

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**USO COMBINADO DE COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO
CONTROLE DO NEMATÓIDE CAUSADOR DE LARVA MIGRANS
CUTÂNEA**

JOSÉ ANTONIO CORREIA LIMA

VILA VELHA

FEVEREIRO/2020

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**USO COMBINADO DE COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO
CONTROLE DO NEMATÓIDE CAUSADOR DE LARVA MIGRANS
CUTÂNEA**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

JOSÉ ANTONIO CORREIA LIMA

VILA VELHA

FEVEREIRO/2020

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UWV-ES

L732u

Lima, José Antonio Correia.

Uso combinado de compostos químicos e biológicos no controle do nematóide causador da larva migrans cutânea / José Antonio Correia Lima. – 2020.

14 f. : il.

Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Vila Velha, 2020.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia e terapêutica. 2. Controle biológico.
I. Braga, Fábio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 615

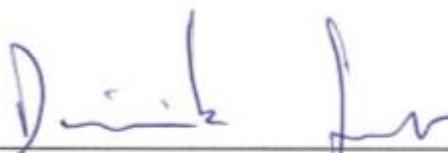
JOSÉ ANTONIO CORREIA LIMA

**USO COMBINADO DE COMPOSTOS QUÍMICOS E BIOLÓGICOS NO
CONTROLE DO NEMATÓIDE CAUSADOR DE LARVA MIGRANS CUTÂNEA**

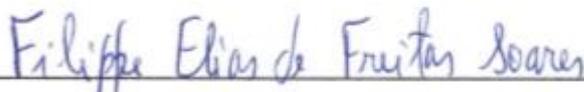
Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciências
Farmacêuticas, para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Aprovado em 12 de fevereiro de 2020

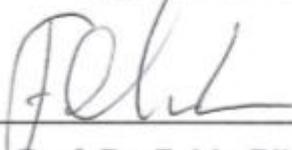
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Dominik Lenz (UVV)



Prof. Dr. Filipe Elias de Freitas Soares (UFLA)



Prof. Dr. Fabio Ribeiro Braga (UVV)

Orientador

Dedico este trabalho a Deus, a minha amada esposa, aos meus pais, ao meu orientador, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter concedido essa oportunidade em minha vida.

A Universidade Vila Velha (UVV) pela oportunidade e confiança e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela minha bolsa de estudos.

Aos meus amados pais, Jonas e Raquel por todo suporte, amor e incentivo no período de todo estudo deste trabalho.

A minha amada esposa Marina Reinholz por todo apoio necessário, paciência, carinho e ajuda nos momentos de dificuldades.

Ao meu orientador, professor Dr. Fábio Ribeiro Braga, por toda sua contribuição, apoio, incentivo e por sua amizade, que sempre acreditou em mim e no meu potencial, além de sua dedicação, seriedade, competência, atenção e sugestões, no qual foram preponderantes para conclusão deste trabalho.

Ao meu amigo e professor Msc. José Carlos, minha referência profissional enquanto enfermeiro e professor, por todo seu apoio e sua amizade e minha amiga Carolina Magri pela ajuda na realização da pesquisa nos laboratórios.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas que contribuíram para minha formação e aos funcionários da UVV, Alan e Edson por toda ajuda.

SUMÁRIO

Introdução.....	03
Materiais e Métodos.....	04
Resultados e discursão.....	05
Referências.....	09

