



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA ANIMAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NA PREDACÃO
DE LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE ASININOS
SUBMETIDOS A DIFERENTES PERÍODOS DE ESTOCAGEM, SOB BAIXA
TEMPERATURAS**

PAULO WBIRATAN LOPES DA COSTA

**PATOS - PB
2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA ANIMAL
CAMPUS DE PATOS-PB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE FUNGOS NEMATÓFAGOS NA PREDÇÃO
DE LARVAS DE NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS DE ASININOS
SUBMETIDOS A DIFERENTES PERÍODOS DE ESTOCAGEM, SOB BAIXA
TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Mestrando: Paulo Wbiratan Lopes da Costa
Orientador: Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela
Co-orientadora: Profa. Dra. Thais Ferreira Feitosa

**PATOS - PB
2019**

C837a Costa, Paulo Wbiratan Lopes da.
Avaliação da eficácia de fungos nematófagos na predação de larvas de nematódeos gastrintestinais de asininos submetidos a diferentes períodos de estocagem, sob baixa temperatura / Paulo Wbiratan Lopes da Costa. – Patos, 2019.
62 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2019.
"Orientação: Prof. Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela; Coorientação: Prof.^a Dr.^a Thais Ferreira Feitosa".
Referências.

1. Duddingtonia flagrans. 2. Monacrosporium thaumasium. 3. Estocagem. I. Vilela, Vinícius Longo Ribeiro. II. Feitosa, Thais Ferreira. III. Título.

CDU 582.28(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: "Avaliação da eficácia de fungos nematófagos na predação de larvas nematódeos gastrintestinais de asininos submetidos a diferentes períodos de estocagem, sob baixas temperaturas"


AUTOR: Paulo Wbiratan Lopes da Costa

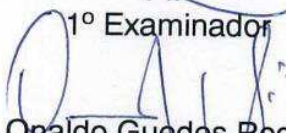
ORIENTADOR: Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela

JULGAMENTO


CONCEITO: APROVADO


Dr. Vinícius Longo Ribeiro Vilela
DES-SS/IFPB
Presidente


Dra. Vanessa Diniz Vieira
FIP
1º Examinador


Dr. Onaldo Guedes Rodrigues
UACB/UFCA
2º Examinador

Patos - PB, 27 de fevereiro de 2019


Prof. Dr. José Fábio Paulino de Moura
Coordenador
Coordenador PPGCA/CSTR/UFCA
Mat. SIAPE1506999

A Deus pela proteção e bênçãos.

À minha família por toda base nessa jornada.

Em especial à minha filha Clara, minha mãe

Wilza, minha avó Francisca.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Deus, fonte de sabedoria, protetor, obrigado pela vida!

A amada filha, Clara Amaral Lopes, por ser uma criança linda e abençoada. Toda a minha ausência foi batalhando para proporcionar-lhe um futuro melhor.

A minha Mãe, Wilza Lopes, “guerreira”, dedico mais uma vitória!

A minha Avó, Francisca Lopes, exemplo de ser humano, gratidão!

A minha Irmã, Magaly, que amo muito! Às minhas primas-irmãs Willianny e Thiciane, e ao primo Felipe.

As minhas Tias e Tios, Ubiratânia, Martha, Maria, Willians, Ubirajara e Jânio, vocês foram fonte de apoio, garra, audácia e sabedoria.

Ao orientador professor Dr. Vinicius Longo Vilela e professora Dra. Thais Ferreira Feitosa, pela paciência, conselhos, pela oportunidade de trabalhar com vocês, minha gratidão e respeito. A Livinha e Larinha que sempre proporciona o melhor sorriso.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, em especial o Prof. Dr. José Fábio e o secretário Ari, por sempre estarem presentes nessa caminhada. E aos professores Dr. Onaldo Guedes e Dra. Vanessa Diniz Vieira pela disponibilidade.

A meus amigos e irmãos Roberto Alves e Jurema Kelly, que sempre estiveram prontos a me ajudar, ouvir e aconselhar, sendo essenciais para continuar forte na batalha.

Todos os companheiros do Laboratório de Parasitologia Veterinária, em especial Felipe Bondiej, Wlysses Sarmiento, Francisca Flávia, Jossiara Abrantes, que não mediram esforços para ajudar na execução do projeto.

Aos meus amigos Compadre Segundo (Francisco Alípio), Edla Íris, Aldcejam Martins, Morgana Cavalcanti, Luís Fernando, que mesmo em caminhos diferentes estivemos sempre juntos, presentes desde a graduação.

Aos companheiros de batalha e de casa Lídio Ricardo e Gian Libâneo.

A todos que de alguma forma contribuíram para construção e execução de meu trabalho, o meu fraterno obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE ABREVIATURAS	Vi
RESUMO	Vii
ABSTRACT	Viii
INTRODUÇÃO	09
REFERÊNCIAS	11

CAPÍTULO I 13

RESUMO	14
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	17
Material e Métodos	18
Fungos e produção de massa micelial	18
Ensaio experimental	18
Ensaio A	19
Ensaio B	20
Análises estatísticas	20
RESULTADOS	20
DISCUSSÃO	22
CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

CAPÍTULO II 29

RESUMO	30
ABSTRACT	31
COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA	31
REFERÊNCIAS	36

CONCLUSÃO GERAL	38
ANEXOS	39
ANEXO I	40
ANEXO II	55

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

- Figura 1.** Total de larvas infectantes recuperadas e porcentagem de redução de larval de nematódeos gastrintestinais de asininos no Ensaio A, utilizando *D. flagrans*. GI – cinco anos; GII – dois anos; GIII – recém-produzidos. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente no teste de Tukey a 1% de probabilidade 20
- Figura 2.** Quantidade de larvas infectantes recuperadas das copoculturas pelo aparelho de Baermann e percentual de redução larval entre grupos tratados com fungos *D. flagrans* em intervalos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h 21

ARTIGO II

- Figura 1.** Total de larvas infectantes recuperadas e porcentagem de redução de larval de nematódeos gastrintestinais de asininos no Ensaio A, utilizando *M. thaumasium*. GI – cinco anos; GII – dois anos; GIII – recém-produzidos. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente no teste de Tukey a 1% de probabilidade 34
- Figura 2.** Quantidade de larvas infectantes recuperadas das copoculturas pelo aparelho de Baermann e percentual de redução larval entre grupos tratados com fungos *M. thaumasium* em intervalos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h 35

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Celcius

AA – Ágar água

BOD – Demanda Química de Oxigênio

Ca⁺⁺ - Cálcio

Cm - centímetro

IFPB – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba

Kg - Quilo

ml - milímetro

L3 – Larvas infectantes

LPV – Laboratório de Parasitologia Veterinária

OPG – Contagem de Ovos Por Grama de fezes

Ph – Potencial hidrogênico

RESUMO

Objetivou-se avaliar a eficácia de formulações peletizadas em matriz de alginato de sódio de *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* armazenados por dois e cinco anos, em temperatura entre 2° a 8°C, sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrointestinal de asininos. Foram coletadas amostras de fezes de 64 asininos, para realização da contagem de Ovos Por Grama de fezes (OPG). Os asininos foram divididos em grupos, cada grupo contendo oito animais, cada animal recebeu dosagem única de 100g (20% de micélio fúngico) de péletes juntamente com ração comercial para facilitar a ingestão. No experimento com formulações de *D. flagrans*, os grupos foram divididos da seguinte forma: GI - receberam péletes de *D. flagrans* estocados por cinco anos; GII- receberam péletes de *D. flagrans* estocados por dois anos; GIII – receberam péletes de *D. flagrans* recém-produzidos; e Controle - receberam péletes sem fungos nematófagos. No experimento com formulações de *M. thaumasium* foram divididos: GI - receberam péletes de *M. thaumasium* estocados por cinco anos; GII - receberam péletes de *M. thaumasium* estocados por dois anos; GIII - receberam péletes de *M. thaumasium* estocados recém-produzidos; e Controle - receberam péletes sem fungos nematófagos. Observou-se que após passagem dos péletes contendo *D. flagrans* (ACOO1) e *M. thaumasium* pelo trato gastrointestinal dos asininos, independente do tempo de estocagem dos péletes, houve redução larval significativa ($p < 0,01$) até o intervalo de 72 horas nos ensaios A e B. Formulações contendo *D. flagrans*, apresentaram redução larval de até 97% e formulações contendo *M. thaumasium* redução larval de até 93.6%. Concluiu-se que o uso de péletes em matriz de alginato de sódio contendo *D. flagrans* e *M. thaumasium* armazenados até cinco anos foram efetivos sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrointestinal de asininos.

Palavras-chave: *Duddingtonia flagrans*; *Monacrosporium thaumasium*; estocagem;

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficacy of pelleted formulations of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* sodium alginate, stored for two and five years, at temperatures between 2° and 8° C, on the predation of nematode infecting larvae after passage of the treatment gastrointestinal tract. Faecal samples were collected from 64 asininos for the counting of eggs per gram of feces (OPG). Asininos were divided into groups, each group containing eight animals, each animal received a single dose of 100g (20% fungal mycelium) of pellets along with commercial feed to facilitate ingestion. In the experiment with formulations of *D. flagrans*, the groups were divided as follows: GI - received *D. flagrans* pellets stored for five years; GII- received pellets of *D. flagrans* stored for two years; GIII - received newly produced *D. flagrans* pellets; and Control - received pellets without nematophagous fungi. In the experiment with formulations of *M. thaumasium* were divided: GI - received pellets of *M. thaumasium* stored for five years; GII - received pellets of *M. thaumasium* stored for two years; GIII - received pellets of *M. thaumasium* stored in newly produced pellets; and Control - received pellets without nematophagous fungi. It was observed that after passage of the pellets containing *D. flagrans* (ACOO1) and *M. thaumasium* by the gastrointestinal tract of the asinines, regardless of pellet storage time, there was a significant larval reduction ($p < 0.01$) up to 72 hours in assays A and B. Formulations containing *D. flagrans* showed larval reduction of up to 97% and formulations containing *M. thaumasium* larval reduction of up to 93.6%. It was concluded that the use of sodium alginate pellets containing *D. flagrans* and *M. thaumasium* stored up to five years were effective on the predation of infective nematode larvae after passage of the gastrointestinal tract of asinines.

Keywords: *Duddingtonia flagrans*; *Monacrosporium thaumasium*; storage;

INTRODUÇÃO

Vários prejuízos nos rebanhos equídeos são observados quando há presença de enfermidades, principalmente quando estão relacionados a problemas parasitários. As doenças parasitárias causam redução no rendimento dos equídeos, uma vez que os nematódeos gastrintestinais entram em competição com os alimentos, causando quadros anêmicos, além disso podem causar irritação, cólicas, hemorragias intestinais, até a morte (MOLENTO, 2005).

O controle de nematódeos, durante muito tempo, ocorria através de uso de produtos químicos nos hospedeiros de maneira indiscriminada, o que acarretou no desenvolvimento de resistência de grande parte dos parasitos aqueles princípios aos quais eram expostos, como também a possibilidade de deixar quantidade considerável de resíduos químicos nos animais e no ambiente (GRAMINHA et al., 2001).

Uma alternativa para reduzir o uso de compostos químicos, é o controle biológico, que utiliza antagonistas naturais disponíveis no ambiente, buscando diminuir ou controlar os nematódeos gastrintestinais. O uso de fungos nematófagos apresenta-se como alternativa promissora para controle biológico de nematoides gastrintestinais de animais domésticos (ARAÚJO et al 2004).

Os fungos nematófagos tem micélio septado e bem desenvolvido, reprodução agamicamente por esporos, classificados na divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales e família Moliniaceae (DRESCHSLER, 1937). Contudo, Griffin (1994) observou estádios de reprodução sexuada em algumas espécies desses fungos, que passaram a pertecer ao filo Ascomycota.

De acordo com Silva et al. (2010), os fungos nematófagos são cosmopolitas, matém as formas saprófitas em solos naturais e na presença de matéria orgânica em decomposição. Já, mediante a presença de ovos e larvas de helmintos realizam atividade predadora. Braga et al (2009), obseravaram que quanto maior a quantidade de nematoides no ambiente, maior será a formação de hifas e de estruturas de capturas produzidas por esses fungos.

