

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA OVICIDA *IN VITRO* DE DESINFETANTES
COMERCIAIS ASSOCIADOS OU NÃO AO FUNGO NEMATÓFAGO
DUDDINGTONIA FLAGRANS (AC001) SOBRE OVOS DE *TOXOCARA
CANIS***

CAROLINA PERIN MOTTA

**VILA VELHA
MAIO / 2021**

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA OVICIDA *IN VITRO* DE DESINFETANTES
COMERCIAIS ASSOCIADOS OU NÃO AO FUNGO NEMATÓFAGO
DUDDINGTONIA FLAGRANS (AC001) SOBRE OVOS DE *TOXOCARA*
*CANIS***

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

CAROLINA PERIN MOTTA

VILA VELHA
MAIO / 2021

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M921a

Motta, Carolina Perin.

Avaliação da eficácia ovicida *in vitro* de desinfetantes comerciais associados ou não ao fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) sobre ovos de *Toxocara canis* / Carolina Perin Motta. – 2021.

43 f. : il.

Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

Dissertação (mestrado em Ciência Animal) –
Universidade Vila Velha, 2021.

Inclui bibliografias.

1. Medicina Veterinária. 2. Animais domésticos. 3. Controle Biológico. I. Braga, Fábio Ribeiro. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.89

CAROLINA PERIN MOTTA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA OVICIDA *IN VITRO* DE
DESINFETANTES COMERCIAIS ASSOCIADOS OU NÃO AO
FUNGO NEMATOFAGO *DUDDINGTONIA FLAGRANS* (AC001)
SOBRE OVOS DE *TOXOCARA CANIS***

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal, para a
obtenção do grau de Mestre (a) em
Ciência Animal.

Aprovada em 25 de maio de 2021,

Banca Examinadora:

Filippe Elias de Freitas Soares

Prof. Dr. Filippe Elias de Freitas Soares – (Universidade Federal de Lavras)

Chronsho

Prof.^a. Dr.^a. Cristiane dos Santos Honsho – (Universidade Vila Velha)

Fábio Ribeiro Braga

Prof. Dr. Fábio Ribeiro Braga – (Universidade Vila Velha)

Orientador

*Este trabalho é dedicado aos meus pais, à
minha filha e ao meu esposo, que sempre me
apoiaram desde o início de minha carreira na
Medicina Veterinária.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por tudo que me proporcionou para chegar até aqui.

Aos meus pais por me permitirem realizar o sonho de me tornar médica veterinária, pelo apoio incondicional, ajuda financeira e compreensão para com minha ausência na reta final deste trabalho.

Ao meu esposo Ubiratan, que não me deixou desistir quando eu me via sem forças para seguir em meio à pandemia, onde tudo se tornou mais difícil.

À minha filha Larissa, que me apoiou e ajudou muito na realização dessa pesquisa, enquanto acadêmica de Farmácia da Universidade Vila Velha;

Aos meus filhos felinos Catarina e Angel, que junto com a Larissa são a razão da minha alegria diária, e que nunca saem do meu lado, independente da ocasião.

Ao meu irmão Arthur, que me ajudou com a tradução e formatações do trabalho.

À parceira e amiga Carol Magri, que me ensinou tanto, desde à rotina básica laboratorial até a execução do experimento, pois sem sua ajuda eu certamente não teria conseguido.

Ao meu professor e orientador Fábio Braga, que quando por diversas vezes eu quis desistir diante de todas as dificuldades que enfrentei nesses 2 anos de mestrado, me apoiou e esteve do meu lado para que esse trabalho fosse concluído com êxito.

Ao professor e amigo Rodrigo Horta, que foi meu grande incentivador para ingressar no mestrado, que acreditou no meu potencial e sempre me apoiou.

Aos meus amigos Dariele, Tâmara, Neriana e Heverton, que me escutaram e dividiram comigo as angústias do mestrado e dos projetos de cada um, para juntos conseguirmos seguir em frente.

A todos aqueles, professores, familiares, amigos, pacientes e tutores, que tanto contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional na Medicina Veterinária.

Meus agradecimentos a todos vocês, do fundo do coração, pois graças à ajuda e carinho de todos, me torno uma pessoa melhor a cada dia!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	7
2.1. Toxocara canis e toxocaríase.....	7
2.2. Potencial zoonótico do Toxocara canis	10
2.3. Desinfetantes comerciais.....	12
2.4. Fungos nematófagos	13
2.5. Perspectivas no controle parasitário de cães e gatos	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo Geral.....	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Toxocara canis	18
4.2. Desinfetantes e Duddingtonia flagrans (AC001)	18
4.3. Ensaio experimental	19
4.4. Análise estatística	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÕES.....	26
7. REFERÊNCIAS.....	27
8. ANEXOS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microtubos utilizados no ensaio experimental, mantidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UVV durante o período do experimento.....42

Figura 2. Dia 21: G1: Hifas e clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* aderidas (seta preta) a casca e ovo degenerado de *Toxocara canis* (seta branca). Objetiva 10x.....42

Figura 3 A-C. A - Ovos de *Toxocara canis* íntegros no grupo controle (seta branca); B e C ovos de *Toxocara canis* (seta branca) rompidos e íntegros (seta preta) nos grupos G2 e G6 respectivamente, ao final do experimento.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais (G1 a G7) elaborados para avaliar a eficácia ovicida *in vitro* de desinfetantes comerciais e do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001), isolados e combinados entre si, sobre os ovos de *Toxocara canis* nos intervalos de dias 1, 7, 14 e 21.....19

Tabela 2. Resultados médios obtidos dos grupos G1 a G7 quanto ao número de ovos remanescentes de *T. canis* nos dias 1, 7, 14 e 21 do ensaio experimental.....21

RESUMO

MOTTA, CAROLINA PERIN, M.Sc, Universidade Vila Velha – ES, Maio de 2021. **Avaliação da eficácia ovicida *in vitro* de desinfetantes comerciais associados ou não ao fungo nematófago *Duddingtonia Flagrans* (AC001) sobre ovos de *Toxocara canis*.** Orientador: Fábio Ribeiro Braga.

Nematoides são geohelmintos de cães e gatos que podem trazer prejuízos à saúde única. Dentre esses geohelmintos potencialmente zoonóticos citamos o *Toxocara canis*, causando toxocaríase em cães e gatos e larva migrans visceral em humanos. Em geral, os ovos deste nematoide são liberados nas fezes dos animais contaminados no ambiente. Estes ovos são muito resistentes às intempéries climáticas e até mesmo a alguns desinfetantes comuns. Nesse sentido, o controle ambiental de *T. canis* torna-se um grande desafio à saúde única. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia ovicida *in vitro* de dois desinfetantes de uso comercial, associados ou não, ao fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) sobre ovos de *T. canis*. No ensaio experimental foram criados 7 grupos, com 6 repetições cada: G1 (ovos + AC001); G2 (ovos + hipoclorito de sódio 2-2,5%); G3 (ovos + cloreto de benzalcônio 15%); G4 (ovos + AC001 + hipoclorito de sódio 2-2,5%); G5 (ovos + AC001 + cloreto de benzalcônio 15%); G6 (ovos + hipoclorito de sódio 2-2,5% + cloreto de benzalcônio 15%); e G7 (ovos + água: controle). As leituras ocorreram nos dias 1, 7, 14 e 21 após o início do estudo. As médias de cada grupo foram obtidas e transformadas em percentuais. Ao final do experimento, os percentuais de redução ovicida de cada grupo foram: G1 (29.8%); G2 (73%); G3 (44.1%); G4 (59.7%); G5 (39.4%) e G6 (75.7%) ($p < 0,005$). Todos os grupos estudados demonstraram eficácia ovicida sobre os ovos de *T. canis*. Esses resultados permitem concluir que tanto o hipoclorito de sódio 2-2,5% quanto o cloreto de benzalcônio 15%, desinfetantes de uso doméstico já consagrados, são efetivos *in vitro* na destruição de ovos *T. canis*. Outro ponto interessante nos resultados obtidos foi a atuação “ovicida” de *D. flagrans*, com eficácia de 29,8% de redução em relação ao grupo controle. Mais estudos são necessários para avaliar possíveis efeitos potencializadores e/ou antagônicos desses desinfetantes, associados entre si ou às ferramentas promissoras de controle biológico, como os fungos nematófagos. Estudos voltados para o uso desses produtos no ambiente, inclusive em solo terroso, também devem ser realizados a fim de buscar alternativas viáveis para aprimorar o controle ambiental desses parasitas.