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

BDA2%: Batata-dextrose-ágar 2%

L₃: Larva de terceiro estágio

LMC: Larva Migrans Cutânea

NF34: *Monacrosporium thaumasium*

RESUMO

LIMA, JOSÉ ANTONIO CORREIA, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, fevereiro de 2020. **Uso combinado de compostos químicos e biológicos no controle do nematóide causador de larva migrans cutânea.** Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso combinado de distintos compostos químicos (albendazol, ivermectina, glicerina e vaselina) e biológico (*Monacrosporium thaumasium*) no controle de larvas infectantes (L₃) de *Ancylostoma caninum*. L₃ de *A. caninum* foram obtidas de coproculturas de fezes positivas de cães naturalmente infectados. Foram utilizados: ivermectina 1% albendazol 1%, glicerina e vaselina 100% e um isolado de fungo nematófago *M. thaumasium* (NF34). A seguir foi montado o ensaio experimental com dezesseis (16) grupos em micropoços, sendo cada grupo com cinco repetições, com interação de 24 horas. G1 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 120 conidia/30 µl of *Monacrosporium thaumasium*; G2 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl albendazol; G3 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl of ivermectin 1%); G4 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 160 µl glicerina); G5 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 160 µl vaselina); G6 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl albendazol + 120 conidia/30 µl of *M. thaumasium*); G7 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl ivermectina 1% + 120 conidia/30 µl of *M. thaumasium*); G8 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 160 µl glicerina + 120 conidia/30 µl of *M. thaumasium*); G9 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 160 µl vaselina + 120 conidia/30 µl of *M. thaumasium*); G10 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl albendazol + 10 µl of ivermectin 1%); G11 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl albendazol + 160 µl glicerina); G12 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl albendazol + 160 µl vaselina); G13 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 160 µl vaselina + 160 µl glicerina); G14 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl of ivermectin 1% + 160 µl vaselina + 160 µl glicerina); G15 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 10 µl of ivermectin 1% + 160 µl vaselina) e G16 (120 L3 de *A. caninum*/30 µl + 160 µl H₂O). Dos 15 grupos experimentais, apenas o G5 sem combinações (vaselina) não apresentou diferença ($p > 0,05$) na redução das L3 em relação ao grupo controle. Por outro lado, os demais grupos (G1 a G14) que contiveram algum composto químico, biológico (NF34) e ou seu uso combinado (químico + biológico) apresentaram diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Conclui-se que o uso combinado, mesmo que em caráter experimental de drogas antihelmínticas com o controle biológico foi eficiente. Todavia, mais estudos devem ser realizados para que se possa elucidar a ação sinérgica entre o controle químico e biológico, a ser utilizado no futuro no controle efetivo de ancilostomídeos.

Palavras-chaves: Ancilóstomos, Controle biológico, larva migrans cutânea.

ABSTRACT

LIMA, JOSÉ ANTONIO CORREIA, M.Sc, University of Vila Velha – ES, february 2020. **Combined use of chemical and biological compounds without control of the nematode that causes cutaneous migratory larvae.** Advisor: Fábio Ribeiro Braga.

The aim of this study was to evaluate the combined use of different chemical (albendazole, ivermectin, glycerin, and vaseline) and biological (*Monacrosporium thaumasium*) compounds in the control of *Ancylostoma caninum* infective larvae (L₃). *A. caninum* L₃ were obtained from coprocultures of positive feces from naturally infected dogs. We used: 1% ivermectin, 1%, albendazole, glycerin, 100% vaseline, and an isolate of the nematophagous fungus *M. thaumasium* (NF34). Next, an experimental test was set up with sixteen (16) groups in microwells, each group having five replicates with a 24-hour interaction. G1 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 120 conidia/30 µL of *Monacrosporium thaumasium*); G2 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL albendazole); G3 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL 1% ivermectin); G4 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 160 µL glycerin); G5 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 160 µL vaseline); G6 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL albendazole + 120 conidia/30 µL of *M. thaumasium*); G7 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL 1% ivermectin + 120 conidia/30 µL of *M. thaumasium*); G8 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 160 µL glycerin + 120 conidia/30 µL of *M. thaumasium*); G9 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 160 µL vaseline + 120 conidia/30 µL of *M. thaumasium*); G10 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL albendazole + 10 µL of 1% ivermectin); G11 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL albendazole + 160 µL glycerin); G12 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL albendazole + 160 µL vaseline); G13 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 160 µL vaseline + 160 µL glycerin); G14 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL 1% ivermectin + 160 µL vaseline + 160 µL glycerin); G15 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 10 µL 1% ivermectin + 160 µL vaseline); and G16 (120 *A. caninum* L₃/30 µL + 160 µL H₂O). From the 15 experimental groups, only G5 without combinations (vaseline) showed no difference ($p > 0.05$) in L₃ reduction in relation to the control group. On the other hand, the other groups (G1 to G14) that contained any chemical or biological compound (NF34) and/or their combined use (chemical + biological) showed a difference of $p < 0.05$ in relation to the control group. It was concluded that, even on an experimental basis, the combined use of anti-helminthic drugs with biological control was efficient; however, more studies must be carried out in order to elucidate the synergistic action between chemical and biological compounds to be used in the effective control of hookworms in the future.