Fungos nematófagos *D. flagrans* e *M. thaumasium*, vem sendo bastante estudados e experimentos avaliando formulação peletizada a base de alginato de sódio para predação de nematódeos já foram realizados em condições de campo e em laboratório (ARAÚJO et al., 2004; DIAS et al., 2007, VILELA et al., 2012; SILVA et al., 2018).

Estudos relatam que a viabilidade fúngica após longo período de armazenamento é uma das condições necessárias para que formulações contendo micélio ganhem produção industrial (NALEPINA et al. 1990; CARNEIRO et al. 1996; GARCIA 2007; BRAGA et al. 2011; SILVA et al 2018) De acordo com Mota et al. (2003) a escolha do método de estocagem desses microorganismos é um dos fatores fundamentais para assegurar a viabilidade predatória após longos períodos. Nesta perspectiva, justifica-se este trabalho pelo ineditismo em avaliar a eficácia de formulações peletizadas em matriz de alginato de sódio de *D. flagrans* e *M. thaumasium* estocados por três e cinco anos, sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos.

Por sua vez, este trabalho buscou avaliar a eficácia de formulações peletizadas em matriz de alginato de sódio de *D. flagrans* e *M. thaumasium* armazenados por dois e cinco anos, em temperatura de 2° a 8°C, sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrintestinal de asininos.

Esta dissertação é composta por dois capítulos constituídos por artigos científicos originais. O primeiro, enviado à Experimental Parasitology, descreve Viabilidade predatória de *D. flagrans* em matriz de alginato de sódio armazenados sob refrigeração por até cinco anos sobre nematódeos gastrintestinais de asininos. O segundo, enviado a Revista Semina Ciências Agrárias, descreve a viabilidade predatória do fungo nematofago *M. thaumasium* sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos após estocagem e refrigeração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; & MOTA, M. Atividade 203 in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e 204 *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: 205 *Trichostrongyloidea*) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo. 13: 65-71, 2004.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO J. V.; ARAUJO, J. M.; TAVELA, A. O.; FERREIRA, S. R.; SOARES, F. E. F.; BENJAMIN, L. A.; FRASSY, L. N. Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 460-463, 2011.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.; CARVALHO, R. O.; TAVELA, A. O.; CAMPOS, A. K.; CARVALHO, G. R. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, p. 335-340, 2009.

CARNEIRO, S. M. T. P. G.; SILVA, J. F. V.; CARNEIRO, R. G. Evaluation of four methods on the survival of *Paecilomyces lilacinus* and *Arthrobotrys oligospora*. **Nematologia Brasileira**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 63-67, 1996.

DIAS, A. S.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K.; BRAGA, F.R. Application of a Formulation of the Nematophagous Fungus *Duddingtonia flagrans* in the Control of Cattle Gastrointestinal Nematodiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 10-1007, 2007.

DRECHESLER, C. Some Hyphomycetes that prey on free living terricolos nematode. **Mycologia**, 23: 447 – 552, 1937.

GARCIA, A. M. Sobrevivência e manutenção da Atividade Nematófaga do fungo *Arthrobotrys musiformis* submetido a liofilização. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, p. 1203-1206, 2007.

GRAMINHA, E. B. N.; MAIA, A. S.; SANTOS, J. M.; CÂNDIDO, R. C.; SILVA, G. F.; COSTA, A. J.; Avaliação in vitro da patogenicidade de fungos predadores de nematóides parasitos de animais domésticos. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.22, n.1, p.11-16, jan./jun. 2001.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. New York: Wiley-Liss, 1994.

MOLENTO, M. B. Parasite resistance on helminths of equids and management proposals. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1469-1477, 2005.

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

NALEPINA, L. N.; MATSKEVICH, N. V.; KOZHUKHAR, G. G.; TEPLYAKOVA, T. V. Effect of different methods on viability of nematophagous predatory fungi. **Mykologia I Fitopatologiya**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 312-314, 1990.

SILVA, B. F.; CARRIJO-MAUAD, J. R.; BRAGA, F. R.; CAMPOS, A. K.; ARAÚJO, J. V., AMARANTE, A. F. T. Efficacy of *Duddingtonia flagrans* and *Arthrobotys robusta* in controlling sheep parasitic gastroenteritis. **Parasitology Research**, V. 106, p. 1343 – 1350, 2010.

SILVA, F. F.; COSTA, P. W. L.; BEZERRA, R. A.; SILVA, N. I. S.; SILVA, J. D.; FEITOSA, T. F.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; VILELA, V. L. R. . Influence of storage time of *Monacrosporium thaumasium* pellets on the predation of infective larvae of sheep gastrointestinal nematodes. **ARS VETERINÁRIA** Jaboticabal, 2018.

VILELA, V.L.R.; FEITOSA, T.F.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SOUTO, D.V.O.; SANTOS, H.E.S., ATHAYDE, A.C.R. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the Northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, 188, 127–133. 2012.

CAPÍTULO I

Viabilidade predatória de *Duddingtonia flagrans* em matriz de alginato de sódio armazenados sob refrigeração por até cinco anos sobre nematódeos gastrintestinais de asininos

Manuscrito submetido à
EXPERIMENTAL PARASITOLOGY

Viabilidade predatória de *Duddingtonia flagrans* em matriz de alginato de sódio armazenados sob refrigeração por até cinco anos sobre nematódeos gastrintestinais de asininos

Paulo Wbiratan Lopes da Costa¹; Felipe Bondiej Ventura Alvares²; Roberto Alves Bezerra²; Wlysse Ferreira Sarmiento²; Thais Ferreira Feitosa²; Fabio Ribeiro Braga³; Jackson Victor de Araújo⁴, Vinicius Longo Ribeiro Vilela^{1,2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), CEP: 58.108-110, Patos-PB, Brazil.

² Departamento de Medicina Veterinária, Instituto Federal da Paraíba (IFPB), CEP: 58800-970, Sousa-PB, Brazil.

³ Departamento de Veterinária, Universidade de Vila Velha, CEP: 29.102-920, Vila Velha - ES, Brazil.

⁵ Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36.570-000, Viçosa-MG, Brazil.

* Autor correspondente. Av. Tancredo Neves, s/ n, Jardim Sorrilândia, Sousa, PB, Brazil. CEP: 58800-970. Contato: (083) 99907-3634. E-mail: vinicius.vilela@ifpb.edu.br

RESUMO – Objetivou-se avaliar a eficácia de formulações peletizadas em matriz de alginato de sódio de *D. flagrans* armazenados por dois e cinco anos, sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrintestinal de asininos. O experimento foi desenvolvido na Fazenda Experimental e no Laboratório de Parasitologia Veterinária – LPV do Instituto Federal da Paraíba (IFPB) – Campus Sousa. Foram coletadas fezes de 32 asininos, diretamente da ampola retal e encaminhadas ao LPV, para realização da contagem de Ovos Por Grama de fezes (OPG). Os asininos foram divididos em quatro grupos, cada grupo contendo oito animais, cada animal recebeu dosagem única de 100g (20% de micélio fúngico) de péletes juntamente com ração comercial para facilitar a ingestão: GI - receberam péletes de *D. flagrans*

estocados por cinco anos; GII- receberam péletes de *D. flagrans* estocados por dois anos; GIII – receberam péletes de *D. flagrans* recém-produzidos; e Controle - receberam péletes sem fungos nematófagos. Observou-se que após passagem dos péletes contendo *D. flagrans* (ACOO1) pelo trato gastrintestinal dos asininos, independente do tempo de estocagem dos péletes, houve redução larval significativa ($p < 0,01$) até o intervalo de 72 horas, com redução larval de até 94,7% (GI), 97% (GII) e 96,9 (GIII), em relação ao grupo controle. Concluiu-se que o uso de péletes em matriz de alginato de sódio contendo *D. flagrans* armazenados por dois e cinco anos foram efetivos sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrintestinal de asininos.

Palavras-chave: Controle biológico; estocagem; Fungos nematófagos.

Predatory viability of *Duddingtonia flagrans* in alginate matrix from refrigerated data source for five years on gastrointestinal nematodes of asinines

ABSTRACT - The objective of this study was to evaluate the effectiveness of pelleted formulations in *D. flagrans* sodium alginate matrix stored for three and five years on the predation of infective nematode larvae after passage of the gastrointestinal tract of asinines. The experiment was carried out at the Experimental Farm and at the Laboratory of Veterinary Parasitology - LPV of the Federal Institute of Paraíba (IFPB) - Campus Sousa. Feces were collected from 32 asinines, directly from the rectal ampulla and sent to LPV, to perform the Eggs Per Fecal Grain Count (OPG). Asinines were divided into seven groups, each group containing eight animals, in which each animal received a single dose of 100g (20% fungal mycelium) of pellets along with commercial feed to facilitate ingestion: GI - received *D. flagrans* pellets stored for five years; GII- received pellets of *D. flagrans* stored for two years; GIII - received newly produced *D. flagrans* pellets; and Control - received pellets without nematophagous fungi. It was observed that after pellets containing *D. flagrans* (ACOO1) in the gastrointestinal tract of the asinines, regardless of pellet storage time, there was a significant larval reduction ($p < 0.01$) up to the 72 hour interval, with larval reduction up to 94.7% (GI), 97% (GII) and 96.9 (GIII), in relation to the control group. It was concluded that the use of pellets in a sodium alginate matrix containing *D. flagrans* stored for two and five years were effective on the predation of infective nematode larvae after passage of the gastrointestinal tract of asinines.

Keywords: biological control, nematophagous fungi; storage.

INTRODUÇÃO

A parasitofauna de equídeos apresenta ampla variedade de nematódeos gastrintestinais, dentre eles, destacam-se os pequenos estrôngilos ou ciatostomíneos, e os grandes estrôngilos, tendo distribuição independente de raça, espécie e faixa etária (Barbosa et al. 2001, Quinelato et al. 2008, Costa et al. 2018). Infecções por esses parasitos podem causar diminuição na produtividade, anemia, cólica intestinal, perda de peso e até mesmo a morte do equídeo (Molento, 2005).

O controle de nematódeos gastrintestinais de equídeos é realizado principalmente através do uso de compostos químicos, porém dosagens inadequadas e uso intensivo vem resultando na resistência aos anti-helmínticos em vários países do mundo, o que torna uma grave ameaça para o controle de infecções causadas por nematódeos (Peregrine et al. 2014). No Brasil, já foi diagnosticada a resistência aos benzimidazóis, pirantel e lactonas macrocíclicas em parasitos de equídeos (Molento et al. 2008, Canever et al. 2013, Saes et al. 2016).

Visando limitar o uso de anti-helmínticos, há uma busca sobre a utilização de métodos alternativos como ferramenta de controle das formas de vida livre nas pastagens, destacando-se os fungos nematófagos (Castro et al. 2003). Dentre os fungos nematófagos, as espécies *D. flagrans* e *M. thaumasium* são as mais estudadas e com maior potencial de comercialização (Braga et al. 2010, Vilela et al. 2012, Vilela et al. 2013, Fitz-Aranda et al. 2015, Silveira et al. 2017). Além de nematófago, Silva et al. (2017) observaram a capacidade de *D. flagrans* sintetizar nanopartículas de prata extracelularmente, ampliando suas possibilidades de uso como antimicrobianos e anticancerígenos.

Uma vez percorrido o trato gastrintestinal, os fungos juntos das fezes são expelidos para o ambiente, colonizando o esterco. Assim, entram em contato com as larvas eclodidas, produzindo armadilhas que causam a morte destas, reduzindo o número de larvas infectantes e prevenindo a reinfecção dos animais (Silva et al. 2009).

Nesta perspectiva, este trabalho buscou avaliar a eficácia de formulações peletizadas em matriz de alginato de sódio de *D. flagrans* armazenados por dois e cinco anos, sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrointestinal de asininos.

