**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**
**Instituto de Biologia**
**Curso de Ciências Biológicas Licenciatura**

# Ação ovicida de *Purpureocillium lilacinum* aplicado a solo contaminado com ovos de *Toxocara canis*

**Isabel da Rocha Aldrighi**

Pelotas, 2017

**Isabel da Rocha Aldrighi**

# Ação ovicida de *Purpureocillium lilacinum* aplicado a solo contaminado com ovos de *Toxocara canis*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: ProfªDrª Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A363a Aldrighi, Isabel da Rocha

Ação ovicida de Purpureocillium lilacinum aplicado a solo contaminado com ovos de Toxocara canis / Isabel da Rocha Aldrighi ; Daniela Isabel Brayer Pereira, orientadora. — Pelotas, 2017.

32 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Controle biológico. 2. Fungos nematófagos. 3. Parasito. 4. Toxocaríase. I. Pereira, Daniela Isabel Brayer, orient. II. Título.

CDD : 589.2

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Isabel da Rocha Aldrighi

Ação ovicida de *Purpureocillium lilacinum* aplicado a solo contaminado com ovos de *Toxocara canis*

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito parcial para obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas. Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/12/2017

Banca examinadora:

Profª Drª Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientadora)
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Fernando de Souza Maia Filho
Doutor em Parasitologia pela Universidade Federal de Pelotas

M.ª Cristiane Telles Baptista

Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante minha jornada aos familiares e amigos que estiveram comigo apoiando e incentivando-me.

Em especial ao meu marido, pelo amor, companheirismo e compreensão, obrigada por ter estado ao meu lado nesta etapa tão importante da minha vida.

À meu filho, por compreender minha ausência em certos momentos e principalmente pelo estimulo constante, contribuindo para que eu alcançasse meus objetivos.

Agradeço a dedicação e o voto de confiança da minha orientadora Daniela Isabel Brayer Pereira, que não mediu esforços para a realização deste estudo.

A todos os amigos, colegas, técnicos e servidores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFPEL, em especial aos amigos do laboratório de Micologia Cristiane, Caroline, Carolina e Julia por compartilhar de momentos de muito trabalho, mas também de muito aprendizado.

Agradeço a Javier Alexander Bethancourt Garcia pela contribuição na análise dos dados estatísticos.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais, por terem me ensinado os valores éticos e morais, aos meus irmãos e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços pra que eu chegasse até aqui.

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade em realizar minha graduação.

E por fim a todos que de alguma forma estiveram e estão presentes em minha vida, vocês construíram comigo um sonho que hoje se torna realidade.

**Resumo**

ALDRIGHI, Isabel da Rocha. **Ação ovicida de *Purpureocillium lilacinum* aplicado a solo contaminado com ovos de *Toxocara canis***. 2017. 32f.Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

*Toxocara* spp. é um nematóide que acomete cães, humanos e outros mamíferos. É uma doença zoonótica amplamente estudada. Sua ocorrência é associada a alta incidência de *Toxocara canis* em cães, bem como a contaminação ambiental do solo com ovos do parasito. Métodos que empregam o controle biológico com fungos nematófagos podem ser utilizados de forma integrada a outras medidas de controle. Nesta perspectiva, o estudo verificou a ação ovicida *in vitro* de *Purpureocillium lilacinum* aplicado em solo contaminado com ovos de *T. canis*. Para os testes foi utilizado um isolado fúngico pertencente à micoteca do laboratório de micologia oriundos da Embrapa CENARGEN. Os ovos do parasito foram obtidos de fezes de cães jovens naturalmente parasitados. Os ensaios experimentais foram divididos em dois grupos com cinco replicatas e três repetições. No grupo tratado 200 gr. de solo previamente autoclavado recebeu 300 ovos de *T. canis* e 10 mL de suspensão de conídios ($10^8$/mL) de *P. lilacinum*. No grupo controle 200 gr. de solo recebeu 300 ovos do parasito e 10 mL de água destilada estéril. Ambos os grupos foram incubados em estufa com fotoperíodo de 12 horas, a 25ºC e umidade relativa de 85%.No 28º dia, 100 ovos de cada grupo foram recuperados pela técnica de Caldewal e submetidos ao teste de viabilidade celular com azul de tripan 0,4%.Na avaliação microscópica observou-se que os ovos que apresentavam rupturas nas membranas, estavam impregnados com azul de Tripan, enquanto que os ovos que não apresentavam rupturas, ou seja, com membrana intacta, não foram corados. Evidenciou-se que no grupo controle houve predominância de ovos embrionados viáveis, enquanto no grupo tratado observou-se maior quantidade de ovos inviáveis, independentemente de estarem ou não embrionados. Os resultados deste estudo evidenciam significativa redução da viabilidade dos ovos de *T.canis* quando expostos ao fungo *P. lilacinum* aplicado ao solo.