Keywords: Hookworms, Biological Control, Cutaneous larva migrans.

1. INTRODUÇÃO

A ancilostomiase é uma doença tropical negligenciada causada por nematoides das espécies *Ancylostoma caninum* e *A. braziliensis* e assume nos cães seu papel mais patogênico. Na vertente da saúde pública, este nematoide também assume um papel importante na etiologia da larva migrans cutânea (LMC), devido à presença de larvas infectantes (L₃) no solo e seu ciclo evolutivo acaba acidentalmente ocorrendo em humanos (Traub et al., 2005; Traub et al., 2013; Jourdan et al., 2018; Mello et al., 2014). Globalmente, estima-se que 440 milhões de pessoas estejam infectadas com ancilostomídeos e os prejuízos gerais na casa dos US \$ 139 bilhões anuais (Hu et al., 2002). No Brasil, a literatura é bem vasta quando o assunto é LMC em praticamente todo o território nacional os índices são alarmantes e requerem medidas públicas de controle, não somente o parasitário e, que sejam eficazes (Araújo et al., 1999; Scaini et al., 2003; Santarém et al., 2004; Carvalho et al., 2011a).

Já existe a comprovação de resistência parasitária em populações do ancilóstomo canino (Jackson et al., 1987, Hopkins et al., 1989, Hopkins and Gyr, 1991, Kopp et al., 2007; Sunderkoetter et al., 2014). Por outro lado, deve ser ressaltada a importância de se conhecer a epidemiologia de *A. caninum* e não somente tratar as infecções. Albonico et al. (2003) estudaram a eficácia de mebendazol e levamisol, sozinhos ou combinados, em infecções intestinais causadas por nematoides em crianças e registraram que o uso combinado dos medicamentos apresentou taxa de cura maior em comparação ao tratamento com apenas uma molécula. Nesse sentido, a busca por medidas colaborativas de combate as L₃ pode vir a ser uma estratégia interessante (Carvalho et al., 2011b; Ferraz et al., 2019).

No tratamento de LMC, utilizam-se as drogas antihelmínticas como o Albendazol ou a Ivermectina administrados por via oral e ou tópica, que são eficazes (Gao and Liu, 2019). No tratamento tópico, utilizam-se veículos, sobretudo, em pomadas, géis e cremes, que ajudam na facilitação de drogas e bem como de outras substâncias por meio da epiderme. Como exemplos de veículos tem-se a glicerina e a vaselina, as quais são utilizadas amplamente na indústria. Dessa forma, trabalhos que visem o uso combinado de tratamentos já consagrados (Sunderkötter et al.,

2014) e bem como do controle biológico efetivo (Carvalho et al. 2011) das L₃ de *A. caninum* podem no futuro combater a causa da LMC, e com isso diminuir o problema desta infecção.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso combinado de ivermectina, albendazol, vaselina e glicerina com o fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* (NF34) no controle *in vitro* de L3 *A. caninum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local do experimento

O ensaio experimental foi realizado no de Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico e no Laboratório Clínico e de Parasitologia Veterinária “BIOCONTROL” da Universidade Vila Velha (UVV).

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Universidade Vila Velha, sob o número 306.

2.2. Obtenção de larvas de *A. caninum*.

Larvas de terceiro estágio de *A. caninum* foram obtidas de fezes frescas de cães naturalmente infectados. Para o processamento das fezes, foi realizado o teste de Willis para encontrar amostras positivas. Posteriormente, procedeu-se o preparo de coproculturas e a seguir foram mantidas em uma câmara de incubação por 10 dias a 26 ° C. Após esse período, as larvas foram extraídas pela técnica de Baermann e identificadas como *A. caninum*, de acordo com os critérios descritos por Urquhart et al. al (1989).