MATERIAL E MÉTODOS

Fungos e produção de massa micelial

Foram utilizados os isolados AC001 da espécie *D. Flagrans*, que foram obtidos de solos da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, Brasil. Os micélios fúngicos foram obtidos pela transferência de discos de cultura (aproximadamente 5 mm de diâmetro) dos isolados em AA 2% para frascos Erlenmeyers 250 mL com 150 mL do meio líquido batata-dextrose, pH 6.5, e incubados sob agitação de 120 rotações por minutos no escuro a 26 °C, por 10 dias, através da metodologia de Araújo et al. (2010). Os micélios foram então removidos para peletização utilizando alginato de sódio, como descrito por Walker e Connick (1983) e modificado por Lackey et al. (1993).

Os péletes de *D. flagrans* utilizados possuíam datas de produção distintas (maio de 2013 - cinco anos; maio de 2016 – dois anos; e maio de 2018 – recém-produzidos). Durante a estocagem, os péletes permaneceram em sacos plásticos vedados, em geladeira sob temperatura de 2 – 8°C, no escuro.

Ensaio experimental

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Experimental e no Laboratório de Parasitologia Veterinária – LPV do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB) – Campus Sousa. De início, foram coletadas amostras de fezes de 32 asininos, diretamente da ampola retal e encaminhadas ao LPV, para realização da contagem de Ovos Por Grama de fezes (OPG) de acordo com o método de Gordon e Whitlock (1939).

Após obter a média de OPG dos animais, foi administrado uma dose oral de Ivermectina (200µg/Kg; Centurion Vallé, Montes-Claros, Minas Gerais, Brasil). Dez dias após a administração anti-helmíntica, foi realizado novo OPG dos animais para a constatação de ausência de parasitos. Foram realizadas coproculturas, utilizando a técnica de Baermann (Willcox e Coura, 1989) para recuperação das larvas infectantes de estrôngilos, em seguida quantificadas e identificadas de acordo com Bevilaqua et al. (1993). Foram divididos em dois ensaios: Ensaio A e B. No Ensaio A foi observada a redução larval em placa de petri e no ensaio B foi realizada a recuperação de larvas não predadas na coprocultura.

Ensaio A

Neste ensaio, avaliou-se a eficácia de péletes de *D. flagrans* recém-produzidos e armazenados por dois e cinco anos, sobre L3 de estrongilídeos após passagem pelo trato gastrointestinal de equídeos. Os asininos foram divididos em quatro grupos, cada grupo contendo oito animais, em que cada animal recebeu dosagem única de 100g (20% de micélio fúngico) de péletes juntamente com ração comercial para facilitar a ingestão: GI - receberam péletes de *D. flagrans* estocados por cinco anos; GII- receberam péletes de *D. flagrans* estocados por dois anos; GIII – receberam péletes de *D. flagrans* recém-produzidos; e Controle - receberam péletes sem fungos nematófagos.

Após a administração de fungos, dentro dos intervalos de horas (12, 24, 36, 48, 60 e 72), foram coletadas amostras de fezes, como descrito por Araújo et al. (2010). Em seguida, essas amostras foram homogeneizadas, e 4 g de fezes colocadas em placas de Petri com 9 cm diâmetro contendo 2% de agar de água (AA 2%), acondicionados em incubadora BOD a 25 ° C, no escuro. Para cada grupo foram produzidas 12 repetições, duas para cada tempo definido, de acordo com Tavela et al. (2013). Para testar a atividade predatória dos péletes de fungos produzidos em períodos diferentes (AC001), foram adicionadas 1000 L3 de estrongilídeos em placas de Petri dos grupos testados. No 15º dia, as L3 foram recuperadas pelo método de Baermann (Araújo et al. 2010).

Ensaio B

Concomitantemente ao ensaio A, este ensaio buscou avaliar a porcentagem de redução de larvas de estrôngilos em coproculturas. Para isso fezes frescas dos 32 asininos foram processados para a preparação de coproculturas (Roberts e O'sullivan, 1950), sendo misturadas com vermiculita expandida, molhada. Foram produzidas 12 repetições para cada grupo, duas para cada período indicado. Em cada coprocultura foram adicionados 1000 larvas de estrôngilos. As culturas foram incubadas a 28 °C por 10 dias (Tavela et al. 2013). No final deste período foram obtidas L3 pelo método de Baermann, e identificadas e quantificadas.

Análises Estatísticas

A determinação da porcentagem de redução larval foi utilizada a metodologia estabelecida por Mendoza-de-Guives et al. (1999):

$$\text{Redução (\%)} = \frac{\text{Média L3 recuperadas do GC} - \text{média de L3 recuperadas do GT}}{\text{Média L3 recuperado do GC}} \times 100$$

L3 = larvas infectantes; GC = Grupo Controle; GT = Grupo tratado

Os dados foram submetidos à análise de variância (teste F). Posteriormente, os meios foram comparados usando o teste de Tukey no nível de probabilidade de 1% via software Biostat 5.0 (Ayres et al., 2007).

RESULTADOS

Observou-se que após a passagem dos péletes contendo *D. flangras* (ACOO1) pelo trato gastrointestinal dos asininos, independente do tempo de estocagem dos péletes, houve redução larval significativa ($p < 0,01$) até o intervalo de 72 horas nos ensaios A e B.

No ensaio A, houve diferença significativa ($p < 0,01$) sobre de redução larval entre os grupos contendo *D. flagrans* (GI, GII e GIII) e o controle já a partir do intervalo de 12 horas (Figura 1). Os picos de redução ocorreram às 72 horas no GI (94,7%) e no GII (97%); e às 60 horas no GIII (96,9%).

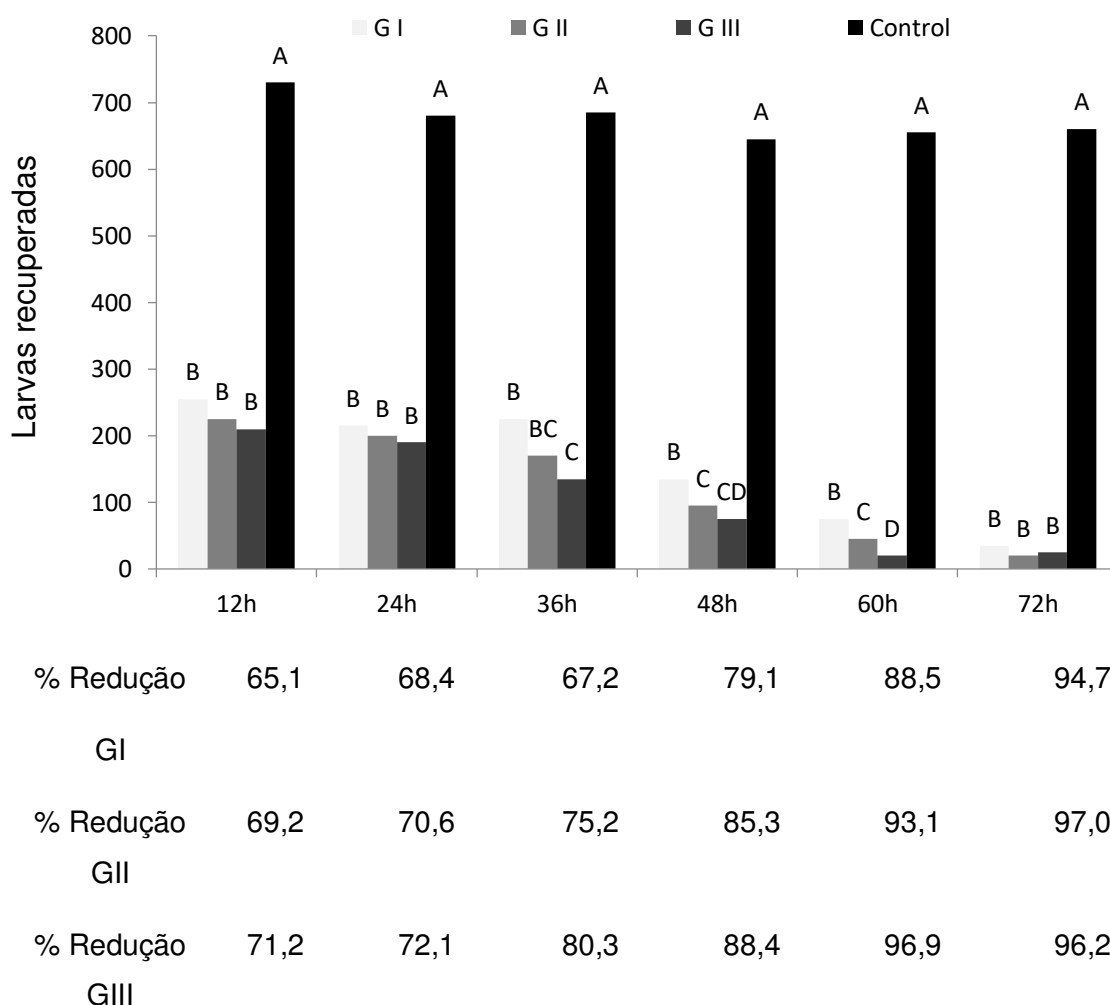
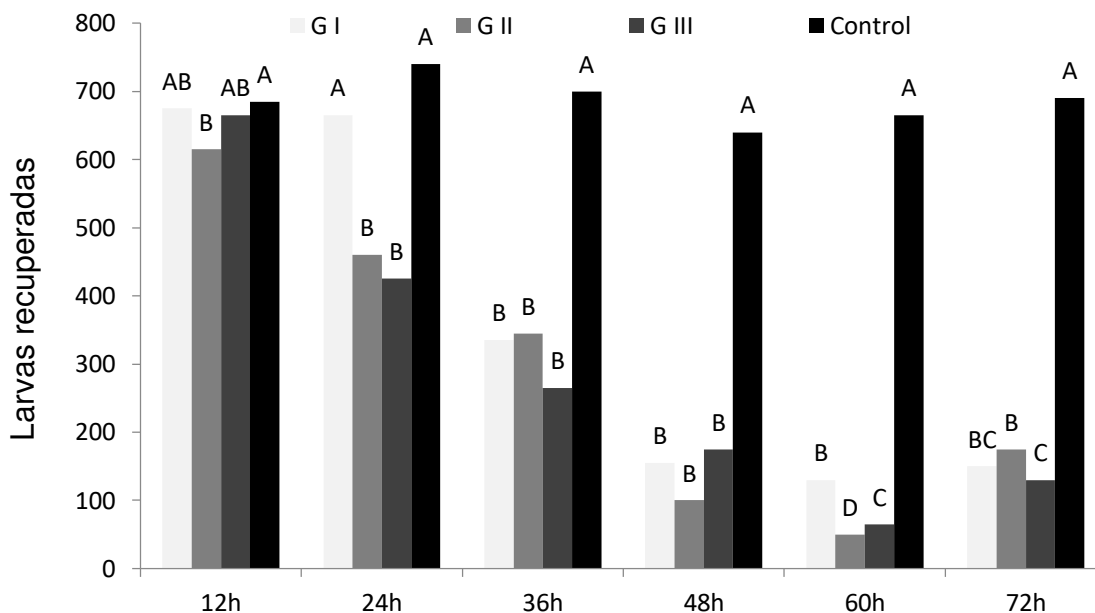


Figura 1. Total de larvas infectantes recuperadas e percentual de redução de larval de nematódeos gastrintestinais de asininos no Ensaio A, utilizando *D. flagrans*. GI – cinco anos; GII – dois anos; GIII – recém-prodúzidos. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente no teste de Tukey a 1% de probabilidade.

No ensaio B, quantificando a recuperação de larvas não predadas, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,01$) no GII a partir das 12 horas, no GIII a partir das 24 horas e no GI a partir das 36 horas (Figura 2). De

forma geral, a partir das 24 horas, a redução foi mais acentuada, chegando ao pico de redução no intervalo de 60 horas em todos os grupos tratados.



% Redução	1,5	10,1	52,1	75,8	80,5	78,3
G I						
% Redução	10,2	37,8	50,7	84,4	92,5	74,6
G II						
% Redução	2,9	42,6	62,1	72,7	90,2	81,2
G III						

Figura 2. Quantidade de larvas infectantes recuperadas das corpoculturas pelo aparelho de Baermann e percentual de redução larval entre grupos tratados com fungos *D. flagrans* em intervalos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h.