Palavras chaves: toxocaríase, controle biológico, nematodioses, agentes químicos, animais domésticos.

ABSTRACT

MOTTA, CAROLINA PERIN, M.Sc., Vila Velha University – ES, May, 2021. **Evaluation of *in vitro* ovicidal efficacy of commercial disinfectants associated or not with the nematophagous fungus *Duddingtonia Flagrans* (AC001) on *Toxocara canis* eggs.** Advisor: Fábio Ribeiro Braga.

Nematodes are geohelminths affecting cats and dogs that can cause damage to One Health. Among these potentially zoonotic geohelminths, we can mention *Toxocara canis*, causing toxocariasis in cats and dogs and visceral larva migrans in humans. In general, eggs from this nematode are released into the environment through the feces of these infected animals. These eggs are highly resistant to different weather conditions and even to some common disinfectants. In this sense, the environmental control of *T. canis* becomes a major challenge to One Health. The present study aimed to evaluate the *in vitro* ovicidal efficacy of two commercially used disinfectants, associated or not, with the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* (AC001) on *T. canis* eggs. 7 groups were created in the experimental test, with 6 repetitions each: G1 (eggs + AC001); G2 (eggs + 2-2.5% sodium hypochlorite); G3 (eggs + 15% benzalkonium chloride); G4 (eggs + AC001 + 2-2.5% sodium hypochlorite); G5 (eggs + AC001 + 15% benzalkonium chloride); G6 (eggs + 2-2.5% sodium hypochlorite + 15% benzalkonium chloride); and G7 (eggs + water: control). The readings took place on days 1, 7, 14 and 21 after the start of the study. The averages of each group were obtained and transformed into percentages. At the end of the experiment, the percentages of ovicidal activity in each group were: G1 (29.8%); G2 (73%); G3 (44.1%); G4 (59.7%); G5 (39.4%) and G6 (75.7%) ($p < 0.005$). All studied groups showed ovicidal efficacy on *T. canis* eggs. These results allow us to conclude that both 2-2.5% sodium hypochlorite and 15% benzalkonium chloride, already established domestic disinfectants, are effective *in vitro* in the destruction of *T. canis* eggs. Another interesting point in the results obtained was the “ovicidal” performance of *D. flagrans*, with a 29.8% reduction efficacy compared to the control group. Further studies are required to assess possible enhancing and / or antagonistic effects of these disinfectants, associated with each other or with promising biological control tools, such as nematophagous fungi. Studies focused on the use of these products in the environment, including in wet soil, should also be carried out in order to seek viable alternatives to improve the environmental control of these parasites.

Keywords: toxocariasis, biological control, nematodiasis, chemical agents, domestic animals.

1. INTRODUÇÃO

O número de animais domésticos tem crescido significativamente nos últimos anos no cenário mundial (Paul *et al*, 2010). Após o início da pandemia do novo coronavírus em 2019 foi possível observar ainda mais tal crescimento, uma vez que muitas pessoas recorreram a companhia de animais nesse período de isolamento social (May, 2021).

A estreita convivência entre animais e seres humanos é capaz de promover saúde mental e física, além de bem-estar para ambos (Wells, 2007; Friedmann & Krause-Parello, 2018). Entretanto, essa proximidade consequentemente acarreta na exposição ao risco de doenças, principalmente as zoonoses, que fazem parte da abordagem de *One Health* (Saúde Única), a qual envolve esforços multidisciplinares na perspectiva de promover a saúde comum, englobando humana, animal e ambiental (Paul *et al*, 2010; Overgaauw & Kapen, 2013).

Geohelmintos são parasitas cuja transmissão ocorre por meio do contato com solo contaminado com ovos e larvas, causando doenças em animais e seres humanos, consideradas zoonoses. Dentre os mais conhecidos está o nematoide ascarídeo *Ascaris lumbricoides*, popularmente chamado de lombriga (Ojha *et al.*, 2014). São helmintos intestinais os quais sua presença está diretamente ligada à falta de higiene e saneamento básico, consequentemente sendo mais prevalentes em países em desenvolvimento, onde as condições precárias de moradia e sobrevivência refletem intensos problemas de saúde pública (Rai *et al.*, 2000; Naish *et al.*, 2004). Crianças em idade pré-escolar são as mais acometidas pelas infecções helmínticas, apresentando dentre outros sintomas,

desinteria crônica, baixo peso e desenvolvimento retardado (Lim-Leroy & Chua, 2020).

Dentre os geohelmintos comumente encontrados em animais de companhia, como cães e gatos, destaca-se o nematoide ascarídeo *Toxocara canis*, que causa a toxocaríase nesses animais (Overgaaauw, 1997; Okulewicz *et al.*, 2012). A toxocaríase é uma das principais infecções helmínticas que acometem esses animais, e por se tratar de uma zoonose muito comum, tem fundamental importância e impacto socioeconômico mundial (Macpherson, 2013; Overgaaauw & Kapen, 2013; Chen *et al.*, 2018).

Em relação às formas de prevenção desta infecção, podem se citar: a) controle populacional de animais errantes; b) promoção da educação ambiental da população quanto ao alto potencial de zoonótico da doença; c) vermifugação de animais domésticos, e; d) impedimento do acesso desses animais às áreas de lazer comuns (Selek *et al.*, 2016).

O controle da toxocaríase em animais domésticos é realizado por meio da administração de drogas anti-helmínticas (Overgaaauw, 1997; Taylor *et al.*, 2017). Este controle tradicional por muitas vezes tem demonstrado insucesso diante da resistência parasitária observada ao longo dos anos (Kopp *et al.*, 2007; Jimenez Castro *et al.*, 2019). À exemplo, Jimenez Castro e autores (2019) demonstraram por meio de sequenciamento genético uma forte resistência parasitária em cães galgos infectados com *Ancylostoma caninum*, nematoide de cães e gatos potencialmente zoonótico, nos EUA, refratários ao tratamento com pirantel®. Nesse sentido, cada vez mais pesquisas com a finalidade de se promover medidas integrativas e conseqüentemente maior efetividade no controle de

geohelmintos têm sido realizadas (Mota *et al.*, 2003; Ferraz *et al.*, 2019; Prichard & Geary, 2019; Braga *et al.*, 2020).

A resistência dos ovos de *T. canis* frente às condições ambientais, devido à presença de camadas lipoproteicas, deve ser considerada (Araujo *et al.*, 2009; Azam *et al.*, 2012; Overgaauw & Kapen, 2013). Portanto, uma das maneiras de destruir esses ovos é a desinfecção por produtos químicos, como desinfetantes usuais de limpeza doméstica disponíveis no mercado (Ayçiçek *et al.*, 2001; Morrondo *et al.*, 2006; Ursache *et al.*, 2019).

Por outro lado, há muito se conhece a eficiência de controladores biológicos, como os fungos nematófagos, ditos “comedores” de ovos e/ou de larvas de nematoides parasitos gastrintestinais, que estão presentes no ambiente. Frassy *et al.* (2010) demonstraram a atuação de fungos nematófagos no controle de ovos de *T. canis*. Nesse sentido, especificamente na última década, muito se elucidou sobre o mecanismo de ação destes fungos. Dentre estes, destaca-se a espécie *Duddingtonia flagrans*, potencialmente “helmintófaga”, e ainda produtora de enzimas de potencial bionematicida (Braga & Araújo, 2014; Silva *et al.*, 2019). Dessa forma, alinhando-se ao conhecimento da epidemiologia parasitária, muitos resultados de sucesso na redução, tanto em experimentação *in vitro* quanto *in vivo*, foram obtidos (Ferraz *et al.*, 2020; Braga *et al.*, 2020). Contudo, a utilização de práticas integradas no controle parasitário utilizando esse fungo merecem mais atenção, uma vez que ainda existe certo desconhecimento e preconceito na utilização associada de compostos químicos e biológicos (Braga *et al.*, 2009; Frassy *et al.*, 2010; Braga & Araújo, 2014; Ferraz *et al.*, 2019; Braga *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia ovicida *in vitro* de desinfetantes comerciais associados ou não ao fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) sobre ovos de *Toxocara canis*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Toxocara canis* e toxocaríase

Toxocara canis e *Toxocara cati* são geohelminintos nematóides comumente encontrados em cães e gatos, respectivamente, e sua presença pode acarretar em prejuízos à saúde e ao desenvolvimento desses animais (Okulewicz *et al.*, 2012). São helmintos esbranquiçados, arredondados e longilíneos, pertencentes ao filo Nematelminthes, classe Nematoda, Superfamília Ascaridoidea e gênero *Toxocara* (Despommier, 2003; Selek *et al.*, 2016). Esses ascarídeos apresentam distribuição mundial, e a taxa de infecção em animais é bastante diversa na maioria dos países, variando entre 5% e 80% ou mais (Glickman & Schantz, 1981; Taylor *et al.*, 2017). No Brasil, de acordo com Dantas-Torres (2020), baseado em outros estudos realizados em diversas regiões do país, a prevalência de *T. canis* varia de 0,7% a 48,9% em cães e *T. cati* 0,3% a 43,1% em gatos.