2.3. Tratamento

No presente trabalho foram utilizados: ivermectina 1% (Merial, Brasil), albendazol 1% (Vetnil, Brasil), Glicerina e Vaselina 100% (União química, Brasil). Estes compostos foram obtidos no comércio local e têm sido utilizados em protocolo de tratamento tópico da LMC.

Além destes compostos, foi utilizado um isolado de fungo nematófago, o *Monacrosporium thaumasium* (NF34). Este isolado, está presente no solo brasileiro e é proveniente do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. A seguir, o isolado foi repicados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro

contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar 2% (BDA2%). O crescimento micelial em toda a placa foi observado após 7 dias de cultivo. Para obtenção de uma solução de conídios de NF34, 5 ml de água destilada foram adicionados em cada placa de Petri e com auxílio de uma espátula os conídios e fragmentos miceliais foram vertidos em tubos *Falcon* de 15 ml (Araújo and Maia, 1993).

2.4. *Ensaio experimental*

Foram formados dezesseis (16) grupos experimentais em microtubos, sendo cada grupo com cinco repetições. Os valores de L₃ de *A. caninum* e conídios utilizados nos grupos foram padronizados por meio de alíquotas, mantendo concentrações de: 120 nematoides; albendazol 10µl; ivermectina 10 µl; glicerina 160 µl; vaselina 160 µl; conídios 120 µl. Os grupos experimentais estão descritos a seguir na Tabela 1. Após 24 horas da interação das L₃ versus ivermectina 1%, albendazol 1%, glicerina, vaselina e NF34, o conteúdo de todos os microtubos dos grupos G1 a G16 foi lido, por meio de microscopia de luz, objetiva de 10x e o número de L₃ vivos foi contabilizado (Mukhtar and Pervaz, 2003; Ferraz et al., 2019).

2.5. *Análise estatística*

A seguir, os resultados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e pós teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2003). O percentual de redução foi calculado utilizando-se a seguinte equação: % Redução= média de L₃ vivos recuperados no grupo controle – média de L₃ vivos recuperados no grupo tratado x 100/média de L₃ vivos recuperados no grupo controle (Mendoza de Gives and Vasquez-Prates, 1994).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho foi verificada ação dos compostos químicos (albendazol, ivermectina, glicerina e vaselina) e biológico (NF34) sobre as L₃ de *A. caninum*, após o período de 24 horas. Dos 15 grupos experimentais, apenas o G5 sem combinações (vaselina) não apresentou diferença (p>0,05) na redução das L₃ em relação ao grupo controle. Por outro lado, os demais grupos (G1 a G14) que contiveram algum composto químico, biológico (NF34) e ou seu uso combinado

(químico + biológico) apresentaram diferença ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle. Todos os resultados melhor exemplificados estão na Tabela 2.

O G1 (NF34) demonstrou ao final de 24 horas um percentual de 45,6% na redução de L₃. Foi observado ainda que o grupo G2 (albendazol) e G3 (ivermectina) não combinados, apresentaram as maiores reduções de L₃ *A. caninum*, 88,6% e 81,6%, respectivamente, enquanto o G4 (Glicerina) e o G5 (Vaselina) apresentaram as menores reduções das L₃. (Tabela 2).

Os resultados do uso combinado de *M. thaumasium* (N34) + os compostos químicos também foram interessantes. Quando associado com o albendazol (G6) e ou com a ivermectina (G7), o percentual médio de redução foi 56,5%. Quando o NF34 foi usado com a glicerina (G8) e ou com a vaselina (G9) o percentual médio de redução das L₃ de *A. caninum* encontrado foi de 48,8%.