DISCUSSÃO

O uso desordenado de compostos químicos para o controle de nematódeos gastrintestinais de eqüídeos evidencia a resistência antihelmíntica e a busca por medidas de controle efetivas. Braga et al. (2009) apresentaram a utilização de fungos nematófagos como importante estratégia para o controle

biológico de nematódeos gastrintestinais de equídeos. A utilização desses fungos em ovinos em associação ao Cloridrato de Levamisole 5% refletiu em menor quantidade de vermifugações, melhores índices de ganho de peso e alta redução de larvas infectantes nas pastagens (Vilela et al. 2018), confirmando o preconizado por Kaplan e Vidyashankar (2012), que afirmaram que um programa de manejo sanitário deve ser integrado, baseado na redução do uso de anti-helmínticos e conseqüente diminuição de produtos químicos no ambiente. De acordo com Jackson e Miller (2006), os fungos nematófagos não causam danos ao meio ambiente, atuando apenas na destruição das formas infectantes do nematódeos.

Como observado nos resultados dos ensaios A e B, houve redução larval significativa ($p < 0,01$), após administração de formulações peletizadas a base de alginato de sódio contendo micélio fúngico de *D. flagrans*, armazenados por diferentes períodos. Houve predação larval a partir das 12 horas, com melhores resultados entre 60 e 72 horas, após a passagem pelo trato gastrintestinal dos asininos. Resultados semelhantes foram observados por Tavela et al. (2011) e Araújo et al. (2012), que ao avaliarem a predação dos fungos *D. flagrans* e *M. thaumasium* sob larvas infectantes de nematódeos após passagem pelo trato gastrintestinal de equídeos, observaram redução considerável de larvas infectantes entre o período de 12 a 72 horas. De acordo com Assis et al. (2003), esses intervalos de tempo demonstraram ser ideais para ação dos fungos nematófagos após passagem pelo trato gastrintestinal de equinos.

No Ensaio A, como pode ser observado na Figura 1, houve diferença significativa ($p < 0,01$) sobre de redução larval entre os grupos contendo *D. flagrans* e o grupo controle a partir do intervalo de 12 horas, com redução larval de até 97%. Em pesquisa realizada por Araújo et al. (2012), ao administrarem *D. flagrans* e avaliarem a redução de larvas infectantes após ultrapassar o trato gastrintestinais de asininos, perceberam redução de até 85%.

No Ensaio B, em relação a quantidade de larvas não predadas utilizando *D. flagrans*, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,01$) nos intervalos avaliados em relação ao controle (Figura 2). O GII apresentou maior redução de larvas não predadas no intervalo de 60 horas, com redução larval de

92%, seguido do GIII com 90,2%. O que demonstra que o fungo manteve sua característica predatória, mesmo tendo sido armazenado por 60 meses. Estudos realizados por Sagués et al. (2011) avaliando a viabilidade e eficácia de *D. flagrans* incorporados em blocos energéticos armazenados por dois anos sob a redução de larvas infectantes de helmintos de ovinos criados a pasto, demonstraram reduções de 92% da carga parasitária total. Braga et al. (2011) observou redução de até 88,6% de ciatostomíneos de equídeos, ao utilizarem *D. flagrans* armazenado em sílica gel por sete anos.

Provavelmente, ao serem mantidos a baixas temperaturas (2 a 8 °C), os fungos testados diminuíram seu metabolismo. Castro et al. (2000) avaliaram a obtenção de massa micelial de um isolado de *Arthrobotrys musiformis* e verificaram que em baixas temperaturas houve diminuição da massa micelial, ao passo que altas temperaturas aumentaram essa produção.

Aliado a isso, a peletização em matriz de alginato de sódio pode ter agido na proteção do micélio fúngico contra o ressecamento e reações químicas deletérias, tais como a oxidação. Moretini e Melo (2007) descreveram o alginato de sódio como sendo um polissacarídeo solúvel em água extraído de várias espécies de algas marinhas. Em contato com cátions metálicos, tais como o Cálcio (Ca⁺⁺), a substância é alvo de gelificação e se mantém estável por vários períodos. Eles ainda observaram que péletes do fungo *Coniothyrium minitans* estocados a 4 °C apresentaram 100% de viabilidade, mesmo depois de estocados por 14 meses, enquanto aqueles estocados a 28 °C apresentaram diminuição da viabilidade no segundo mês de armazenamento, e nos meses seguintes não apresentaram nenhuma viabilidade. Salgado (1993) relatou a longevidade de *Arthrobotrys conoides* peletizados em alginato de sódio e armazenados por 60 dias a 4°C, e verificou que o fungo apresentou recuperação de aproximadamente 100%, um ano após a produção dos péletes.

CONCLUSÃO

Conclui-se que formulações peletizadas em matriz de alginato de sódio de *D. flagrans* armazenados por dois e cinco anos, apresentaram eficácia

elevada sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrintestinal de asininos.

REFERÊNCIAS

Araujo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Carvalho, R.O., 2010. In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. Parasitology Research, 107, 103–108.

Araujo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Soares, F., Ferreira, S.R., Tavela, A.O., Frassy, L.N., Alves, C.D.F., Carvalho, G.R., 2012. Control of *Strongyloides westeri* larvae by nematophagous fungi after passing of gastrointestinal tract of donkeys (*Equus asinus*). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (Impresso), v. 21, p. 157-160.

Assis, R.C.L., Araújo, J.V., 2003. Avaliação da viabilidade de duas espécies de fungos predadores do gênero *Monacrosporium* sobre ciatostomíneos após a passagem pelo trato gastrintestinal de equinos em formulação de alginato de sódio. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 12, 109–113.

Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2007. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas, CNPq, Brasília, p. 290.

Barbosa, O.F., Rocha, U.F., Silva, G.S., Soares, V.E., Veronez, V.A., Oliveira, G.P., Landim, V.J.C., Costa, A.J., 2001. A survey on Cyathostominae nematodes (*Strongylidae*, Strongylidae) in pasture bred horses from São Paulo State, Brazil. Ciências A, 22, 21–26.

Bevilaqua, C.M.L., Rodrigues, M.L., 1993. Cocordet, D. Identification of infective larvae of some common Equinos strongylids of horses. Revue de Médecine Vétérinaire 144, 989–995.

Braga, F. R., Araújo J. V., Araujo, J. M., Tavela, A. O., Ferreira, S. R., Soares, F. E. F., Benjamin, L. A., Frassy, L. N., 2011. Influence of the preservation period in silica-gel on the predatory activity of the isolates of *Duddingtonia flagrans* on infective larvae of cyathostomins (Nematoda: Cyathostominae). Experimental Parasitology, v. 128, p. 460-463.

Braga, F. R., Araújo, J. V., Silva, A. R., Araujo, J. M., Carvalho, R. O., Tavela, A. O., Campos, A. K., Carvalho, G. R., 2009. Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. Veterinary Parasitology, v. 163, p. 335-340.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Silva, A.R., 2010. Predatory activity of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on horse cyathostomin infective larvae. *Tropical animal health and production*, v.42, p.1161-1165.

Canever, R. J., Braga, P. R.C., Boeckh, A., Grycajuck, M., Bier, D., Molento, M. B., 2013. Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology (Print)*, v. 194, p. 35-39.

Castro, A. A., Oliveira, C. R. C., Anjos, D. H. S., Ornelas, E. I., Bittencourt, V. R. E. O., Araújo, J. V., Sampaio, I. B. M., Rodrigues, M. L. A., 2003. Potencial dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* sp. e *Monacrosporium thaumanisium* para o controle de larvas de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 12, n. 2, p. 53-55.

Castro, J. M. C., Lima, R. D. De, Ferraz, S., Neves, J. C. L., 2000. Capacidade de predação de *Arthrobotrys musiformis* a fitonematóides. *Summa Phytopathologica, Jaboticabal*, v. 26, p. 58-62.

Costa, P. W. L., Vilela, V. L. R., Feitosa, T. F., 2018. Parasitic profile of traction equids in the semi-arid climate of Paraíba State, Northeastern, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 27, p. 218-222.

Fitz-Aranda J., Mendoza P.M., Torres-Acosta J., Liébano-Hernández E., López-Arellano M., Sandoval-Castro C., 2015. *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in nutritional pellets: effect of storage time and conditions on the trapping ability against *Haemonchus contortus* larvae. *Journal Helminthology*, 89 (1): 13-18.

Gordon, H. M., And Whitlock, H. V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal Council Science Industry Research* v.12, p.50-52.

Jackson, F., Miller, J.M., 2006. Alternative approaches to control – quo vadit? *Veterinary Parasitology*. 139, 371–384.

Kaplan, R. M., Vidyashankar, A. N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186 (1-2), 70-78.

Lackey, B.A., Muldoon, A.E., Jaffe, B.A., 1993. Alginate pellet formulation of *Hirsutella rossiliensis* for biological control of plant-parasitic nematodes. *Biologic Control*. 3, 155–160.

Mendoza-De-Guives, P., Davies, K.G., Clarck, S.J., Behnke, J.M., 1999. Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology*, 119, 95–104.

Molento, M. B., Antunes, J., Novak-Bentes, R., Coles, G., 2008. Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Veterinary Record*, v. 162, p. 384-385.

Molento, M. B., 2005. Parasite resistance on helminths of equids and management proposals. *Ciência Rural*, v.35, n.6, p.1469-1477.

Moretini, A., Melo, I. S., 2007. Formulação do fungo *Coniothyrium minitans* para controle do mofo-branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.155-161.

Peregrine, A., Molento, M. B., Kaplan, R. M., Nielsen, M. K., 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter?. *Veterinary Parasitology (Print)*, v. 201, p. 1-8.

Quinelato, S., Couto, M.C.M., Ribeiro, B.C., Santos, C.N., Souza, L.S., Anjos, D.H.S., Sampaio, I.B.M., Rodrigues, L.M.A., 2008. The ecology cyathostomin infective larvae (Nematoda-Cyathostominae) in tropical southeast Brazil. *Veterinary Parasitology*. 153, 100–107.

Roberts, F. H. S., & O' Sullivan, J. P., 1950. Methods of egg counts and laval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Agriculture Research* v. 1.p. 99-102.

Saes, I. L., Vera, J. H.S., Fachioli, D. F., Yamada, P. H., Dellaqua, J. V.T., Saes, R. L., Amarante, A. F.T., Soutello, R. V.G., 2016. Time required by different anthelmintics to reach expected efficacy levels in horses infected by strongyles. *Veterinary Parasitology (Print)*, v. 229, p. 90-92.

Salgado, S.M.L., Campos, V. P., 1993. Formulação do fungo *Arthrobotrys conoides* em alginato de sódio para controle de nematóides. *Nematologia Brasileira*, v. 17 (2), 140 – 141.

Sagüés, M. F., Fusé, L., Fernández, S., Iglesias, L., Moreno, F.C., Saumell, C., 2011. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, 109, 707–713.

Silva, A. R., Araújo, J. V., Braga, F. R., Frassy, L. N., Tavela, A. O., 2009. Biological control of sheep gastrointestinal nematodiasis in atropical region of the southeast of Brazil with the nematode predatory fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium*. *Parasitology Research*, 105,1707–1713.

Silva, L. P. C., Oliveira, J. P., Keijok, W. J., Silva, A. R., Aguiar, A. R., Guimaraes, M. C. C., Ferraz, C. M., Araújo, J. V., Tobias, F. L., Braga, F.R., 2017. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 12, p. 6373-6381.

Silveira, W. F., Oliveira, G. D., Braga, F. R., Carvalho, L. M., Domingues, R. R., Silva, L. A., Zanuncio, J. C., Araujo, J. V., 2017. Predation rate of nematophagous fungi after passing through the gastrointestinal tract of goats. *Small Ruminant Research*, v. 147, p. 105-107.

Tavela, A.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Araujo, J.M., Ferreira, S.R., Carvalho, G.R., 2011. Biological Control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in Tropical Southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 175, 92-96.