Cães e gatos com menos de 6 meses de idade são relatados como os mais susceptíveis às infecções por *Toxocara* sp. em relação aos animais adultos, entretanto mais pesquisas são necessárias para compreensão dessa ocorrência em animais idosos (Overgaauw, 1997; Overgaauw & Kapen, 2013).

O ciclo de vida do *T. canis* é complexo. Uma fêmea adulta libera cerca de 200.000 ovos resistentes diariamente no ambiente, que são eliminados sob a forma inativa (não embrionada) por meio das fezes dos animais infectados (Glickman & Schantz, 1981; Despommier, 2003). De acordo com o tipo de solo, temperatura e umidade do ambiente, tais ovos evoluem para a forma infectante

(L₃), se mantendo viáveis por pelo menos 1 ano (Schnieder *et al.*, 2011; Azam *et al.*, 2012).

A resistência conferida aos ovos destes geohelminthos no ambiente derivam da composição do seu envoltório (casca), que é composta por camadas lipoprotéicas que variam de uma a cinco, dependendo do nematoide (Wharton, 1980). Bouchet e colaboradores (1986) descreveram a casca dos ovos de *T. canis* sendo composta por cinco camadas: 1) uma fina membrana uterina, podendo apresentar protuberâncias discretas; 2) uma fina membrana vitelina contornando as cristas e estrias da camada subjacente; 3) uma camada de quitina espessa e uniforme; 4) uma camada granulosa de alta densidade e; 5) uma zona lamelar composta pela superposição de camadas de caráter fibroso. Portanto, é devido à essa complexa composição estrutural que esses ovos apresentam tamanha resistência às intempéries. Nesse sentido, destaca-se a atuação ovicida de alguns fungos nematófagos (Lysek *et al.*, 1982).

A infecção por *T. canis* em cães ocorre mais comumente por meio da ingestão de ovos contendo L₃ (Schnieder *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2017). Pode ainda ocorrer infecção pré-natal por via transplacentária em cadelas prenhes, 3 semanas antes do parto, e a infecção transmamária ocorre nas primeiras 3 semanas de lactação. Por fim, os cães podem se infectar também por meio da ingestão de hospedeiros paratêmicos, como roedores e aves (Glickman & Schantz, 1981; Overgaauw, 1997).

Em cães com idade entre 2 e 3 meses, os ovos ingeridos eclodem no intestino delgado e as larvas migram por meio da circulação sanguínea para o fígado e conseqüentemente pulmões, sofrendo mudas. Em seguida retornam ao intestino por meio da traquéia, onde atingem sua maturidade (Fisher, 2014).

Nos cães maiores de 3 meses, devido à imunidade adquirida, esse ciclo se altera e a migração hepatotraqueal diminui, dando lugar à migração somática (Overgaauw, 1997; Taylor *et al.*, 2017).

Cães infectados podem não apresentar sinais clínicos em infecções leves a moderadas, quando da migração pulmonar das larvas. Contudo, a presença destas no intestino delgado pode provocar quadro de abdômen abaulado ou encolhido, emaciação, êmese e diarreia. Em casos de infecções graves, quadros de tosse são observados, além de taquipnéia e secreção nasal purulenta. Filhotes podem ir à óbito logo após o nascimento (Schnieder *et al.*, 2011).

O diagnóstico da doença é realizado pela identificação da presença de ovos nas fezes dos animais infectados, por meio de técnicas de flutuação fecal com soluções hipersaturadas (Hendrix, 1995; Macpherson, 2013). Os ovos podem ser encontrados nas fezes após 4 a 5 semanas da infecção, e são observados em grande número, apresentando casca espessa e de aspecto rugoso, além de coloração acastanhada (Selek *et al.*, 2016).

O tratamento da toxocaríase em cães é realizado por meio da administração de drogas anti-hemínticas. O fembendazol, o mebendazol e o pamoato de pirantel são as drogas mais utilizadas e têm eficácia satisfatória. Ivermectina, moxidectina, milbectina e selamectina também podem ser utilizadas, inclusive associadas (Taylor *et al.*, 2017; CAPC, 2020). O tratamento deve ser iniciado antes dos cães completarem 3 semanas de idade, pois a transmissão transmamária pode ocorrer em até 5 semanas pós-parto, e deve ser repetido com 2, 4, 6 e 8 semanas até completarem 6 meses de idade. As cadelas lactentes devem ser tratadas juntamente com seus filhotes. Adultos devem ser

tratados periodicamente, no mínimo 4 vezes ao ano, de acordo com a idade e o estilo de vida do animal (Overgaauw & Kapen, 2013; ESCCAP, 2020).

Compreender a epidemiologia da toxocaríase é essencial para traçar estratégias de prevenção e controle dessa verminose, levando em consideração: a) a alta resistência dos ovos às variantes ambientais (Araújo *et al.*, 2009; Azam *et al.*, 2012); b) a grande quantidade de ovos liberados diariamente no ambiente pelas fêmeas; e c) a possibilidade de cadelas assintomáticas manterem larvas de *T. canis* em hipobiose nos tecidos, promovendo reinfecção em casos de queda de imunidade, como por exemplo na gestação (Taylor *et al.*, 2017).

2.2. Potencial zoonótico do *Toxocara canis*

Em humanos, a infecção por *T. canis* também se desenvolve a partir da ingestão de ovos contendo L₃ (Despommier, 2003; Selek *et al.*, 2016). Depois de ingeridos, os ovos eclodem no intestino delgado e essas larvas penetram na parede intestinal migrando para outros órgãos e tecidos por meio da circulação sanguínea. Diferente do que ocorre em cães e gatos, na espécie humana essas larvas não conseguem retornar ao intestino, não havendo o desenvolvimento do nematoide adulto, sendo o ser humano considerado um hospedeiro acidental desse parasito (Overgaauw & Kapen, 2013; Chen *et al.*, 2018).

Crianças em idade pré-escolar são as mais afetadas, podendo desenvolver febre, hepatomegalia, granulomas hepáticos, hipereosinofilia crônica, hiperglobulinemia e alterações pulmonares (Macpherson, 2013). Entretanto, muitas podem se manter assintomáticas, pois os sintomas e o grau de intensidade variam de acordo com idade, imunidade, quantidade de larvas

ingeridas, intensidade e duração da infecção e local de migração das larvas (Lim *et al.*, 2015; Selek *et al.*, 2016). A prevalência da doença é influenciada por diversas variáveis como densidade populacional, fatores climáticos e geográficos, bem como culturais e socioeconômicos (Congdon & Lloyd, 2011). Em países subdesenvolvidos, como na América Latina, a prevalência é maior devido ao saneamento básico precário e consequente exposição ao solo contaminado pelo alto fluxo de animais errantes (Macpherson, 2013; Moreira *et al.*, 2014).

A síndrome mais comum causada pela migração e instalação das larvas nos órgãos e tecidos humanos é conhecida como Larva Migrans Visceral (LMV) e é a mais frequente em crianças (Chen *et al.*, 2018). Quando as larvas atingem os olhos, o quadro é denominado Larva Migrans Ocular (LMO) e pode cursar com aumento da pressão intraocular, dor, visão turva e fotofobia, assim como com a formação de granulomas e lesões oculares permanentes (Lim *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2018).