O uso combinado de albendazol com a ivermectina (G10) demonstrou uma eficácia de 77,6%. Já a utilização da associação do albendazol com a glicerina (G11) e/ou vaselina (G12), também demonstrou eficiência na redução das L₃ e na média geral apresentou 55,9% após 24 de interação. Já o uso combinado de glicerina com a vaselina (G13) apresentou redução de 30,5%. Por outro lado, o uso combinado da Ivermectina com a Glicerina (G14) e/ou Vaselina (G15) apresentou eficácia média de 61,9% na redução das L₃.

Como descrito anteriormente o controle efetivo ambiental de L₃ de *A. caninum* ainda carece de mais pesquisas (Braga et al., 2011). Por outro lado, o tratamento químico preconizado para a infecção causada pelas L₃ na pele humana (LMC) é baseado na utilização de drogas anti-helmínticas orais ou tópicas, embora efetivo, pode apresentar o risco de alguns efeitos colaterais, contraindicação por idade e mesmo resistência parasitária e ou mesmo ineficácia (Tekely et al., 2013; Veraldi et al., 2017).

Desta forma, neste trabalho, um dos objetivos foi justamente avaliar o uso combinado das drogas antihelmínticas (controle químico) com o fungo *M. thaumasium* (biológico) e glicerina e vaselina, vislumbrando talvez no futuro seu uso combinado. Por outro lado, os autores reconhecem que não existem trabalhos que poderiam justificar a utilização de um grupo composto por NF34 + albendazol + ivermectina + glicerina + vaselina, uma vez que não existe nenhum relato do uso tópico de fungos nematófagos em humanos.

Corroborando com este fato, o trabalho de Araújo and Guimarães (2002) foi pioneiro em utilizar uma solução contendo o fungo NF34 diretamente no conduto auditivo de bovinos infectados pelo nematoide *Rhabditis* spp, causador da otite parasitária. Em recente trabalho, Ferraz et al (2019) provaram que o uso combinado do dimetilsulfóxido a 1% e óleo mineral a 100% e conídios fúngicos foi eficiente no controle deste nematoide, no entanto, já existia a premissa da utilização tópica de NF34 feita naquela época por Araújo e Guimaraes (2002) apenas em animais. Os resultados de Ferraz et al. (2019) serão utilizados em outro delineamento em condições a campo.

Em contrapartida, foi observado mais uma vez que, no futuro a utilização de NF34 com drogas antihelmínticas poderá vir a ser uma estratégia a ser melhor estudada (Ferraz et al. 2019), uma vez que existe possível ação fungicida relatada na literatura que tanto o Albendazol quanto a Ivermectina possuem (Vieira et al., 2017). Em síntese, realizando uma simples comparação entres os grupos experimentais registraram-se os seguintes percentuais de redução: no G6 (NF34 + Albendazol) foi registrada uma redução de 78,6%; no G7 (NF34 + Ivermectina) foi registrado uma redução de 35,5% e no G10 (Albendazol + Ivermectina) foi registrada uma redução de 77,6% sobre as L3. Vieira et al. (2017) mencionaram que compostos antiparasitários têm um efeito inibitório in vitro em fungos nematófagos, comprometendo a sua atividade como agente de controle biológico, o que pode ser observado no grupo G7.

Como descrito anteriormente o G5 sem combinações (vaselina) não apresentou diferença ($p > 0,05$) na redução das L3 em relação ao grupo controle. Esse fato pode ser melhor explicado devido sua propriedade hidrófoba, ou seja, praticamente não se dissolve em água, uma vez que a solução de conídios/clamidósporos utilizada foi líquida. Mas como a vaselina é usada como base em muitos produtos cosméticos, foi decido inserir no delineamento do trabalho.

No presente trabalho, nos grupos G11 a G15, o uso combinado do albendazol e ou Ivermectina com glicerina e vaselina, foi interessante, com resultados pontuais de redução.

No G 13 foi verificado um percentual de redução de 30,5% em relação ao grupo controle. Foi descrito anteriormente que as propriedades hidrófobas da vaselina, podem ter impedido a completa atividade dos conídios. Por outro lado, a glicerina possui propriedades emolientes, lubrificantes, umectantes, hidratantes e

higroscópicas que contribuem para absorção da água, e dessa forma pode ter havido uma certa “compensação” entre os compostos. De qualquer maneira, tanto a glicerina quanto a vaselina, estão presentes em produtos tópicos farmacêuticos e foram aqui testadas como veículos vislumbrando no futuro seu uso combinado.

