WHITLOCK, H.V. A new technique for counting nematode eggs insheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*, v.12, p.50-52, 1939.
- HU, K.-J.; YEUNG, K.W.; HO, K.P.; HU, J.L. Rapid extraction of high-quality chitosan from mycelia of *absidia glauca*. *Journal of Food Biochemistry*, v.23, p.187-196, 1999.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da Pecuária Municipal*. v.39, p.1-63, 2011.
- KAFETZOPOULOS, D.; MARTINOV, A.; BOURIOTIS, V. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90, p.2564-2568, 1993.
- LE JAMBRE, L.F.; GEOGHEGAN, J.; LYNDAL-MURPHY, M. Characterization of moxidectin resistant *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, v.128, p.83-90, 2005.
- LIMA, W.C.; ATHAYDE, A.C.R.; MEDEIROS, G.R.; LIMA, D.A.S.D.; BORBUREMA, J.B.; SANTOS, E.M.; VILELA, V.L.R.; AZEVEDO, S.S. Nematoides resistentes a alguns anti-helmínticos em rebanhos caprinos no Cariri Paraibano. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, p.1003-1009, 2010.
- MACEDO, I.T.F.; BEVILAQUA, C.M.L.; OLIVEIRA, L.M.B.; CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.; VIEIRA, L.S.; AMÓRA, S.S.A. Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.20, p.223-227, 2011.
- MELO, L.M.; BEVILAQUA, C.M.L.; ARAÚJO, J.V.; MELO, A.C.F.L. Passagem do fungo *Monacrosporium thaumasium* através do trato gastrointestinal de caprinos e atividade predatória contra *Haemonchus contortus*. *Ciência Rural*, v.33, p.169-71, 2003.
- MORENO-GONZALO, J.; MANOLARAKI, F.; FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; CELAYA, R.; OSORO, K.; ORTEGA-MORA, L.M.; HOSTE, H.; FERRE, I. *In vitro* effect of heather extracts on *Trichostrongylus colubriformis* eggs, larvae and adults. *Veterinary Parasitology*, v.197, p.586-594, 2013.

O'CONNOR, L.J.; WALKDEN-BROWN, S.W.; KAHN, L.P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, v.142, p.1-15, 2006.

PERRY, B.D.; RANDOLPH, T.F. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. *Veterinary Parasitology*, v.84, p.145-168, 1999.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ALVES, F.S.F.; HADDAD, J.P.A. Aspectos epidemiológicos da caprinocultura cearense. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, p.20-22, 2000.

PRICHARD, R.K. Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. *International Journal for Parasitology*, v.20, p.515-523, 1990.

PRICHARD, R.K.; HALL, C.A.; KELLY, J.D.; MARTIN, I.C.; DONALD, A.D. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, v.56, p.239-251, 1980.

RADWAN, M.A.; FARRAG, S.A.A.; ABU-ELAMAYEM, M.M.; AHMED, N.S. Extraction, characterization, and nematicidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. *Biology and Fertility of Soils*, v.48, p.463-468, 2012.

SOULSBY, E.J.L. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Londres: Baillière, Tindall and Cassel, 1971. 824p.

UENO, H.; GONÇALVES, P.C. Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes. *International Cooperation Agency*, p.143, 1998.