O diagnóstico é comumente realizado por meio de sorologia pelos métodos ELISA e Western Blotting para detecção de anticorpos e antígenos de *T. canis* no sangue, associada aos sintomas e exames de imagem (Yamasaki *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2009). Anticorpos IgM, IgG e IgE podem ser detectados no sangue periférico dentro de 4 dias a 4 semanas da infecção, e permanecem durante anos no soro. Entretanto, testes que detectam anticorpos podem sofrer reações cruzadas com outros parasitas, diminuindo sua sensibilidade e especificidade (Yamasaki *et al.*, 2000).

A LMV pode ser tratada com a administração por via oral de anti-helmínticos, associados à terapia anti-inflamatória. Os anti-helmínticos mais

utilizados são albendazol, tiabendazol e mebendazol, apesar da eficácia limitada (Moreira *et al.*, 2014). Nos casos de LMO, a intervenção cirúrgica pode ser necessária para remoção da larva, a fim de evitar a progressão dos danos oculares (Selek *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2018).

A administração periódica de anti-helmínticos em animais de companhia, bem como hábitos de higiene frequentes são peças-chave na prevenção da LMV (Macpherson, 2013; Fisher, 2014; Selek *et al.*, 2016). Ambientes frequentados por grande número de animais errantes tendem a apresentar alto risco de infecção por *T. canis*, e devem ser evitados por crianças, assim como também o acesso desses animais às áreas públicas como playgrounds infantis, praças e até quintais, e a remoção de fezes do solo auxilia na redução desse risco (Nijse *et al.*, 2015).

2.3. Desinfetantes comerciais

Em canis, abrigos de animais, clínicas veterinárias e até mesmo em residências, a desinfecção de pisos, superfícies e áreas comuns é de suma importância para o controle de microorganismos e conseqüentemente de zoonoses (Morrondo *et al.*, 2006). Diversos desinfetantes de uso doméstico estão disponíveis no mercado e são amplamente utilizados, destacando-se aqueles à base de quaternários de amônio, fenóis e compostos clorados (Ayçiçek *et al.*, 2001; Ursache *et al.*, 2019).

Os quaternários de amônio como o cloreto de benzalcônio possuem propriedades anti-sépticas, desinfetantes e sanitizantes, bem como demonstram baixa toxicidade, alta solubilidade em água, são estáveis em solução e não são

corrosivos. Já os compostos clorados como o hipoclorito de sódio têm alto poder germicida por sua poderosa ação oxidante, entretanto os de uso doméstico se apresentam diluídos, contendo apenas 2-2,5% de cloro ativo, o que torna seu uso seguro e ainda assim eficaz nas atividades do dia-a-dia (Jaigobind *et al.*, 2007).

Apesar desses produtos químicos não garantirem em rótulo propriedades nematicidas e ovicidas, diversos estudos realizados já comprovaram tais ações, em diferentes graduações de acordo com o tempo de exposição, a natureza e a concentração do produto (Ayçiçek *et al.*, 2001; Morrondo *et al.*, 2006; Alves Neto, 2009; Verocai *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2016; Ursache *et al.*, 2019)

2.4. Fungos nematófagos

Segundo Soares (2014), o controle biológico é uma das possíveis aplicações biotecnológicas dos fungos nematófagos, e tem como vantagem ser uma alternativa “limpa”, evitando a geração de resíduos como nos produtos químicos.

Fungos nematófagos “comedores” de ovos e ou larvas de nematoides parasitos gastrintestinais já vem sendo utilizados em experimentos laboratoriais e também a campo em animais domésticos e de produção (Mota *et al.*, 2003; Tavela *et al.*, 2013).

Os fungos nematófagos podem ser classificados em 3 grupos: predadores, endoparasitas e ovicidas/oportunistas. Além destes, há ainda àqueles considerados produtores de metabólitos secundários tóxicos, que

também podem ser promissores no controle biológico (Yang *et al.*, 2013; Soares, 2014).

O grupo de fungos predadores inclui as principais espécies de fungos nematófagos, dos gêneros *Duddingtonia*, *Arthrobotrys* e *Monacrosporium* (Yang *et al.*, 2007; Braga & Araujo, 2014). Essa categoria apresenta ação predatória baseada na formação de armadilhas, por meio de hifas adesivas que emaranhadas geram redes bi e tridimensionais, com o objetivo de aprisionar e destruir estágios larvais de nematoides (Larsen, 1999; Mota *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007; Braga *et al.*, 2010; Braga & Araujo, 2014).

Os fungos endoparasitas agem infectando o hospedeiro, por meio da liberação de esporos, conídios e conidióforos, que são ingeridos pelo nematoide, degradando-o de dentro para fora. Entretanto, esse grupo apresenta algumas limitações de sobrevivência que dificultam sua utilização comercial, como a obrigatoriedade de hospedeiro, não sendo possível utilizá-los em controle de solo, e a necessidade de água disponível (Stirling & West, 1991).

Ovicidas ou oportunistas são fungos cuja atividade ocorre sobre ovos, cistos e fêmeas de nematoides, destacando-se a espécie *Arthrobotrys oligospora*, primeiro fungo nematófago da categoria a ser estudado (Braga & Araujo, 2014). Esses fungos já vêm sendo alvo de diversos estudos, como sendo organismos versáteis e promissores no controle de nematoides e helmintos de animais domésticos e seres humanos (Araújo & Maia, 1993; Lysek, 1976; Kerry *et al.*, 1984; Braga, 2007; Lopez-Llorca *et al.*, 2008).

Além da ação mecânica, os fungos nematófagos ainda são capazes de produzir enzimas extracelulares, como proteases e quitinases, que também possuem propriedades ovicidas e larvicidas (Mota *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007;

Braga *et al.*, 2015; Soares, 2014; Soares *et al.*, 2015). O mecanismo molecular de ação dessas enzimas ainda não é totalmente conhecido, entretanto sabe-se que elas são capazes de promover a degradação dos principais constituintes químicos da cutícula e da casca dos ovos de nematóides (Braga *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2013; Soares, 2014). A espécie *Duddingtonia flagrans* (AC001) é considerada uma das mais promissoras no controle de nematóides e têm demonstrado eficácia considerável (Meyer & Wiebe, 2003; Mota *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011).

2.5. Perspectivas no controle parasitário de cães e gatos

A resistência parasitária às drogas anti-helmínticas existentes no mercado é uma realidade que vem sendo estudada ao longo dos anos (Kopp *et al.*, 2007; Jimenez Castro *et al.*, 2019). Diante desse cenário, a implementação de programas integrativos de controle parasitário que garantam a saúde e a segurança dos animais e seres humanos torna-se necessária (Mota *et al.*, 2003). Alternativas de controle biológico associado ao controle químico já estão disponíveis, e a utilização dos fungos nematófagos faz parte dessa estratégia (Braga & Araújo, 2014).

Uma das alternativas promissoras envolvendo os fungos nematófagos é o aproveitamento de seus produtos no combate aos nematóides. As enzimas extracelulares supramencionadas já demonstraram potencial nematicida, entretanto merecem mais estudos, para que possam ser incorporadas de forma segura e eficaz no mercado (Araújo *et al.*, 2008; Soares, 2014).

A miconanotecnologia também pode ser considerada uma das estratégias no controle biológico desses geohelmintos. Nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por fungos nematófagos têm sido amplamente estudadas devido às suas propriedades óticas, físicas e químicas (Barbosa *et al.*, 2021). Métodos de obtenção dessas AgNPs já vem sendo testados, entretanto os físicos e químicos demandam emprego de substâncias tóxicas. Já o método biológico denominado “Síntese Verde” tem sido uma aposta para essa produção, por ser ecologicamente correto, eficiente, rentável e passível de ser reproduzido, uma vez que origina grande quantidade de produto a partir de pequena biomassa (Chowdhury *et al.*, 2014; Ghareib *et al.*, 2016). Nesse contexto, mais uma vez destaca-se o fungo nematófago *Duddingtonia flagrans*, por sua capacidade predatória e de resistência às condições ambientais, além da produção de enzimas, que participam do processo de produção de AgNPs (Costa Silva *et al.*, 2017). Em estudo publicado recentemente, Barbosa *et al.* (2021) avaliaram a atividade nematicida de AgNPs sintetizadas por *D. flagrans*, pelo método de Síntese Verde, sobre larvas L₃ do nematoide ascarídeo *Ancylostoma caninum*, e observaram que as AgNPs demonstraram atividade nematicida em todas as concentrações testadas, concluindo se tratar de mais uma das versatilidades desse fungo, que pode ser explorada no controle biológico de nematoides.