Por outro lado, devido ao aparecimento da resistência parasitária de ancilostomídeos (Koop et al., 2007) em cães e no aumento preocupante dos casos de LMC no mundo (Alcântara et al., 2019; Dégboé et al., 2019; Gerbig and Kempf, 2019) justifica o estudo de alternativas associativas que possam ajudar no controle da causa desta infecção, ou seja, na destruição das L₃ de *A.caninum*. O caráter inovativo foi trazer a luz do conhecimento científico o desafio do uso combinado, mesmo que em caráter experimental de drogas antihelmínticas e o fungo nematófago *M. thaumasium*, colaborando assim cada vez mais com estudos que possam elucidar a ação sinérgica entre o controle químico e biológico, frente aos problemas causados por ancilostomídeos. Conclui-se no presente trabalho que a associação do fungo nematófago *Monacrosporium thaumasium* com drogas anti-helmínticas, glicerina e vaselina foi eficiente na redução das larvas de *A.caninum*, podendo ser no futuro utilizado como método de controle.

4. REFERÊNCIAS

- Albonico M., Bickle Q., Ramsan M., Montresor A., Savioli L., Taylor M., 2003. Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bulletin of the World Health Organization* 81 (5), 343-352.
- Alcântara A, Soldevila L, Valerio L, Roure S, Pérez-Quílez O, Martínez-Cuevas O, Villanova X. Cutaneous larva migrans or the wandering invader. Description of 16 cases in the Northern Metropolitan area of Barcelona. 2019. *Travel Med Infect Dis*.
- Araújo, F.R., Crocci, A.J., Rodrigues, R.G.C., Avalhaes, J.S., Miyoshi, M.I., Salgado, F.P., Silva, M.A., Pereira, M.L., 1999. Contaminação de praças públicas de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, por ovos de *Toxocara* e *Ancylostoma* em fezes de cães. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32 (5), 581-583.
- Araújo, J.V., Guimarães, M.P., 2002. Ação do fungo predador de nematóides *Monacrosporium thaumasium* sobre *Rhabditis spp.* *Revista Ciência Animal* 12 (2), 129-132.
- Araújo, J.V., Santos, M.A., Ferraz, S., Maia, A.S., 1993. Antagonistic Effect Of Predacious *Fungi Arthrobotrys* On Infective *Haemonchus Placei* Larvae. *Journal of Helminthology* 67 (2), 136-138.
- Ayres M., Ayres J.R., Ayres D.L., Santos A.S., 2003. *BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília, D.F.: CNPq; 2003.
- Braga, F.R., Araujo, J.M., Silva, A.R., Araújo, J.V., Carvalho, R.O., Tavela, A.O., Silva, M.E., Fernandes, F.M., Melo, A.L., 2011. Destruição de larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis* pelos fungos *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys robusta* e *Monacrosporium sinense*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44, 389-391.

Carvalho, R. O., Araújo, J. M., Braga, F.R., Milagres, C., Araújo, J. V., Conceição, L.G., Oliveira, A. C., 2011a. Frequência de helmintoses intestinais em cães da microrregião de Viçosa, Minas Gerais. *Revista Universidade Rural Série Ciências da Vida* 31.

Carvalho, R.O., Braga, F.R., Araújo, J.V. Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma spp.* infective larvae in dogs. *Veterinary Parasitology (Print)*, v. 176, p. 236-239, 2011b.

Dégboé B., Koudoukpo C., Maffo N., Otémé S., Kouassi A., Akpadjan F., Agbéssi N., Elégbédé-Adégbité N., Kalogama J., Hougbo O., Adégbidi H., Atadokpèdé F., 2019. Prurigo in Children of Tropical Zone: Epidemiological, Clinical, and Etiological Characteristics in a Dermatology Department in Cotonou (Benin). *Dermatology Research and Practice*.