Tavela, A. O., Araújo, J. V., Braga, F. R., Silveira, W. F., Silva, V. H. D., Junior, M. C., Araujo, J. M., Benjamin, L. A., Carvalho, G. R., Paula, A. T., 2013. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science*, 94: 568-572.

Vilela, V. L. R., Feitosa, T. F., Braga, F.R., Araújo, J. V., Athayde, A. C. R., 2018. Control of sheep gastrointestinal nematodes using the combination of *Duddingtonia flagrans* and Levamisole Hydrochloride 5%. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. p. 2-6.

Vilela, V. L. R., Feitosa, T. F., Braga, F. R., Araujo, J. V., Lucena, S. C., Dantas, E. S., Athayde, A. C. R., Silva, W. W., 2013. Efficacy of *Monacrosporium thaumasium* in the control of goat gastrointestinal helminthiasis in a semi-arid region of Brazil. *Parasitology Research* (1987. Print), v. 112, p. 871-877.

Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F., Braga, F.R., Araújo, J.V., Souto, D.V.O., Santos, H.E.S., Athayde, A.C.R., 2012. Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the Northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 188, 127–133.

Walker, H.L., Connick, W.J., 1983. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. *Weed. Science*. 31, 333–338.

Willcox H. P., Coura J.R., 1989. Nova concepção para o método de Baermann-Moraes-Coutinho na pesquisa de larvas de nematódeos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; 84:563-5.

CAPÍTULO II

Viabilidade predatória do fungo nematofago *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos após estocagem e refrigeração

Manuscrito submetido à
SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Viabilidade predatória do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos após estocagem e refrigeração

Paulo Wbiratan Lopes da Costa¹; Felipe Bondiej Ventura Alvares²; Francisca Flávia da Silva³; Jossiara Abrantes Rodrigues¹; Thais Ferreira Feitosa²; Jackson Victor de Araújo⁵, Fabio Ribeiro Braga⁴; Vinicius Longo Ribeiro Vilela^{1,2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), CEP: 58.108-110, Patos-PB, Brazil.

² Departamento de Medicina Veterinária, Instituto Federal da Paraíba (IFPB), CEP: 58800-970, Sousa-PB, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), CEP: 58.108-110, Patos-PB, Brazil.

⁴ Departamento de Veterinária, Universidade de Vila Velha, CEP: 29.102-920, Vila Velha - ES, Brazil.

⁵ Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, CEP: 36.570-000, Viçosa-MG, Brazil.

* Autor correspondente. Av. Tancredo Neves, s/ n, Jardim Sorrilândia, Sousa, PB, Brazil. CEP: 58800-970. Contato: (083) 99907-3634. E-mail: vinicius.vilela@ifpb.edu.br

RESUMO - Objetivou-se avaliar a viabilidade predatória do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos na região do semiárido nordestino após estocagem (dois e cinco anos) e refrigeração (2 °C e 8 °C). Foram selecionadas 32 asininos, com OPG (método de Gordon and Whitlock, 1939) negativo, divididas em quatro grupos experimentais contendo oito animais cada, recebendo péletes contendo *M. thaumasium* em períodos de estocagem diferentes, administrando a dosagem 100g (20% de micélio fúngico), única administração para cada animal: GI, péletes com 60 meses de estocagem; Grupo II, péletes 24 meses de estocagem; Grupo III, péletes recém-produzidos; Grupo IV, denominado, grupo controle. Observou-se que após passagem dos péletes contendo *M. thaumasium* pelo trato gastrintestinal dos asininos, independente do período de armazenamento dos péletes, houve redução larval significativa ($p < 0,01$) até o intervalo de 72 horas. Concluiu-se que o fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* peletizado em matriz de alginato de sódio

foram efetivos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos na região do semiárido nordestino após estocagem (24 e 60 meses) e refrigeração (2 °C e 8 °C).

Palavras-chave: armazenamento; péletes; temperatura.

Predatory viability of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* on infective larvae of gastrointestinal nematodes of asininos after storage and refrigeration

ABSTRACT - A predatory viability of the nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* on infective larvae of gastrointestinal nematodes of asinines in the semi-arid region of the Northeastern region after storage (two and five years) and refrigeration (2 ° C and 8 ° C) was performed. A total of 32 animals were selected, with negative (divided into four experimental groups containing the animals) in pellets containing *M. thaumasium* in different storage periods, with 100g (20% fungal mycelium), with OPG (Gordon and Whitlock, 1939) single administration for each animal: GI, pellets with 60 months of storage; Group II, there are 24 months of storage; Group III, newly manufactured pellets; Group IV, denominated, control group. Observations of occurrences with the following *M. thaumasium* plots for the gastrointestinal tract of the periods, regardless of the storage period of the matches, had a significant larval reduction ($p < 0.01$) up to the 72 hour interval in trials A and B, presenting peaks of larval reduction (93%) no analysis At less than 79.3 to 80.4 in assay B. It was concluded that *M. thaumasium* nematophagous fungus pelleted in nutrient alginate matrix were effective on infective larvae of gastrointestinal nematodes. Asininos in the semi-arid region Northeast after the season (60 and 24 months) and refrigeration (2 ° C and 8 ° C).

Keywords: Pellets; storage; temperature.

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

Novas alternativas para o controle de helmintos gastrintestinais de equídeos e outros animais domésticos estão sendo pesquisadas, a exemplo dos fungos nematófagos *D. flagrans* e *M. thuamasium*, que se apresentam como uma ferramenta promissora (ARAÚJO et al., 2004; SAGUES et al., 2011; TAVELA et al., 2013; ANDRADE et al., 2016).

Durante o processo de predação os fungos nematófagos aderem e aprisionam os nematódeos causando uma infecção, em seguida, após a imobilização, penetram e realizam a

digestão. Sugere-se que essa penetração é causada pela combinação de atividades mecânicas e enzimas hidrolíticas (DIAS et al., 2013; BRAGA e ARAÚJO, 2014).

Fungo *Monacrosporium thaumasium* apresenta a capacidade de sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal de ruminantes e animais domésticos, não perdendo sua capacidade predatória, sendo também considerados importantes para o controle biológico de helmintos (ARAÚJO et al., 2007; MELO et al., 2003). Araújo et al. (2013) observaram que este fungo se apresenta como inimigo natural dos nematodeos gastrintestinais, podendo ser encontrados em varias partes do meio ambiente, e demonstrando sua eficacia enquanto agente de biocontrole para parasitos.

Observa-se que o desafio atual é a seleção de organismos que tenham uma produção industrial e de baixo custo. Como também realização de trabalhos que verifiquem a eficácia do tempo de estocagem desses fungos. Por sua vez, avaliações da eficácia de formulação peletizada a base de alginato de sódio contendo *M. thaumasium*, estocados em condição de refrigeração de 2° a 8°C em diferentes períodos não foi avaliado para espécies de asininos.

Deste modo, objetivou-se avaliar a viabilidade predatória do fungo nematófago *M. thaumasium* sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos na região do semiárido nordestino após estocagem de dois e cinco anos e refrigeração (2 °C e 8 °C).

Foi utilizado o isolado *M. thaumasium*, que é mantido na micoteca do Laboratório de Parasitologia, do Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais (MG), Brasil. Esse isolado é proveniente de solos no município de Viçosa, MG. Os micélios fúngicos são obtidos através da transferência de discos culturais (aproximadamente 4 mm de diâmetro) de isolados de fungos (*M. thaumasium*) em 2% de água-agar a 250 mL de Erlenmeyer Frascos com 150 mL de meio líquido GPY (glicose, peptona de sódio e extracto de levedura), e incubadas sob agitação de 120 rpm no escuro a 26 °C, por 10 dias. Após esse período, os micélios são removidos, filtrados e pesados em uma balança analítica. Todos os procedimentos seguiram a metodologia de Araújo et al. (2010).

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Experimental do Hospital Veterinário do Instituto Federal da Paraíba (IFPB) – Campus Sousa. Foram utilizados péletes de *M. thaumasium* em matriz de alginato de sódio estocados em sacos plásticos a temperaturas de 2 – 8 °C, no escuro, por dois e cinco anos, bem como péletes recém-produzidos.

Foram selecionadas 32 asininos, com idades variadas, com OPG (Gordon e Whitlock, 1939) negativo, divididas em quatro grupos experimentais contendo oito animais, em que cada animal recebeu dosagem única de 100g (20% de micélio fúngico) de péletes: GI, recebeu péletes contendo *M. thaumasium* – cinco anos de estocagem, GII, receberam péletes contendo *M. thaumasium* – dois anos de estocagem; GIII, receberam péletes recém-produzidos; e Grupo IV,

não recebeu péletes, denominando grupo controle. Para facilitar a ingestão dos péletes por parte dos asininos eram adicionados 100g de ração comercial para cada asinino.

Foram realizados dois ensaios experimentais, denominados Ensaio A e Ensaio B. No ensaio A, avaliou-se a eficácia de péletes de *M. thaumasium* recém-produzidos e armazenados por dois e cinco anos, sobre larvas infectantes (L3) de estrogilídeos após passagem pelo trato gastrintestinal de equídeos. Após a administração de fungos, dentro dos intervalos de horas (12, 24, 36, 48, 60 e 72), foram coletadas amostras de fezes, como descrito por Araújo et al., (2010). Em seguida, essas amostras foram homogeneizadas, e 4 g de fezes colocadas em placas de Petri com 9 cm diâmetro contendo 2% de agar de água (AA 2%), acondicionados em incubadora BOD a 25 ° C, no escuro. Para cada grupo foram produzidas 12 repetições, duas para cada tempo definido, de acordo com Tavela et al. (2013). Para testar a atividade predatória dos péletes de fungos produzidos em períodos diferentes (AC001), foram adicionadas 1000 L3 de estrogilídeos em placas de Petri dos grupos testados. No 15º dia, as L3 foram recuperadas pelo método de Baermann (ARAÚJO et al., 2010).

No Ensaio B, buscou avaliar a porcentagem de redução de larvas de estrôngilos em coproculturas. Para isso fezes frescas dos 32 asininos foram processados para a preparação de coproculturas (ROBERTS e O'SULLIVAN, 1950), sendo misturadas com vermiculita expandida, molhada. Foram produzidas 12 repetições para cada grupo, duas para cada período indicado. Em cada coprocultura foram adicionados 1000 larvas de estrôngilos. As culturas foram incubadas a 28 °C por 10 dias (TAVELA et al., 2013). No final deste período foram obtidas L3 pelo método de Baermann, e identificadas e quantificadas.

A porcentagem de redução larval foi determinada de acordo com a metodologia estabelecida por Mendoza-de-Guives et al. (1999): $\text{redução (\%)} = \frac{\text{média L3 recuperadas do grupo de controle} - \text{média de L3 recuperadas do grupo tratado} \times 100}{\text{média L3 recuperadas do grupo controle}}$.

Os dados estatísticos foram submetidos à análise de variância (teste F). Em seguida, os meios foram comparados usando o teste de Tukey no nível de probabilidade de 1%, via software Biostat 3.0 (Ayres et al. 2007).

Observou-se que após passagem dos péletes contendo *M. thaumasium* pelo trato gastrintestinal dos asininos, independente do período de armazenamento dos péletes, houve redução larval significativa ($p < 0,01$) até o intervalo de 72 horas nos ensaios A e B.

No Ensaio A, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,01$) sob a redução larval entre os períodos de coleta a partir das 12 horas nos grupos contendo *M. thaumasium* (I, II e III), apresentando picos de redução larval (93%) no intervalo de 72 horas (Figura 1).