**Palavras-chave:** Controle Biológico; Fungos Nematófagos;Parasito;Toxocaríase

**Abstract**

ALDRIGHI, Isabel da Rocha**. Ovicida lactivity of *Purpureocillium lilacinum* applied to soil contaminated with *Toxocara canis* eggs**. 2017. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

*Toxocara* spp. is a nematode that affects dogs, humans and other mammals. It is a zoonotic disease widely studied. Its occurrence is associated with a high incidence of *Toxocara canis* in dogs, as well as environmental contamination of the soil with parasite eggs. Methods that employ biological control with nematophagous fungi can be used in an integrated way with other control measures. In this perspective, the present study verified the *in vitro* ovicida lactivity of *Purpureocillium lilacinum* applied to soil contaminated with *T.canis* eggs. For the tests, a fungal isolate belonging to the mycology laboratory was used. The parasite eggs were obtained from feces of naturally parasitized young dogs. The experimental trials were divided into two groups with five replicates and three repetitions. In the treated group the previously autoclaved soil received 300 eggs of *T. canis* and 10 mL of *P. lilacinum* conidia suspension ($10^8$/mL). In the control group the soil received 300 eggs of *T. canis* and 10 mL of sterile distilled water. Both groups were incubated in a 12-hour photoperiod at 25°C and 85% relative humidity. On the 28th day, 100 eggs from each group were recovered by the Caldewal technique and submitted to the cell viability test with 0.4% trypan blue. In the microscopy evaluation was observed that the eggs that presented ruptures in the membranes were impregnated with trypan blue, whereas the eggs with intact membrane were not stained. It was evidenced that in the control group there was a predominance of viable embryonated eggs, whereas in the treated group a greater amount of nonviable embryonated or not embryonatedeggs were observed. The results of this study show a significant reduction in the viability of *T. canis* eggs when exposed to *P. lilacinum* fungus applied to the soil.

Key words: Biological Control, Nematophagous Fungi, Parasite, Toxocariase

## Lista de Figuras

**Figura 1-**Características micromorfológicas de *Purpureocilium lilacinum.* Visualiza-se conidóforos ramificados e fiálides que originam conídios em cadeias. Azul de algodão. Objetiva 40X.....16

**Figura 2 -**Ovos de *Toxocara canis* submetidos à avaliação de viabilidade com azul de Tripan (AT). (A) Ovo não embrionado impregnado com AT e ruptura da casca do ovo (grupo tratado), (B) Ovo embrionado rompido com larva impregnada pelo AT (larva inviável) (grupo tratado. (C) Ovo não embrionado não impregnado com AT (grupo controle). (D) Ovo embrionado não impregnado pelo AT (grupo controle). Objetiva 100 X.....22

**Figura 3-** Ovos de *Toxocara canis* embrionados viáveis e inviáveis, não embrionados viáveis e inviáveis expostos ao fungo *P. lilacinum*.....24

## Lista de Tabelas

**Tabela 1 -** Atividade ovicida de *Purpureocillium lilacinum* em solo contaminado com ovos de *Toxocara canis.*.....23

**Tabela 2 –** Média de ovos de *Toxocara canis* embrionados viáveis e inviáveis, não embrionados viáveis e inviáveis expostos ao fungo *P. lilacinum*.....23

**Sumário**

1 Introdução ..... 10
2.1Objetivo Geral ..... 12
2.2Objetivos Específicos ..... 12
3.Revisão de Literatura ..... 13
4. Materiais e Métodos ..... 18
5. Resultados.....21
6.Discussão.....25
7.Conclusão.....27
Referências.....28

## 1 Introdução

A presente pesquisa tem por propósito trazer à tona questões atinentes ao controle biológico de parasitos de importância médica e veterinária. Neste contexto, os fungos nematófagos presentes no ecossistema desempenham importante papel como agentes naturais controladores de parasitos. Será avaliado o potencial ovicida do fungo *Purpureocillium lilacinum*(previamente *Paecilomyces lilacinus*)sobre ovos de *Toxocara canis*. As informações postas na sequência tem por intuito descrever as ações praticadas com o fim de atender a proposta final para a qualificação do projeto.