Ferraz, C.M., Sobral, S.A., Senna, C.C., Fidelis Junior, O., Moreira, T.F., Tobias, F.L., Soares, F.E.F., Geniêr, H.L.A., Vilela, V.L.R., Lima, J.A.C., Araújo, J.V., Braga, F.R., 2019. Combined use of ivermectin, dimethyl sulfoxide, mineral oil and nematophagous fungi to control *Rhabditis spp.*. *Veterinary Parasitology* 275, 108924.

Gao YL, Liu ZH. Cutaneous Larva Migrans with Löeffler's Syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 2019 Mar;100(3):487-488

Gerbig A.W., Kempf W., 2019. Topical treatment of cutaneous larva migrans with ivermectin 1%. *International Journal of Dermatology*.

Hopkins, T.J., Gyr, P., 1991. Synergism of a combination of febantel and pyrantel embonate against *Ancylostoma caninum* on dogs. *Veterinary Medical Review* 61, 3–9.

Hopkins, T.J., Gyr, P., Schimmel, A., 1989. The effect of pyrantel embonate with oxantel embonate-praziquantal, pyrantel embonate with febantel-praziquantal and milbemycin oxime on natural infestations of *Ancylostoma caninum* in dogs. *Australian Veterinary Practitioner* 28, 53–56.

- Hu, M., Chilton N.B., Gasser, R.B., 2002. The mitochondrial genomes of the human hookworms, *Ancylostoma duodenale* and *Necator americanus* (Nematoda: Secernentea). *International Journal of Parasitology* 32 (2), 145-158.
- Jackson, R., Lance, D., Townsend, K., 1987. Isolation of anthelmintic resistant *Ancylostoma caninum*. *New Zealand Veterinary Journal* 35, 215–216.
- Jourdan, P.M., Lamberton P.H.L., Fenwick A., Addiss D.G., 2018. Soil-transmitted helminth infections. *The Lancet* 391 (10117), 252-265.
- Kopp, S.R., Kotze, A.C., McCarthy, J.S., Coleman, G.T., 2007. Highlevel pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Veterinary Parasitology* 143, 299–304.
- Mello I.N.K., Braga F.R., Monteiro T.S.A., Freitas L.G., Araujo J.M., Soares F.E.F., Araújo J.V., 2014. Biological control of infective larvae of *Ancylostoma spp.* in beach sand. *Revista Iberoamericana de Micología* 31(2), 114-118.
- Mendoza-De Gives, P., Vazquez-Prats, V.M. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Vet. Parasitol.*, 5 (3) (1994), pp. 197-203.
- Mukhtar T., Pervaz I., 2003. *In vitro* evaluation of ovicidal and larvicidal effects of culture filtrate of *Verticillium chlamyosporium* against *Meloidogyne javanica*. *International Journal of Agriculture and Biology* 5, 576-579.
- Santarém, V.A., Giuffrida, R., Zanina, G.A., 2004. Larva *migrans* cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larvas de *Ancylostoma spp* em parque público do município de Taciba, São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37 (2), 179-181.
- Scaini, C.J., Toledo, R.N., Lovatel, R., Dionello, M.A., Gatti, F.A., Susin, L., Signorini, V.R.M., 2003. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (5).
- Sunderkötter, C., Stebut, E.V., Schöfer H., Mempel, M., Reinel, D., Wolf, G., Meyer, V., Nast, A., Burchard G., 2014. S1 guideline diagnosis and therapy of cutaneous

larva migrans (creeping disease). Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft 12 (1),

Traub, R.J., 2013. *Ancylostoma ceylanicum*, a re-emerging but neglected parasitic zoonosis. International Journal for Parasitology 43 (12-13), 1009-1015.

Traub, I.D. Robertson, P.J. Irwin, N. Mencke, R.C.A.A. Thompson. Canine gastrointestinal parasitic zoonoses in India Trends Parasitol., 21 (2005), pp. 42-48.