Logo, diante de um cenário de resistência parasitária já consolidado, e da necessidade de novas estratégias de controle de nematoides, em especial *Toxocara canis*, comumente encontrado em animais domésticos e de potencial zoonótico importante, o presente trabalho buscou avaliar a eficácia ovicida *in vitro* de desinfetantes comerciais associados ou não ao fungo nematófago *D. flagrans* sobre ovos deste parasito.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a eficácia ovicida *in vitro* de desinfetantes comerciais associados ou não ao fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) sobre ovos de *Toxocara canis*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade ovicida *in vitro* de 2 compostos químicos desinfetantes comerciais, um à base hipoclorito de sódio e um à base de quaternário de amônio, sobre ovos de *Toxocara canis*;
- Avaliar a eficácia ovicida *in vitro* do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* sobre ovos de *Toxocara canis*;
- Avaliar a eficácia ovicida *in vitro* do uso associado do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* com os compostos químicos à base de hipoclorito de sódio e quaternário de amônio sobre ovos de *Toxocara canis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Toxocara canis*

Os ovos de *Toxocara canis* foram obtidos a partir da dissecação de um exemplar adulto fêmea desse nematoide existente em conservação no Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico da Universidade Vila Velha (UVV). Aproximadamente 20.400 ovos foram extraídos e colocados em 3 mL de água destilada de acordo com a técnica modificada de Frassy *et al.* (2010).

4.2. Desinfetantes e *Duddingtonia flagrans* (AC001)

Foram utilizados hipoclorito de sódio 2-2,5% (*Qboa*, Anhembi, Brasil) e cloreto de benzalcônio 15% (*Herbalvet T.A.*[®], Ourofino, Brasil), este com diluição realizada conforme rótulo.

O fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* (AC001) foi obtido do solo brasileiro e isolado pelo Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Atualmente, é mantido em constante repique pelo Laboratório de Parasitologia Experimental e Controle Biológico da Universidade Vila Velha.

No presente trabalho foi utilizada uma solução de AC001. Para obtenção da solução, o fungo foi repicado em uma placa 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. Após o crescimento, 5 mL de água destilada foram adicionados na placa de Petri e com

auxílio de uma lâmina de vidro os conídios e fragmentos miceliais foram raspados da superfície do ágar e posteriormente vertidos em tubo *Falcon* de 15 mL, de acordo com a técnica descrita por Araújo & Maia (1993).

4.3. Ensaio experimental

Foram criados 7 grupos experimentais em microtubos de 1,5 mL, com 6 repetições para cada grupo, para cada dia de leitura. Os grupos estão descritos na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Grupos experimentais (G1 a G7) elaborados para avaliar a eficácia ovicida *in vitro* de desinfetantes comerciais e do fungo *Duddingtonia flagrans* (AC001), isolados e combinados entre si, sobre os ovos de *Toxocara canis* nos intervalos de dias 1, 7, 14 e 21.

Grupos	Ensaio Experimental
G1	18 µL ovos + 10 µL conídios de AC001
G2	18 µL ovos + 82 µL de hipoclorito de sódio 2-2,5%
G3	18 µL ovos + 82 µL de cloreto de benzalcônico 15%
G4	18 µL ovos + 10 µL conídios de AC001 + 72 µL de hipoclorito de sódio 2-2,5%
G5	18 µL ovos + 10 µL conídios de AC001 + 72 µL de cloreto de benzalcônico 15%
G6	18 µL ovos + 41 µL de hipoclorito de sódio 2-2,5% + 41 µL de cloreto de benzalcônico 15%
G7 (controle negativo)	18 µL ovos + 82 µL de água destilada

As leituras dos grupos foram realizadas em 4 dias diferentes: dia 1 (24 horas), dia 7 (168 horas), dia 14 (336 horas) e dia 21 (504 horas), após a montagem dos ensaios. A quantidade de ovos e conídios adicionada aos microtubos foi padronizada por meio de alíquotas, obtendo-se concentrações de aproximadamente 120 ovos/18 µl e 120 conídios/10 µl (Ferraz *et al.*, 2019),

respectivamente. Os volumes de hipoclorito de sódio 2-2,5%, cloreto de benzalcônico 15% e água destilada foram calculados de modo que o volume final da solução fosse de 100 µl por microtubo, conforme demonstrado na tabela 1.

Os microtubos foram mantidos na bancada do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UVV, em temperatura de 25° C até o momento das leituras (figura 1).

A leitura dos grupos foi realizada em lâmina, no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UVV, por meio de microscopia óptica. Utilizando as objetivas de 4x e 10x, os ovos remanescentes foram contados com o auxílio de um contador manual estatístico, e foram visualmente observados: o aspecto geral, a coloração, a integridade e espessura da casca, o aspecto do conteúdo, bem como qualquer outra condição que diferisse da inicial. Somente foram contados como ovos remanescentes aqueles que apresentavam características visuais semelhantes às iniciais.

4.4. Análise estatística

Os resultados do experimento foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e pós teste Tukey, ao nível de 1% de probabilidade, utilizando o software BioEstat 5.0 (Ayres *et al.*, 2003). Os percentuais de redução foram calculados pela seguinte equação: % Redução = $\frac{\text{média de ovos remanescentes no grupo controle (G7)} - \text{média de ovos remanescentes nos grupos tratados}}{\text{média de ovos remanescentes no grupo controle}} \times 100$ (Mendoza-De-Gives & Vasquez-Prates, 1994).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eficácia ovicida de cada um dos desinfetantes utilizados, do fungo *D. flagrans* e associações, sobre os ovos de *T. canis*, é demonstrada na tabela 2, como as médias das 6 repetições de cada grupo (G1 a G7) nos dias 1, 7, 14 e 21 do experimento.

Tabela 2. Resultados médios obtidos dos grupos G1 a G7 quanto ao número de ovos remanescentes de *T. canis* nos dias 1, 7, 14 e 21 do ensaio experimental.

DIAS	GRUPO 1 (ovos + AC001)	GRUPO 2 (ovos + hipoclorito de sódio 2-2,5%)	GRUPO 3 (ovos + cloreto de benzalcônio 15%)	GRUPO 4 (ovos + AC001 + hipoclorito de sódio 2-2,5%)	GRUPO 5 (ovos + AC001 + cloreto de benzalcônio 15%)	GRUPO 6 (ovos+ hipoclorito de sódio 2-2,5% + cloreto de benzalcônio 15%)	GRUPO 7 (CONTROLE: ovos + água)
1	94	93	49*	87,83	64,83	83,67	124,8
7	69,33	0*	62	51,17	58,5	0*	86,17
14	45,5	0*	56,67	0*	38,67	0*	69,67
21	33,33	0*	25,17	0*	47	0*	64,33

Asteriscos denotam diferença significativa ($p < 0.005$) para o grupo controle

Ao final do experimento (21 dias), a soma das médias do grupo controle (G7) foi de 345 ovos de *T. canis* e nos demais grupos: G1 (242.1); G2 (93); G3 (192.7); G4 (138.9); G5 (209.0) e G6 (83.7). Dessa forma, evidenciando-se cada uma das médias ao final dos dias estudados, foi possível obter os seguintes resultados para o percentual de redução ovicida: G1 (29.8%); G2 (73%); G3 (44.1%); G4 (59.7%); G5 (39.4%) e G6 (75.7%). Observa-se que os maiores percentuais ovicidas foram obtidos nos grupos G2 e G6 (figura 3A-C), que em sua composição havia produtos químicos já consagrados: o hipoclorito de sódio 2-2,5% e o cloreto de benzalcônio 15%.

Por outro lado, a atividade ovicida registrada no G1, embora tenha sido baixa, serve mais uma vez como registro da atuação do fungo *D. flagrans*, sobre ovos de *T. canis*. No passado, a atuação deste fungo sobre ovos de helmintos já tinha sido sugerida por Braga *et al.* (2007). Estes autores avaliaram a capacidade ovicida de *D. flagrans* sobre ovos do nematoide ascarídeo *Ascaris lumbricoides*, demonstrando que esse fungo, apesar de ser classificado como predador, apresenta também capacidade ovicida, devido às enzimas por ele produzidas. No presente estudo foi observado que *D. flagrans* (AC001) foi capaz de promover efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde hifas e clamidósporos foram observados aderidos à casca (figura 2). Braga *et al.* (2008) também demonstraram pela primeira vez que um fungo predador “destruidor” de larvas de nematoides aderiu aos ovos de *Shistosoma mansoni*, trematóide causador da esquistossomose, e possivelmente inviabilizou seu desenvolvimento. Desde então, muito já se estudou sobre a possível atividade ovicida de *D. flagrans* e vários trabalhos interessantes demonstraram-na, graças a composição da casca dos ovos de alguns nematoides, como é o caso em questão (Braga *et al.*, 2008; Frassy *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2011).