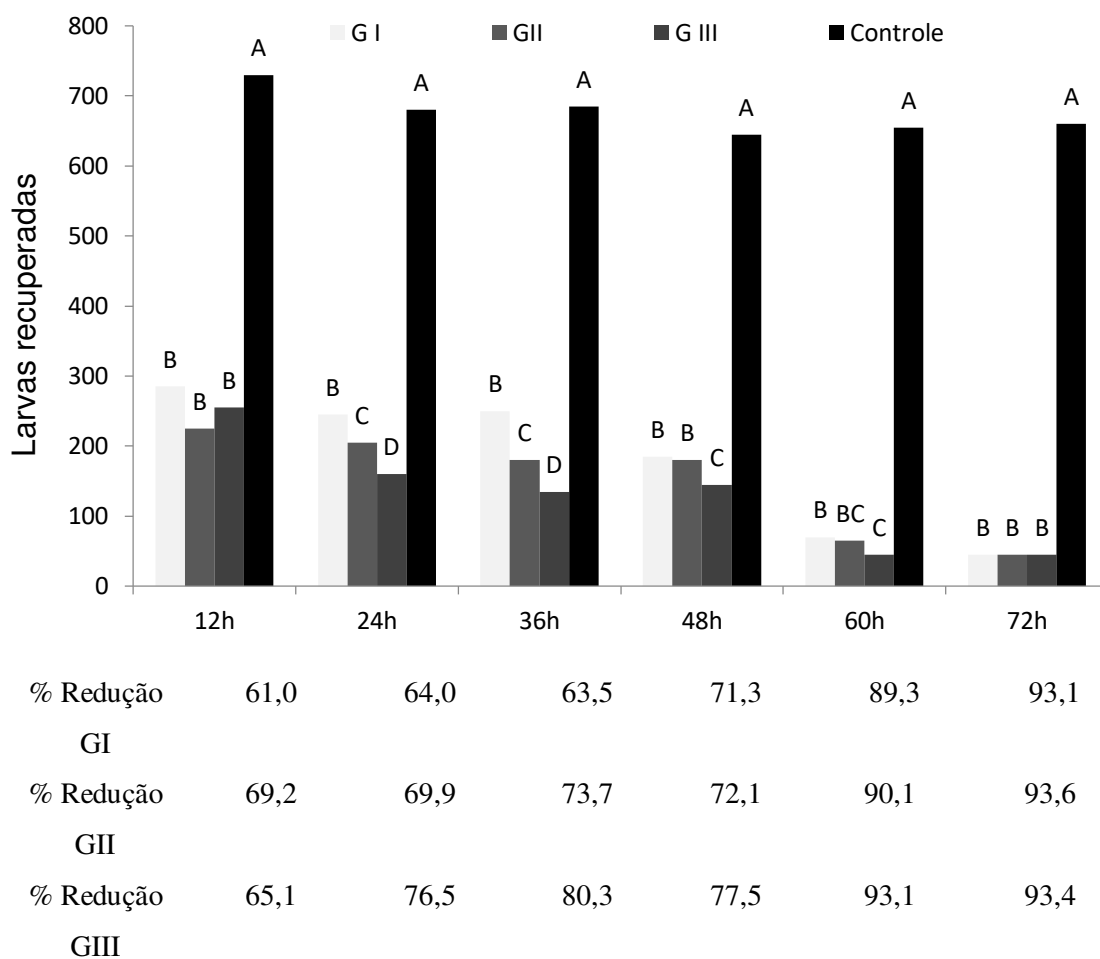


Figura 1. Total de larvas infectantes recuperadas e percentual de redução de larval de nematódeos gastrintestinais de asininos no Ensaio A, utilizando *M. thaumasium*. GI – cinco anos; GII – dois anos; GIII – recém-prodúzidos. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente no teste de Tukey a 1% de probabilidade.

No ensaio A, os resultados foram promissores, no intervalo de 72 horas, os três grupos, independente do tempo de estocagem, obtiveram pico de redução larval de até 93%. Percentuais de redução inferiores foram encontrados por Braga et al (2009), ao avaliarem *in vitro* a capacidade predatória de *M. thaumasium* sob ciatostomíneos de equinos, com reduções de até 72,5%.

No Ensaio B, observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,01$), quando observado a quantidade de larvas não predadas recuperadas na coprocultura (Figura 2), nos grupos contendo fungo *M. thaumasium*. O GIII apresentou redução significativa ($p < 0,01$) de recuperação de larvas a partir das 12 horas, o GII a partir de 24 horas e o GI a partir de 36 horas. Estes grupos obtiveram picos de redução larval no intervalo de 72 horas, variando de 79,3% no GII e 80,4% e no GIII.

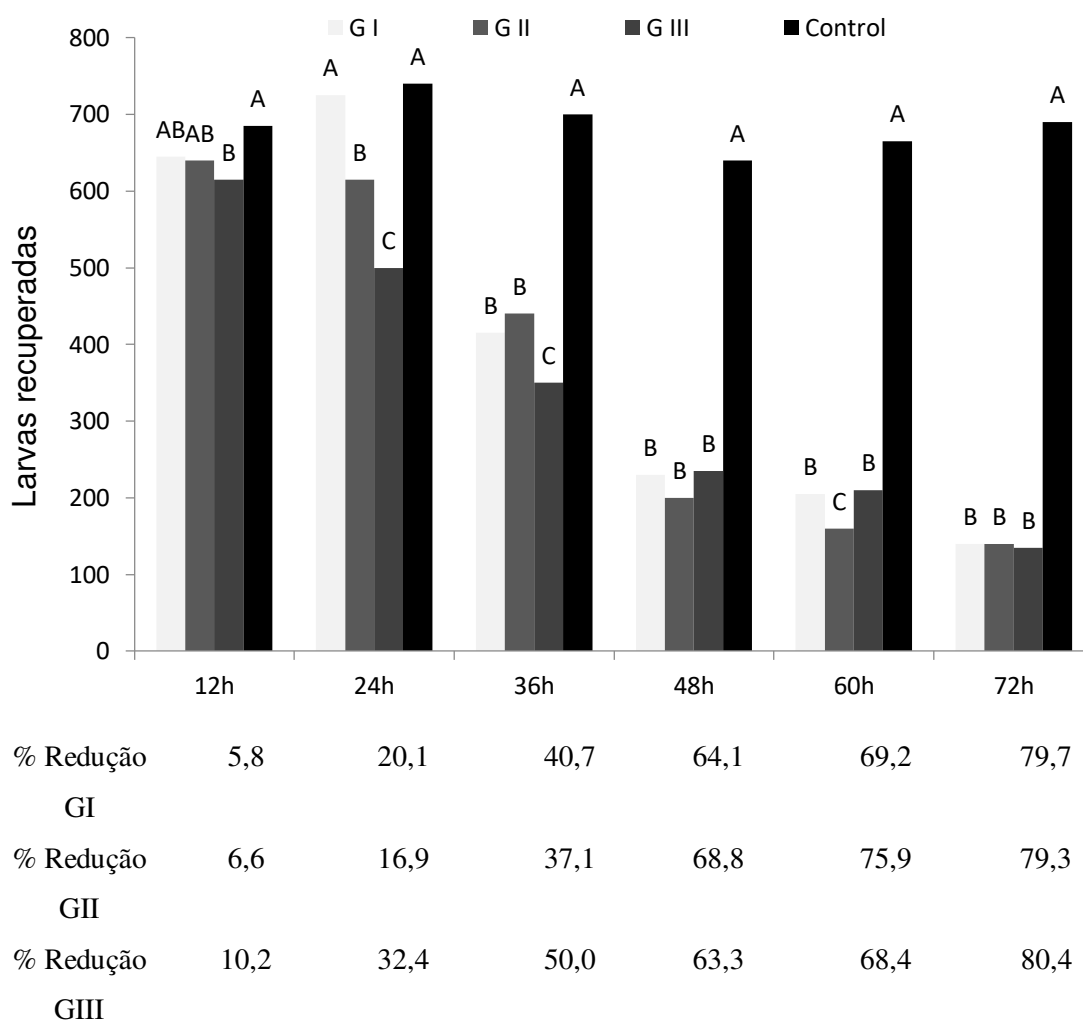


Figura 2. Quantidade de larvas infectantes recuperadas das coproculturas pelo aparelho de Baermann e percentual de redução larval entre grupos tratados com fungos *M. thaumasium* em intervalos de 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h.

No ensaio B, utilizando *M. thaumasium*, observou-se diferença estatística ($p < 0,01$) sobre o percentual de larvas não predadas recuperadas na coprocultura (Figura 2), entre os grupos tratados e controle. Ação larvicida iniciou-se a partir das 12 horas para o GIII, os grupos tratados mantiveram pico de redução no intervalo de 72 horas, com cerca de 80%.

Tais resultados reforçam a aplicabilidade de formulações peletizadas de fungos nematófagos em matriz de alginato de sódio para equídeos, com estocagem de até cinco anos. Resultados semelhantes foram observados por Silva et al. (2018), ao avaliarem a influência do tempo de estocagem de péletes de matriz de alginato de sódio de *M. thaumasium* armazenados por três anos em condições de refrigeração (2° a 8° °C), sob larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de ovinos, em que obtiveram pico de redução de larval de até 75%, no período de 72 horas.

Nesta pesquisa, a utilização de *M. thaumasium* demonstrou elevada eficácia, independente do período de armazenamento. Este fato agrega mais um importante fator para a viabilidade dessas formulações para produção em larga escala, a possibilidade de estocagem por longos períodos sob refrigeração entre 2° a 8° C, ampliando o tempo de exposição para vendas no mercado, para, assim, tornar-se um produto acessível na estratégia de biocontrole de nematódeos gastrintestinais de equídeos.

Conclui-se que o fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* em matriz de alginato de sódio foram efetivos sobre larvas infectantes de nematódeos gastrintestinais de asininos na região do semiárido nordestino após estocagem de dois e cinco anos e refrigeração (2 °C e 8 °C).

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. C.; HIURA, E.; FONSECA, L. A.; FERRAZ, C. M.; SENNA, C. C.; SENA, F. P.; CORREA, L. C.; AGUIAR, A. R.; LACERDA, T. F.; MODO, F. G.; Araújo, J. V.; TOBIAS, F. L.; BRAGA, F. R. Utilization of the Fungus *Duddingtonia flagrans* in Control of Nematode Larvae Development in Equine Stool. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5, p. 829-835, 2016.

ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; CARVALHO, R.O. In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. *Parasitology Research*, 107, 103–108, 2010.

ARAUJO, J.M.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F. R.; FERREIRA, S. R.; TAVELA, A.O. Predatory activity of chlamydo spores of the fungus *Pochonia chlamydo sporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 22:171–174. 2013.

ARAÚJO, J. V.; ASSIS, R. C. L.; CAMPOS, A. K.; MOTA, M. Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: 205 Trichostrongyloidea) parasitos gastrintestinais de bovinos. *Revista Brasileira de 206 Parasitologia Veterinária*, São Paulo. 13: 65-71, 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* 42:1177–1181. 2007.

AYRES, M.; AYRES, J.R.M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas, CNPq, Brasília, p. 290, 2007.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V.; CARVALHO, R. O.; ARAUJO, J. M.; SILVA, A. R.; CAMPOS, A. K. Controle *in vitro* de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) utilizando os fungos predadores *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Arthrobotrys robusta*. *Ciência Animal Brasileira (UFG)*, v. 10, p. 887-892, 2009

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J. V. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology*. 98, 71–82. 2014.

- DIAS, A. S.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; PUPPIN, A. C.; PERBONI, W. R. *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitology Research* (1987. Print), v. 112, p. 2131-2136, 2013.
- GORDON, H. M., AND WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal Council Science Industry Research* v.12, p.50-52, 1939.
- MELO, L. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ARAÚJO, J. V. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematoide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. *Ciência Rural*, 33:169–171. 2003.
- MENDOZA-DE-GUIVES, P.; DAVIES, K.G.; CLARCK, S.J.; BEHNKE, J.M. Predatory behaviour of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. *Parasitology* 119, 95–104, 1999.
- ROBERTS, F. H. S. & O' SULLIVAN, J. P. Methods of egg counts and laval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Agriculture Research* v. 1.p. 99-102, 1950.
- SAGÜÉS, M. F.; FUSÉ, L.; FERNÁNDEZ, S.; IGLESIAS, L.; MORENO, F. C.; SAUMELL, C. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research* 109, 707–713, 2011.
- SILVA, F. F.; COSTA, P. W. L.; BEZERRA, R. A.; SILVA, N. I. S.; SILVA, J. D.; FEITOSA, T. F.; BRAGA, F. R.; ARAUJO, J. V.; VILELA, V. L. R. . Influence of storage time of *Monacrosporium thaumasium* pellets on the predation of infective larvae of sheep gastrointestinal nematodes. *ARS VETERINÁRIA Jaboticabal*, 2018.
- TAVELA, A. O.; ARAÚJO, J. V.; BRAGA, F. R.; SILVEIRA, W. F.; SILVA, V. H. D.; JUNIOR, M. C.; ARAUJO, J. M.; BENJAMIN, L. A.; CARVALHO, G. R.; PAULA, A. T. Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Research in Veterinary Science*, 94: 568-572, 2013.

CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que formulações peletizadas em matriz de alginato de sódio de *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* armazenados por dois e cinco anos, em temperatura entre 2° a 8°C, foram eficazes sobre a predação de larvas infectantes de nematódeos após passagem do trato gastrintestinal de asininos.

Por demonstrarem eficácia elevada, independente do período de armazenamento, essas formulações peletizadas podem ser produzidas em larga escala, pois há a possibilidade de estocagem por longos períodos sob refrigeração, ampliando o tempo de exposição para vendas no mercado, para, assim, tornar-se um produto acessível na estratégia de biocontrole de nematódeos gastrintestinais de equídeos.

ANEXOS

ANEXO I

EXPERIMENTAL PARASITOLOGY

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Experimental Parasitology emphasizes modern approaches to parasitology, including molecular biology and immunology. The journal features original research papers on the physiological, metabolic, immunologic, biochemical, nutritional, and chemotherapeutic aspects of parasites and host-parasite relationships.

Authors of studies on anti-microbial properties of natural substances are strongly encouraged to submit their work to other, more appropriate journals unless the studies have a strong focus on anti-parasitic activity and address the following points: the chemical characterization of the compounds likely implicated to a reasonable degree controls for the effects of vehicles and solvents if an animal model is not investigated or not available, in vitro activity studies that include at least comparative cytotoxicity data using host cells or tissues to show selective anti-parasitic activity at a level that could indicate a realistic prospect for translation. some investigation into the potential mode of action or effects on likely molecular targets in parasites

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable) *Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright- holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of

'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in

the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below. **Gold open access**
- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an

article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered

1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Experimental

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Vitae - no photos

Include in the manuscript a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of*

Geophysical Research, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/experimental-parasitology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp.281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the

print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to

upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article gold open

access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

ANEXO II

Diretrizes para autor – REVISTA SEMINA AGRÁRIAS

Diretrizes para autores

AUTORES DE ATENÇÃO:

CONSIDERANDO a grande Quantidade de Artigos recebidos para Avaliação, informamos that uma revista Semina: Ciências Agrárias (Todas como áreas: Agronomia; Zootecnia; Medicina Veterinária e Tecnologia de Alimentos) eStara indiponível para recebimento de Artigos não Período de 01 de dezembro de 2018 a 28 de fevereiro de 2019.

A partir de 01/11/2018 será suspenso ou recebido da subárea Arte de Pastagem e Forragem (Avaliação, Produção, Conservação, Manejo, Fisiologia e Melhoramento de Plantas Forrageiras). Razão: Dificuldade em obter opiniões Ad Hoc nesta sub-área.

RECOMENDAMOS QUE OS AUTORES CONSULTAREM COMO DIRETRIZES, UMA VEZ QUE OS TRABALHOS QUE NÃO SÃO PREPARADOS RIGOROSAMENTE, DE ACORDO COM AS NORMAS, NÃO SERÃO ACEITOS.

Após 01/03/2019, um taxa de submissão de novos artigos será de R \$ 110,00 . Se o artigo for rejeitado, esta taxa não será devolvida.

Surgiu após **01/03/2019** que se tornou aceito e apareceu com uma taxa de publicação, ajustada de acordo com o número de páginas sem manuscrito.

Até 10 páginas: **R \$ 330,00** De 11 a 15 páginas: **R \$ 440,00** De 16 a 20 páginas: **R \$ 550,00** De 21 a 25 páginas: **R \$ 660,00**

Se o **artigo for aceito para publicação** , o valor de **R \$ 110,00** foi cobrado pela taxa de emissão **não será descontado da taxa de publicação** .

O **comprovante de depósito** deve ser digitalizado e anexado como um arquivo suplementar no sistema eletrônico.

O depósito deverá ser feito em nome do Instituto de Tecnologia e Desenvolvimento Econômico e Social (ITEDES), CNPJ: 00.413.717 / 0001-65, em uma das três contas bancárias abaixo:

Banco do Brasil (001)

Ramo: 1212-2

Conta corrente: 43509-0 - Brasil

Caixa Econômica Federal (104)

Ramo: 3076

Conta corrente: 0033-4

Transação: 003 - Brasil

Itaú (341)

Ramo: 3893

Conta corrente: 29567-9 - Brasil

Padrões editoriais para publicação em Semina: Ciências Agrárias , Universidade Estadual de Londrina (UEL)

Os artigos podem ser submetidos em português ou inglês, mas só serão publicados em inglês . Os artigos submetidos em português, se aceitos para publicação, terão que ser **traduzidos para o inglês**.

Artigos enviados à revista até 31 de março de 2014 e aqueles que ainda estão sendo processados podem ser publicados em português; no entanto, a prioridade para publicação será dada aos artigos traduzidos para o inglês.

Todos os artigos, depois de aceitos para publicação, devem ser acompanhados de um certificado de prova de tradução ou correção (como arquivo suplementar) de um dos seguintes serviços de tradução:

[American Journal Experts](#)

[Edição](#)

[Elsevier](#)

<http://www.proof-reading-service.com>

<http://www.academic-editing-services.com/>

<http://www.publicase.com.br/formulario.asp>

<http://www.stta.com.br/>

O autor principal deve anexar o **documento que fornece evidências** dessa tradução ou correção no sistema eletrônico na página de envio em "**Documentos**" . **Sup** .

COMENTÁRIOS:

1) Os manuscritos originais submetidos à revisão são inicialmente avaliados pelo Comitê Editorial da *Semina: Ciências Agrárias* . Nesta avaliação, serão avaliados os requisitos de qualidade para publicação com a revista, como o escopo do artigo, adequação aos padrões da revista, qualidade da redação e fundamentação teórica. Além disso, também é considerada atualização da revisão da literatura, consistência e precisão da metodologia, contribuição dos resultados, discussão dos dados observados no estudo, descrição da tabela e figura, e originalidade e consistência das conclusões.

Se o número de manuscritos submetidos ultrapassar a capacidade de avaliação e publicação da *Semina: Ciências Agrárias*, será feita uma comparação entre as submissões, e as obras consideradas de maior potencial de contribuição ao conhecimento científico serão direcionadas a assessores ad hoc. Os manuscritos não aprovados por esses critérios são arquivados, enquanto os demais manuscritos são submetidos à avaliação de pelo menos dois consultores científicos especialistas na área de assunto do manuscrito, sem identificar os autores. A taxa de submissão não será devolvida aos autores que tiverem seus manuscritos arquivados.

2) Quando apropriado, se o projeto de pesquisa que originou o artigo foi realizado de acordo com os padrões técnicos de biossegurança e ética sob aprovação de um comitê de ética envolvendo seres humanos e / ou um comitê de ética envolvendo animais, o nome da comissão, instituição e número do processo deve ser afirmado.

MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITOS QUANDO:

a) O arquivo principal anexado contém os nomes dos autores e suas respectivas afiliações.

b) O **registro completo** de todos os autores foi adicionado aos metadados durante a submissão; **Exemplo:** nome completo; Instituição / Afiliação; País; Resumo da Biografia / Título / Função.

c) O texto que explica a relevância do trabalho (importância e distinção de trabalhos publicados anteriormente), com um comprimento máximo de 10 linhas, está incluído no campo COMENTÁRIOS AO EDITOR.

d) A submissão é acompanhada por um documento que comprove o pagamento da taxa de submissão como um arquivo suplementar no "**Docs. Sup**" . Seção.

e) O artigo principal é acompanhado por arquivos suplementares, incluindo gráficos, figuras, fotos e outros documentos, EM SUA VERSÃO ORIGINAL (formatos JPEG, TIFF ou EXCEL).

f) As seguintes informações estão incluídas no manuscrito original: título, resumo, palavras-chave em português e inglês, tabelas e figuras.

g) Inclua o ORCID de todos os autores no momento da submissão. O identificador ORCID pode ser obtido a partir do registro ORCID. Você deve aceitar os padrões para a apresentação do iD ORCID e incluir o URL completo (por exemplo: <http://orcid.org/0000-0002-1825-0097>).

RESTRICÇÕES POR ÁREA DE ASSUNTO:

PARA O CAMPO DE AGRONOMIA, OS MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITES EM CASO DE SEGUIMENTO:

- a) Os experimentos conduzidos com cultura *in vitro* estão limitados ao aprimoramento de protocolos já padronizados ou não fornecem novas informações sobre a área temática;
- b) Os experimentos de campo não incluem dados correspondentes a pelo menos dois anos ou a diversos locais dentro do mesmo ano;
- c) Os experimentos referem-se apenas a testes sobre a eficiência de produtos comerciais contra agentes bióticos e abióticos ou estresse fisiológico;
- d) Os experimentos envolvem apenas bioensaios (triagem) sobre a eficácia dos métodos de controle de insetos, ácaros ou doenças em plantas, a menos que contenham uma contribuição importante sobre os mecanismos de ação sob a perspectiva de uma fronteira de conhecimento; ou
- e) O objetivo limita-se a registrar a ocorrência de uma espécie de peste ou patógeno ou associações com hospedeiros em novos locais dentro de regiões geográficas onde a espécie já é conhecida. A documentação de espécies ou associações já conhecidas só será considerada se forem descritas em novas áreas ecológicas. Os registros de distribuição devem ser baseados em ecossistemas e não em limites políticos.

PARA O CAMPO VETERINÁRIO, OS MANUSCRITOS NÃO SERÃO ACEITES EM CASO DE SEGUIMENTO:

- a) A publicação de relatos de casos é restrita; apenas artigos com grande relevância e originalidade que contribuam efetivamente para o avanço do conhecimento no campo serão selecionados para processamento.

Categorias de trabalho

- a) Artigos científicos: no máximo 20 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas
- b) Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas, duas figuras ou uma combinação de uma tabela e uma figura
- c) Relatos de casos: no máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas, duas figuras ou uma tabela e uma figura
- d) Artigos de revisão: no máximo 25 páginas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas

Apresentação do trabalho

Artigos originais completos, comunicações, relatos de casos e resenhas devem ser escritos em português ou inglês usando o Microsoft Word para Windows, em papel tamanho A4, com linhas numeradas por página, espaçamento 1,5 entre linhas, fonte Times New Roman, tamanho 11 normal, Margens de 2 cm em todos os lados, com as páginas numeradas no canto superior direito e seguindo as orientações para o número máximo de páginas de acordo com a categoria do trabalho.

Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e tabelas devem ser numeradas com algarismos arábicos, devem ser incluídas no final do trabalho imediatamente após as referências bibliográficas, e devem ser citadas no texto. Além disso, as figuras devem ser de boa qualidade e devem ser anexadas ao formato original (JPEG, TIFF, etc.) no

Documentos Suplementados na página de envio. Figuras e tabelas não serão aceitas se não cumprirem as seguintes especificações: largura de 8 cm ou 16 cm com altura máxima de 22 cm. Se a figura tiver dimensões maiores, ela será reduzida durante o processo editorial para as dimensões mencionadas acima.

Nota : Figuras (Ex. **Figura 1**. Título) e tabelas (**Tabela 1**. Título) devem ter largura de 8 cm ou 16 cm com altura máxima de 22 cm. Aqueles com maiores dimensões serão reduzidos durante o processo editorial para as dimensões acima mencionadas. Para quaisquer tabelas e figuras que não sejam o trabalho original do autor, é obrigatória uma citação à fonte consultada. Coloque esta citação abaixo da tabela ou figura e indique usando uma fonte menor (Times New Roman 10).