Tekely E., Szostakiewicz B., Wawrzycki B., Kądziela-Wypyska G., Juskiewicz-Borowiec M., Pietrzak A., Chodorowska G. Cutaneous larva migrans syndrome: a case report. Postepy Dermatol Alergol. 2013 Apr;30(2):119-21.

Urquhart G. M. - Armour J. - Duncan J. L. - Dunn A. M. - Jennings F. W. Veterinary Parasitology. Longman Sc. & Tec., Harlow.1989.

Veraldi S., Angileri L., Parducci B.A., Nazzaro G., 2017. Treatment of hookworm-related cutaneous larva migrans with topical ivermectin. J Dermatolog Treat 28(3), 263.

Vieira, J.N., Maia Filho, F.S., Ferreira, G.F., Mendes, J.F., Gonçalves, C.L., Villela, M.M., Pereira, D.I.B., Nascente, P.S., 2017. *In vitro* susceptibility of nematophagous fungi to antiparasitic drugs: interactions and implications for biological control. Brazilian Journal of Biology 77(3), 476-479.

Tabela 1. Grupos experimentais (G1 a G16) projetados para avaliar o uso combinado de *Monacrosporium thaumasium*, ivermectina a 1%, albendazol, glicerina, vaselina e controle no *Ancylostoma caninum* L₃.

Grupos	Desenho Experimental
G1	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 120 conidia/30 µl of <i>Monacrosporium thaumasium</i>
G2 (controle positivo)	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl albendazol
G3 (controle positivo)	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl of ivermectin 1%
G4	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 160 µl glicerina
G5	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 160 µl vaselina
G6	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl albendazol + 120 conidia/30 µl of <i>M. thaumasium</i>
G7	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl ivermectina 1% + 120 conidia/30 µl of <i>M. thaumasium</i>
G8	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 160 µl glicerina + 120 conidia/30 µl of <i>M. thaumasium</i>
G9	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 160 µl vaselina + 120 conidia/30 µl of <i>M. thaumasium</i>
G10	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl albendazol + 10 µl of ivermectin 1%
G11	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl albendazol + 160 µl glicerina
G12	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl albendazol + 160 µl vaselina
G13	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 160 µl vaselina + 160 µl glicerina
G14	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl of ivermectin 1% + 160 µl vaselina + 160 µl glicerina
G15	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 10 µl of ivermectin 1% + 160 µl vaselina
G16	120 L ₃ de <i>A. caninum</i> /30 µl + 160 µl H ₂ O

Tabela 2. Médias, erro padrão e percentual de redução de larvas de *Ancylostoma caninum* recuperadas, nos grupos experimentais (G1 a G16) depois de 24 horas de interação.

Grupos	Média (erro padrão)	% Redução
G1 - NF34 + L ₃	45.6 ± 5.5	46
G2 - Albendazol + L ₃	9.4 ± 7.0	88.4
G3 - Ivermectina + L ₃	15.6 ± 3.7	81.6
G4 - Glicerina + L ₃	76.2 ± 2.5	10.5
G5 - Vaselina + L ₃	81.6* ± 5.0	4.2
G6 - NF34 + Albendazol + L ₃	18.2 ± 4.2	78.6
G7 - NF34 + Ivermectina + L ₃	55.8 ± 3.0	34.5
G8 - NF34 + Glicerina + L ₃	29.8 ± 8.0	65
G9 - NF34 + Vaselina + L ₃	57.2 ± 7.3	32.8
G10 - Albendazol + Ivermectina + L ₃	19 ± 8.4	77.6
G11 - Albendazol + Glicerina + L ₃	22.8 ± 12.6	73.2
G12 - Albendazol + Vaselina + L ₃	52.2 ± 4.6	38.7
G13 - Glicerina + Vaselina	59.2 ± 6.6	30.5
G14 - Ivermectina + Glicerina + L ₃	26 ± 9.0	69.4
G15 - Ivermectina + Vaselina + L ₃	38.8 ± 4.0	54.4
G16 - H ₂ O + L ₃	85.2* ± 4.0	-

Asterisco denota diferença estatística (p < 0,01)