A casca dos ovos da maioria dos geohelmintos (inclusive o *T. canis*) possui camadas de composição lipídica e proteica (Wharton, 1980), e devido produção de enzimas extracelulares por *D. flagrans*, recentemente descobriu-se uma nova utilização para esse fungo. Alinhando-se o conhecimento a respeito da epidemiologia parasitária, controle químico e biológico, os resultados do presente trabalho “apontam” para um possível controle estratégico integrado.

Seguindo nessa mesma linha de raciocínio, em G4 e G5 (ambos contendo *D. flagrans*), também se nota atuação ovicida das enzimas, embora

possa ser sugerida alguma atividade antagônica dos produtos químicos quanto ao *D. flagrans* nos dias estudados. Essas experimentações são importantes justamente pela possibilidade futura de desenvolvimento de um desinfetante que possa atuar sinergicamente com o controle biológico.

Nos grupos G2, G4 e G6, que continham hipoclorito de sódio 2-25%, foi possível observar alterações morfológicas significativas nos ovos, principalmente referentes à casca, e que progrediram à medida que se passavam os dias do ensaio experimental. No dia 1 já era possível observar nos três grupos cascas de ovos com espessuras mais finas e muitas rompidas, com exposição de conteúdo. Ao longo dos dias 7, 14 e 21 os ovos foram se tornando mais claros, irregulares, com a casca mais fina, e apresentando deterioração progressiva do conteúdo, sendo que nos dias 14 e 21 não era mais possível visualizá-los integralmente, restando apenas fragmentos dispersos na solução.

Verocai *et al.* (2010) avaliaram a eficácia *in vitro* do hipoclorito de sódio 2-2,5%, assim como do cloreto de benzalcônio 15% (também Herbalvet T.A.®) e outros desinfetantes comerciais, sobre a evolução da embriogênese de ovos de *T. canis*, durante 36 dias. Apesar do objetivo daquele estudo divergir deste, as metodologias foram similares e ambos observaram que o hipoclorito de sódio 2-2,5% promoveu a degradação da camada externa dos ovos desse parasito. Morrondo *et al.* (2006), em estudo semelhante ao de Verocai *et al.* (2010), também demonstrou que em um período de 24 dias o hipoclorito de sódio 2-2,5% foi capaz de degenerar *in vitro* 50% dos ovos de *T. canis*. No presente trabalho, foi possível demonstrar que aos 21 dias de experimento, a degradação dos ovos ocorreu em todos os grupos que continham o derivado de cloro,

corroborando com os resultados encontrados pelos referidos autores, e comprovando a eficácia ovicida desse composto químico.

Os grupos G3 e G5, que continham cloreto de benzalcônio 15% apresentaram menor atividade ovicida, depois de G1. Há relatos na literatura em que o cloreto de benzalcônio 15% demonstrou potencial ovicida e larvicida sob geohelmintos (Suzuki *et al.*, 2013). No presente trabalho, também foi comprovada a eficácia ovicida desse desinfetante ao longo experimento, e ao final (dia 21) o percentual de destruição de ovos foi de 44.2%. Os ovos remanescentes no dia 21 apresentavam morfologia levemente alterada, porém muitos estavam com seu conteúdo íntegro. Por outro lado, existem estudos demonstrando que o potencial ovicida do cloreto de benzalcônio 15% é significativamente menor se comparado ao do hipoclorito de sódio 2-2,5% e do álcool 70%, por exemplo (Morrondo *et al.*, 2006; Verocai *et al.*, 2010; Ursache *et al.*, 2019). Diante disso, são necessários mais estudos comparativos, bem como associando desinfetantes químicos e agentes biológicos, a fim de otimizar o potencial ovicida e larvicida desses agentes.

No G6 observou-se o maior percentual de redução de ovos. A atividade de ambos os produtos químicos utilizados foi potencializada e ao final do experimento 75.7% dos ovos foram destruídos (figura 3A-C). Isso é muito importante, uma vez que a grande maioria da população acaba utilizando dois ou mais produtos químicos como desinfetantes domésticos, principalmente em canis e abrigos de cães e gatos, como já o relatado aqui. Esse fato está de acordo com Ribeiro (2004), que reportou a importância da higiene dos canis e do solo para evitar manutenção de ovos e larvas em ciclo de transmissão direta e prevenir infecção de hospedeiros intermediários e paratênicos. Por outro lado,

Prats *et al.* (2005) ressaltam que a resistência dos ovos torna impossível qualquer profilaxia com base em desinfetantes em solo de terra. Dessa forma, em delineamento futuro, os experimentos também serão realizados em solo.

Em relação à escolha do número de dias a serem estudados, a intenção foi mimetizar o tempo do ciclo de vida e o período pré-patente (21 dias) de *T. canis*, presente em muitos ambientes. Nesse sentido, a partir do primeiro dia de experimento (dia 1) notou-se claramente a redução do número de ovos, destruídos principalmente pela ação dos compostos químicos (desinfetantes) utilizados.

Os ascarídeos possuem ovos com cascas espessas capazes de resistirem à dessecação e às variações de temperatura, permanecendo por muito tempo no ambiente, dificultando sua eliminação (Tavares, 2011). De acordo com Santos *et al.* (2012), é importante que métodos de prevenção e controle de parasitas sejam implantados, a fim de reduzir a contaminação ambiental pela infecção de ovos e larvas infectantes. Nesse sentido, estes autores ressaltam a importância da utilização de métodos de inviabilização de ovos no ambiente por meio de desinfetantes que porventura sejam utilizados no dia a dia nas residências, áreas comerciais, bem como em ambientes frequentados por cães e gatos. No presente trabalho, os resultados podem ser extrapolados imediatamente para rotina de atenção básica das inúmeras ONGs que cuidam de animais errantes (cães e gatos) todos os dias. Além disso, ressaltamos que tais resultados pontuais poderão servir de base para novas pesquisas envolvendo a associação de produtos químicos e controle biológico.

6. CONCLUSÕES

- ✓ No presente trabalho, todos os grupos experimentais tratados demonstraram eficácia na destruição dos ovos de *Toxocara canis*.
- ✓ Os desinfetantes comerciais utilizados no presente trabalho e usualmente utilizados em residências, clínicas veterinárias, abrigos de animais e canis apresentaram potencial ovicida sobre ovos de *T. canis*.
- ✓ Existe a necessidade de mais estudos para aprimorar o percentual ovicida desses produtos, principalmente diante da possibilidade de potencialização da atividade destes quando associados entre si ou a um método de controle biológico, como o emprego de fungos nematófagos.

7. REFERÊNCIAS

(Conforme a Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária)

Alves Neto AF. *Avaliação da viabilidade de oocistos esporulados de Neospora caninum a diferentes condições de temperatura e ação de desinfetantes*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.

Araújo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Silva AR, Campos AK. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. *Experiment Parasitol* 2009; 121:338-41. [http:// dx.doi.org/j.exppara.2008.12.011](http://dx.doi.org/j.exppara.2008.12.011)

Araújo JV, Maia AS. Antagonistic effect of predacious fungi *Arthrobotrys* on infective *Haemonchus placei* larvae. *J. Helminthol* 1993; 67:136–8. <http://dx.doi.org/10.1017/s0022149x00013018>

Ayçiçek H, Yarsan E, Sarimehmetoglu HO, Tanyüksel M, Girginkardesler N, Özyurt M. Efficacy of some disinfectants on embryonated eggs of *Toxocara canis*. *Turk J Med Sci* 2001; 31(1):35-99.

Ayres M, Ayres JR, Ayres DL, Santos AS. *BioEstat 3.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. 2003. Belém: Sociedade Civil Mamirauá.