Ex: “ **Fonte**”: IBGE (2017), ou **Fonte** : IBGE (2017).

Preparação de manuscritos

Artigo científico:

Os artigos científicos devem relatar resultados de pesquisa original sobre as áreas relacionadas, com as seções organizadas da seguinte maneira: Título em inglês; Título em Português; Resumo em inglês com palavras-chave (máximo de seis palavras, em ordem alfabética); Resumo em português com palavras-chave (máximo de seis palavras, em ordem alfabética); Introdução; Materiais e métodos; Resultados e Discussão, com Conclusões no final da Discussão ou Resultados (Discussão e Conclusões devem ser escritos separadamente); Agradecimentos; Fornecedores, se aplicável; Referências Bibliográficas. Os títulos devem estar em negrito sem numeração. Se houver necessidade de incluir um subtítulo em uma seção, ele deverá ser colocado em itálico e, se houver outros sub-tópicos para incluir em um subtítulo, eles deverão ser numerados com algarismos arábicos. (Exemplo: **Materiais e Métodos**, *Áreas de estudo*, 1. *Área rural*, 2. *Urban a rea* .)

O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outro lugar com o mesmo conteúdo, exceto na forma de um Resumo em Eventos Científicos, Notas Introdutórias ou Formato Reduzido.

O trabalho deve ser apresentado na seguinte ordem:

- 1. Título do trabalho**, acompanhado de sua tradução em português, se for o caso.
- 2. Resumo e Palavras-chave:** Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 200 palavras e um máximo de 400 palavras, na mesma língua utilizada no texto do artigo, acompanhado de uma tradução em inglês (*Resumo e Palavras-chave*) se o texto não foi escrito em inglês.
- 3. Introdução:** A introdução deve ser concisa e conter apenas a revisão estritamente necessária para introduzir o tópico e apoiar a metodologia e a discussão.
- 4. Materiais e Métodos:** Esta seção pode ser apresentada de forma contínua, descritiva ou com sub-rubricas para permitir ao leitor compreender e ser capaz de repetir a metodologia citada com ou sem o apoio de citações bibliográficas.
- 5. Resultados e Discussão** : *Esta seção* deve ser apresentada de forma clara, com o auxílio de tabelas, gráficos e figuras, para que não suscite dúvidas para o leitor quanto à autenticidade dos resultados e pontos de vista. discutido.
- 6. Conclusões:** *Estes* devem ser claras e apresentadas de acordo com os objetivos propostos no trabalho.
- 7. Agradecimentos:** Pessoas, instituições e empresas que contribuíram para o trabalho devem ser mencionadas no final do texto, antes da seção Referências Bibliográficas.

Nota:

Notas: Cada nota referente ao corpo do texto deve ser indicada com um símbolo sobrescrito imediatamente após a frase e deve ser incluída como uma nota de rodapé no final da página.

Figuras: As figuras consideradas essenciais serão aceitas e deverão ser citadas no texto por ordem numérica, em algarismos arábicos. Se alguma das ilustrações enviadas já tiver sido publicada, a fonte e a permissão para publicação devem ser declaradas.

Tabelas: As tabelas devem ser acompanhadas por um cabeçalho que permita a compreensão dos dados coletados sem a necessidade de utilizar o corpo do texto como referência.

Quantidades, unidades e símbolos:

a) Os manuscritos devem estar de acordo com os critérios estabelecidos nos Códigos Internacionais para cada área temática.

b) Use o Sistema Internacional de Unidades em todo o texto.

c) Use o formato de potência negativa para anotar e apresentar unidades relacionadas: por exemplo, kg ha⁻¹. Não use o símbolo de barra para relacionar unidades: por exemplo, kg / ha.

d) Use um espaço simples entre as unidades: g L⁻¹, não gL⁻¹ ou gL⁻¹.

e) Use a representação de 24 horas com quatro dígitos para as horas e minutos: 09h00, 18h30.

8. citações do autor no texto

As citações devem ser seguidas pelo ano de publicação, e as citações múltiplas devem seguir o sistema de ordem alfabética, de acordo com os seguintes exemplos:

a) Os resultados de Dubey (2017) confirmaram que

b) Segundo Santos et al. (2017), o efeito do nitrogênio

c) Beloti et al. (2017b) avaliou a qualidade microbiológica

d) [...] e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 2017).

e) comprometer a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 2017).

Citações com dois autores

Em citações de fontes que têm dois autores, os nomes dos autores são separados por um ponto-e-vírgula quando citados entre parênteses.

Ex: (PINHEIRO; CAVALCANTI, 2017).

Use *e* quando os autores estiverem incluídos na sentença, em vez de citados entre parênteses.

Ex : Pinheiro e Cavalcanti (2017).

Citando mais de dois autores

Indique o primeiro autor seguido da expressão *et al.*

Entre parênteses, separe as referências com um ponto e vírgula quando mais de uma referência é citada.

Ex: (RUSSO et al., 2017) ou Russo et al. (2017); (RUSSO et al., 2017; FELIX et al., 2017).

Citando vários documentos do mesmo autor , publicados no mesmo ano

Adicione letras minúsculas, em ordem alfabética, após a data e sem espaço.

Ex : (SILVA, 2017a, 2017b).

Citando vários documentos do mesmo autor, publicados em anos diferentes

Separe as datas com uma vírgula.

Ex : (ANDRADE, 2015, 2016, 2017).

Citando vários documentos de vários autores , mencionados simultaneamente

Coloque as citações em ordem alfabética, separadas por um ponto e vírgula.

Ex : (BACARAT, 2017; RODRIGUES, 2017).

9. Referências: As referências, de acordo com a norma NBR 6023, de agosto de 2000, e a reformulação número 14.724 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 2011, devem ser listadas em ordem alfabética no final do artigo. **Todos os autores participantes de um estudo referenciado devem ser mencionados, independentemente do número de participantes**. A exatidão e adequação de referências para trabalhos que foram consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e declarações são de total responsabilidade dos autores.

Nota : Consulte edições recentemente publicadas de *Semina: Ciências Agrárias* para mais detalhes sobre como formatar referências no artigo.

As demais categorias de trabalhos (Comunicação Científica, Relato de Caso e Revisão) devem seguir os padrões acima mencionados, mas com as seguintes instruções adicionais para cada categoria:

Comunicação científica

As comunicações científicas devem ser apresentadas de maneira concisa, mas com uma descrição completa do termo pesquisa ou pesquisa em andamento (nota introdutória), com documentação e metodologias bibliográficas completas, semelhante a um artigo científico regular. As comunicações científicas devem conter as seguintes seções: Título (em português e inglês); Resumo com Palavras-chave em Português; Resumo com palavras-chave em inglês; e Corpo do texto. O corpo do texto não deve ser dividido em seções, mas deve seguir esta seqüência: introdução, metodologia, resultados e discussão (tabelas e figuras podem ser incluídas), conclusão e referências bibliográficas.

Relato de caso

Um relato de caso deve ser uma breve descrição de casos clínicos e patológicos, resultados sem precedentes, relato de novas espécies ou estudos sobre a ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agrônômico, zootécnico ou veterinário. O relato de caso deve conter as seguintes seções: Título (Português e Inglês); Resumo com Palavras-chave em Português; Resumo com palavras-chave em inglês; Introdução com revisão de literatura; relato (s) de caso, incluindo resultados, discussão e conclusão; e referências bibliográficas.

Artigos de revisão bibliográfica

Artigos de revisão devem envolver tópicos relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por edição é limitado, e os autores só podem escrever artigos de revisão de interesse para a revista, após um convite dos membros do conselho editorial da revista. Se um artigo de revisão é submetido por um autor, a inclusão de resultados relevantes do autor ou do grupo envolvido no estudo é necessária, juntamente com referências bibliográficas demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

Um artigo de revisão deve conter as seguintes seções: Título (Português e Inglês); Resumo com Palavras-chave em Português; Resumo com palavras-chave em inglês; Desenvolvimento do tema proposto (o texto pode ser dividido em seções, mas isso não é obrigatório); Conclusões ou Considerações Finais; Agradecimentos (se aplicável); Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

1. A publicação de artigos depende da opinião favorável de assessores ad hoc e da aprovação do Conselho Editorial da *Semina: Ciências Agrárias* UEL.

2. Reimpressões não serão dadas aos autores, pois as edições estarão disponíveis on-line no site da revista (<http://www.uel.br/revistas/uel>).

3. Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do manuscrito para o periódico. A reprodução dos artigos só é permitida quando a fonte é citada. O uso comercial da informação é proibido.

4. Perguntas imprevistas ou problemas nas presentes normas serão tratados pelo Conselho Editorial da área de assunto em que o artigo foi submetido para publicação.

5. *Número de autores*: Não há limite para o número de autores, mas pessoas incluídas como co-autoras devem ter participado efetivamente do estudo. As pessoas com participação limitada no estudo ou na preparação do artigo devem ser citadas na seção Agradecimentos, assim como as instituições que concederam bolsas de estudos e outros recursos financeiros.

Condições de submissão

Como parte do nosso processo de submissão, os autores devem verificar se o envio está de acordo com todos os itens listados abaixo. Submissões que não estiverem em conformidade com os padrões serão rejeitadas e os autores informados sobre a decisão.

1. Os autores devem declarar que a contribuição é original e nova e que não está sendo avaliada para publicação em outro lugar; qualquer exceção deve ser justificada nos “Comentários ao Editor”.

2. Os autores também devem declarar que o material está formatado corretamente e que os Documentos Suplementares estão anexados, **TENDO EM CONTA** que o **formato incorreto resultará na SUSPENSÃO do processo de avaliação SEM AVALIAÇÃO DO MÉRITO** .

3. **Os dados de autoria de todos os autores devem ser inseridos no campo Metadados durante o processo de envio** .

Use o botão " **incluir autor** " .

1. **Na etapa seguinte, preencha os metadados em inglês.**

Para incluir os dados, depois de salvar os dados de envio em português, clique em “ **editar metadados** ” no topo da página. Altere o idioma para inglês e insira o título em inglês, resumo e palavras-chave. Salve e continue na próxima etapa.

1. A **identificação da autoria** do trabalho deve ser removida do arquivo e do Word usando a opção "Propriedades" para garantir os critérios de anonimato do periódico, caso o artigo seja submetido a revisão por pares, de acordo com as instruções disponíveis em Garantia de revisão cega de pares .

2. Os arquivos para envio devem estar no formato Word, OpenOffice ou RTF (desde que não excedam 2 MB).

O texto deve ser digitado em papel A4, com linhas numeradas, espaçamento de 1,5 linhas e fonte Times New Roman tamanho 11.

1. Confirme se todos os padrões éticos foram seguidos se a pesquisa foi realizada com seres vivos. Incluir documentos de prova de aprovação por um comitê de ética institucional envolvendo seres humanos e / ou um comitê de ética envolvendo animais, se esses documentos forem solicitados.

2. **Inclua o pagamento da taxa de envio e anexe o comprovante de pagamento como um documento complementar em " Documentos " . Sup .**

Declaração de direitos autorais

A **Declaração de Direitos Autorais** para artigos publicados nesta revista é o direito do autor. Como os artigos publicados nesta revista são de acesso aberto, os artigos

podem ser utilizados livremente, com atribuições próprias, para fins educacionais e não comerciais.

A revista tem o direito de fazer alterações em nível normativo, ortográfico e gramatical nos artigos originais, com o objetivo de manter o uso padrão adequado do idioma e a credibilidade do periódico. No entanto, o estilo de escrita dos autores será respeitado.

Alterações, correções ou sugestões em nível conceitual, quando necessário, serão direcionadas aos autores.

As opiniões expressas pelos autores dos artigos são de sua exclusiva responsabilidade.

Política de Privacidade

Os nomes e afiliações relatados nesta revista são utilizados exclusivamente para os serviços prestados e não são disponibilizados para qualquer outra finalidade ou para terceiros.

Semina: Ciências Agrárias

- Londrina - PR

ISSN 1676-546X

E-ISSN 1679-0359

semina.agrarias@uel.br