Azam D, Ukpai OM, Said A, Abd-Allah GA, Morgan ER. Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. *Parasitol Res* 2012; 649-56. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2536-8>

Barbosa ACMS, Silva LPC, Ferraz CM, Tobias FL, Araújo JV, Loureiro B *et al.* Nematicidal activity of silver nanoparticles from fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int J Nanomedicine* 2021; 14:2341-8. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S193679>

Bouchet F, Boullard Y, Baccam D, Leger N. Ultrastructural studies of alterations induced by microwaves in *Toxocara canis* eggs: prophylactic interest. *Z. Parazitenkd* 1986; 72(6):755-64. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00925096>

Braga FR, Ferraz CM, da Silva EN, de Araújo JV. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control *in vivo* and *in vitro* of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *3 Biotech* 2020; 10(2):62. <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-019-2042-8>

Braga FR, Soares FEF, Giuberti TZ, Lopes, ADCGL, Lacerda T, Ayupe TH, *et al.* Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Vet Parasitol* 2015; 212(3-4):214–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.018>

Braga FR, Araújo JV. Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98(1):71-82. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>

Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Genier HLA, Silva AR, *et al.* Optimizing protease production from an isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* using response surface methodology and its larvicidal activity on horse cyathostomins. *J Helminthol* 2011; 85(02):164–170. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X10000416>

Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Carvalho RO, Araujo JM, Ferreira SR, *et al.* Predatory activity of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on horse cyathostomin infective larvae. *Trop Anim Health Prod* 2010; 42(6):1161-5. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-010-9542-1>

Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Tavela AO, *et al.* Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 2009; 163(4):335-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.003>

Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Siva AR, Araujo JM, Carvalho RO, *et al.* *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Schistosoma mansoni* eggs. *World J Microbiol Biotechnol* 2008; 24:2713–6. <http://dx.doi.org/10.1007/2Fs11274-008-9843-y>

Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO. Observação in vitro da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:356–8. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822007000300024>

CAPC - Companion Animal Parasite Council. Ascarid for dog. Epi info [online]. 2020 [cited 2021 apr 12]. Available from: <https://capcvet.org/guidelines/ascarid/>

Chen J, Liu Q, Liu GH, Zheng WB, Hong SJ, Sugiyama H, *et al.* Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infect Dis Poverty* 2018; 13;7(1):59. <http://dx.doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>

Chowdhury S, Basu A, Kundu S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. *Nanoscale Res Lett* 2014; 9(1):365. <http://dx.doi.org/10.1186/1556-276X-9-365>

Congdon P, Lloyd P. *Toxocara* infection in the United States: the relevance of poverty, geography and demography as risk factor, and implications for estimating county prevalence. *Int J Public Health* 2011; 56(1):15-24. <http://dx.doi.org/10.1007/s00038-010-0143-6>

Costa Silva LP, Pinto Oliveira J, Keijok WJ, da Silva AR, Aguiar AR, Guimarães MCC *et al.* Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the cell-free

filtrate of nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:6373–81. <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S137703>

Dantas-Torres F. Chapter Thirty-Three: *Toxocara* prevalence in dogs and cats in Brazil. *Adv Parasitol* 2020; 109:715-41. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.028>

Despommier D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(2):265-72. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.16.2.265-272.2003>

ESCCAP - European Counsel for Companion Animal Parasites, Worm Control in Dogs and Cats Guideline 01, 6 ed, pp. 11-12. Epi info [online]. 2020 [cited 2021 apr 12]. Available from: https://www.esccap.org/uploads/docs/qjyqgckk_0778_ESCCAP_Guideline_GL1_v12_1p.pdf

Ferraz CM, Soares FEF, Senna CC, Costa Silva LP, Araújo JV, Moreira TF, *et al*. Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on eggs of *Spartocera dentiventris* (Berg) (Hemiptera: Coreidae) under laboratory conditions. *Bras J Biol* 2020; 81(4):1122-4. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.231550>

Ferraz CM, Sobral SA, Senna CC, Junior OF, Moreira TF, Tobias FL *et al*. Combined use of ivermectin, dimethyl sulfoxide, mineral oil and nematophagous

fungi to control *Rhabditis* spp. *Vet Parasitol* 2019; 275, 108924.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108924>

Fisher M. Update on *Toxocara* species and toxocarosis. *The Veterinary Nurse* 2014; 5(2):88–92. <http://dx.doi.org/10.12968/vetn.2014.5.2.88>

Frassy LN, Braga FR, Silva AR, Araújo JV, Ferreira SR, Freitas LG. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(1):102-4. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822010000100024>

Friedmann E, Krause-Parello CA. Companion animals and human health: benefits, challenges, and the road ahead for human–animal interaction. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 2018; 37(1), 71-82. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.37.1.2741>

Ghareib M, Tahon MA, Saif MM, El-Sayed Abdallah W. Rapid extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by *Cunninghamella phaeospora* culture supernatant. *Iran J Pharm Res* 2016;15(4):915–24.

Glickman LT, Schantz PM. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiol Rev* 1981; 3(1):230–50. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a036235>

Hendrix CM. Helminthic infections of the feline small and large intestines: diagnosis and treatment. *Vet Med* 1995; May, 456-72.

Jaigobind AGA, Amaral L, Jaisingh S. Dossiê técnico: desinfetante doméstico. Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR). Epi Info [online]. 2007 [cited 2021 apr 25]. Available from: <http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MjY1>

Jimenez Castro PD, Howell SB, Schaefer JJ, Avramenko RW, Gilleard JS, Kaplan RM. Multiple drug resistance in the canine hookworm *Ancylostoma caninum*: an emerging threat? *Parasit Vectors* 2019; 12(1):576. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-019-3828-6>

Kerry BR, Simon A, Rovira AD. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. *Ann Appl Biol* 1984; 105(3):509–16. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1744-7348.1984.tb03077.x>

Kopp SR, Kotze AC, McCarthy JS, Coleman GT. High-level pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Vet Parasitol* 2007; 143:299-304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.036>

Larsen M. Biological control of helminthes. *Int J Parasitol* 1999; 29:39–46. [http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519\(98\)00185-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00185-4)

Lim PKC, Yamasaki H, Mak JW, Wong SF, Chong CW, Yap IKS, *et al.* Field evaluation of a rapid diagnostic test to detect antibodies in human toxocariasis. *Acta Trop* 2015; 148:32–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.011>

Lima JAC, Ferraz CM, Sobral SA, Geniêr HLA, Soares FEF, Loureiro Junior DB, *et al.* Combined use of chemical and biological compounds to control hookworm. *J Helminthol* 2020; 94:1-4. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X20000334>

Lim-Leroy A, Chua TH. Prevalence and risk factors of geohelminthiasis among the rural village children in Kota Marudu, Sabah, Malaysia. *PLoS One* 2020; 15(9):e0239680. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0239680>

Lopez-Llorca LV, Maciá-Vicente JG, Jansson H. Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio A, Mukerji KG (eds) *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*. Springer, Dordrecht; 2008. p. 51–76.

Lysek H. Classification of ovicide fungi according to type of ovicidity. *Acta Univ Palacki Olomuc* 1976; 76(1):9–13.

Lysek H, Fassatiová O, Pineda NC, Hernández NL. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol (Praha)* 1982; 29(3):265-70.

Macpherson CNL. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *Int J Parasitol* 2013; 43(12-13), 999–1008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004>

May, R. Pets are helping us cope during the pandemic-bit that may be stressing them out. National Geographic. Epi Info [online]. 2021 [cited 2021 apr 10]. Available from: <https://www.nationalgeographic.com/animals/article/pets-are-helping-us-cope-during-the-pandemic>.

Mendoza-De Gives P, Vazquez-Prats VM. Reduction of *Haemonchus contortus* infective larvae by three nematophagous fungi in sheep faecal cultures. *Vet Parasitol* 1994; 5(3):197-203. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)00646-G](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4017(93)00646-G)

Meyer WJ, Wiebe MG. Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnol Lett* 2003; 25(10):791–5. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1023580621840>

Moreira GMSG, Telmo PL, Mendonça M, Moreira AN, McBride AJA, Scaini CJ, *et al*. Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends Parasitol* 2014; 30(9):456–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003>

Morrondo P, Diez-Morrondo C, Pedreira J, Diez-Baños N, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, *et al*. *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant-exposition. *Parasitol Res* 2006; 99(5):558-61. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-006-0200-5>

Mota MA, Campos AK, Araújo JV. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesq Vet Bras* 2003; 23(3). <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2003000300001>

Naish S, McCarthy J, Williams GM. Prevalence, intensity and risk factors for soil-transmitted helminth infection in a South Indian fishing village. *Acta Trop* 2004; 91(2):177-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.04.004>

Nijssen R, Mughini-Gras L, Wagenaar JA, Franssen F, Ploeger HW. Environmental contamination with *Toxocara* eggs: a quantitative approach to estimate the relative contributions of dogs, cats and foxes, and to assess the efficacy of advised interventions in dogs. *Parasit Vectors* 2015; 8:397. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1009-9>

Oh KS, Kim GT, Ahn KS, Shin SS. Effects of Disinfectants on Larval Development of *Ascaris suum* Eggs. *Korean J Parasitol* 2016; 54(1):103–7. <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2016.54.1.103>

Okulewicz A, Perec-Matysiak A, Buńkowska K, Hildebrand J. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* and *Toxascaris leonina* in wild and domestic carnivores. *Helminthologia* 2012; 49(1): 3–10. <http://dx.doi.org/10.2478/s11687-012-0001-6>

Overgaauw PAM. Aspects of *Toxocara* epidemiology: toxocarosis in dogs and cats. *Crit Rev Microbiol* 1997; 23(3):233–51. <http://dx.doi.org/10.3109/10408419709115138>

Overgaauw PAM, Van Knapen F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol* 2013; 193(4):398–403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035>

Paul M, King L, Carlin EP. Zoonosis of people and their pets: a US perspective on significant pet-associated parasitic diseases. *Trends Parasitol* 2010; 26(4):153–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.008>

Prats A, Dumon C, Garcia F, Marti S, Coll V. Neonatologia e pediatria canina e felina. São Paulo: Interbook, 2005.

Prichard RK, Geary TG. Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2019; 10:69–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.06.002>

Rai SK, Uga S, Ono K, Rai G, Matsumura T. Contamination of soil with helminth parasite eggs in Nepal. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2000; 31(2):288–93.

Ribeiro VM. Controle de helmintos de cães e gatos. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Ricketisioses, Ouro Preto, MG: 2004. *Rev Bras Parasitol Vet*; v.13, suplemento 1.

Santos ECF, Carneiro MB, Tavares PV, Batista LCSO, Melo RMPS, Azevedo TRC, *et al.* Ação de diferentes desinfetantes sobre viabilidade e mortalidade de larvas de terceiro estágio de *Ancylostoma* spp. *Rev Bras Med Vet* 2012; 34(1):55-9.

Schnieder T, Laabs E, Welz C. Larval development of *Toxocara canis* in dogs. *Vet Parasitol* 2011; 174(3-4):193–206.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027>

Selek MB, Karagoz E, Baylan O. Toxocariasis: a review. *Medicine Science Int Med Journal* 2016; 5(4):1063-7.
<http://dx.doi.org/10.5455/medscience.2016.05.8471>

Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CDF, Frassy LN. Activity *in vitro* of fungal conidia of *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on *Haemonchus contortus* infective larvae. *J Helminthol* 2011; 85(2):138-41.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X10000362>.

Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval J F, Schantz P, Maizels R. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trend Parasitol* 2009; 25(4):182–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.006>

Soares, FEF. *Produção, purificação e identificação de enzimas extracelulares de fungos nematófagos e suas atividades nematocidas* [Tese]. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa; 2014.

Soares FEF, de Queiroz JH, de Araújo JV, Queiroz PV, Gouveia AS, Hiura E, *et al.* Nematicidal action of chitinases produced by the fungus *Monacrosporium thaumasium* under laboratorial conditions. *Biocontrol Sci Technol* 2015; 25: 337–44. <http://dx.doi.org/10.1080/09553157.2014.979133>

Stirling GR, West LM. Fungal parasites of root-knot nematodes eggs from tropical and subtropical regions of Austrália. *Australas Plant Pathol* 1991; 20:149–54. <http://dx.doi.org/10.1071/APP9910149>

Suzuki T, Coelho FAS, Marson FG, Coelho MDG, Araújo AJUS. Eficácia de desinfetantes comerciais na inibição da evolução de ovos de *Ancylostoma* spp. obtidos de cães naturalmente infectados. *Revista Biociências - Universidade de Taubaté* 2013; 19(1):86-92. ISSN: 14157411

Tavares PV. *Ação de Diferentes Desinfetantes na Viabilidade e Desenvolvimento de ovos e na migração larvar de Toxocara cati (Schrank, 1788) em camundongos* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2011.

Tavela AO, Araújo JV, Braga FR, Silveira WF, Silva VHD, Júnior MC *et al.* 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. *Res Vet Sci* 2013; 94(3):568–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.011>

Taylor M, Coop R, Wall R. *Parasitologia Veterinária*. 4th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017.

Ursache AL, Mirean V, Dumitrache M, Andrei L, Stefanut L, Cozma V, *et al.* Is routine disinfection efficient in preventing contamination with *Toxocara canis* eggs? *J Helmitol* 2019; 12:94:e60. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X1900052X>

Verocai GG, Tavares PV, De A. Ribeiro F, Correia TR, Scott FB. Effects of Disinfectants on *Toxocara canis* Embryogenesis and Larval Establishment in Mice Tissues. *Zoonoses Public Health* 2010; 57(7-8):e213–6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01330.x>

Wells DL. Domestic dogs and human health: An overview. *Br J Health Psychol* 2007; 12(1):145–56. <http://dx.doi.org/10.1348/135910706X103284>

Wharton D. Nematode eggshells. *Parasitology* 1980; 81:447–63. <https://dx.doi.org/10.1017/s003118200005616x>

Yamasaki H, Akari K, Lim PKC, Zasmy N, Mak JW, Taib R, *et al.* Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J Clin Microbiol* 2000; 38(4):1409-13. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.38.4.1409-1413.2000>

Yang J, Liang L, Li J, Zhang KQ. Nematicidal enzymes from microorganisms and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97(16):7081-95. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-5045-0>

Yang J, Tian B, Liang L, Zhang KQ. Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 75(1):21–31. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-007-0881-4>

8. ANEXOS



Figura 1. Microtubos utilizados no ensaio experimental, mantidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Veterinária da UVV durante o período do experimento. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 2. Dia 21: G1: Hifas e clamidósporos de *Duddingtonia flagrans* aderidas (seta preta) a casca e ovo degenerado de *Toxocara canis* (seta branca). Objetiva 10x. Fonte: Arquivo pessoal.

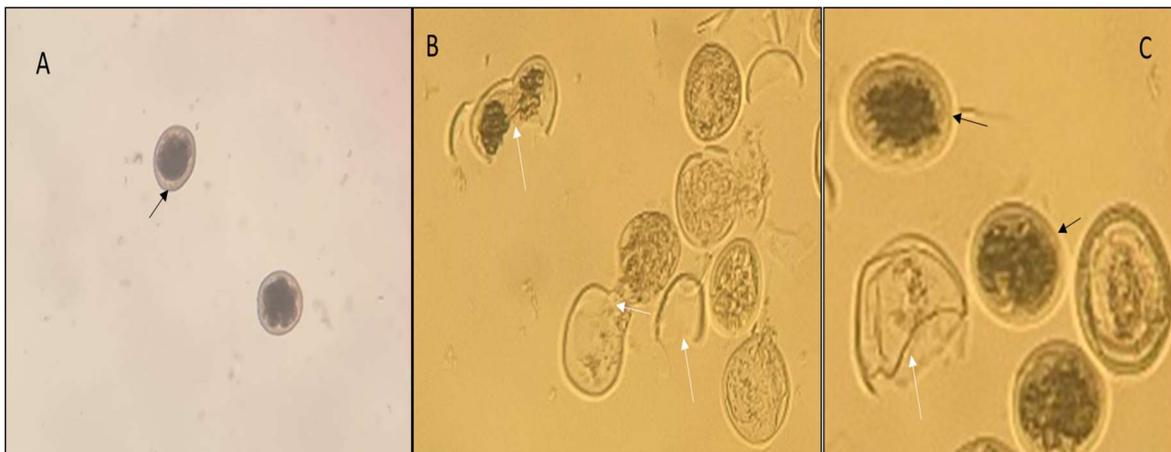


Figura 3 A-C. A - Ovos de *Toxocara canis* íntegros no grupo controle (seta preta); B e C - ovos de *Toxocara canis* (seta branca) rompidos e íntegros (seta preta) nos grupos G2 e G6 respectivamente, ao final do experimento. Fonte: Arquivo pessoal.