Primeiramente, destaca-se que a alta incidência de *T.canis* em cães,bem como a contaminação do solo com ovos deste parasito, aliada a resistência dos ovos no solo, contribuem para a ampla distribuição geográfica do parasito.*T.canis* é um parasito pertencente ao filo Nematoda, classe Secernentea, família Anisakidae, gênero *Toxocara* e espécie *T. canis*, tendo como seu hospedeiro definitivo, os cães. A doença proveniente da presença de *T. canis* acomete o intestino delgado desses animais, se origina pela ingestão de ovos embrionados do ambiente pelos mesmos (NEVES et al., 2005).

Segundo Abe;Oselka (1991) uma fêmea adulta de *Toxocara* spp. pode produzir até 200.000 ovos por dia. Os ovos quando liberados no ambiente não são embrionados, portanto não infectantes. No entanto, para se tornarem infectantes, após caírem no solo, precisam de um período de incubação (duas a seis semanas), além de condições favoráveis de temperatura (de 15Cº a 35ºC) e umidade (acima de 85%).

No homem, *T. canis* causa a toxocarose ou toxocaríase que resulta da ingestão acidental de ovos embrionados presentes no solo. Conforme descrito por Lescano (1991), estudos apontam que há contaminação em diferentes tipos e níveis de solo, evidenciando o caráter cosmopolita desta zoonose. A contaminação por ovos embrionados em solo de praças e áreas públicas estão presente mormente em crianças. Porém, outro risco significativo de infecção, principalmente em adultos, é o consumo de carne mal cozida de hospedeiros paratênicos.

Humanos e outros mamíferos (bovinos, ovinos e suinos), quando infectados, são hospedeiros paratênicos, uma vez que não háo desenvolvimento completo do ciclo do helminto. No homem, não há o desenvolvimento do parasito adulto no

intestino com eliminação de ovos para o meio externo. As manifestações clínicas de toxocaríase em humanos pode variar de casos assintomáticos até infecções sistêmicas, dependendo do número de larvas infectantes, da frequência e local da reinfecção e da resposta do sitema imunológico do hospedeiro (PAWLOWSKI, 2001).

Ainda assim, é preciso atentar-se para o fato de que, em seres humanos,as larvas podem sobreviver por longos períodos, migrando para tecidos e órgãos, permanecendo encistadas e viáveis, determinado a larva *migrans* visceral ou larva *migrans* ocular (TAYLOR et al., 1987).

A maioria dos métodos de controle e tratamento de doenças parasitárias utilizam controle químico. No entanto, o tratamento químico deixa resíduos tóxicos aos animais e ao ambiente. Segundo Grøonvold et al. (1996) a busca por produtos que não agridam o meio ambiente ea procura por métodos que utilizamo controle biológico apresenta inúmeras vantagens entre elas: fácil aplicação, boa dispersão ambiental, baixo custo, efeito prolongado, diminuição do aparecimento de resistência e possibilidade de associação com outras metodologias, além de não deixar resíduos e não apresentarem toxicidade aos animais e ambiente.

Perante os inúmeros problemas ocasionados pelo controle químico, em especial os efeitos nocivos que acometem a saúde humana e o ambiente,é imprescindível o desenvolvimento de métodos alternativos de controle. Neste contexto, a utilização do controle biológico é uma alternativa que contribui positivamente para o controle de parasitos de importância médica e veterinária sem causar prejuízos e contaminação ambiental.

Para Cook; Godfrey (1983), dentre os micro-organismos selecionados como antagonistas estão as bactérias e fungos, os quais devem possuir especificidade de ação, alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado. Os fungos utilizados no controle biológico possuem ação direta sobre seu antagônico, atuando por meio de antibiose, parasitismo, competição, predação ou hipovirulência. Adicionalmente, mostram-se eficientes na redução das populações dos parasitos, tanto em condições de laboratório, como a campo (LARSEN, 1999).

Nesta perspectiva, o trabalho em questão verificou a ação do fungo nematófago *Purpureocillium lilacinum* sobre ovos de *T.canis* presentes no solo.

## 2.1 Objetivo Geral

Verificar a ação ovicida *in vitro* do fungo *Purpureocillium lilacinum* aplicado a solo contaminado com ovos de *Toxocara canis*.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar acapacidade de interação do fungo nematófago *P. lilacinum* com ovos não embrionados de *T. canis* presentes em solo previamente contaminado;

- Classificar a atividade ovicida do fungo *P. lilacinum* após interação fungo-ovo;

-Avaliar a viabilidade dos ovos de *T.canis* após a interação com o fungo.

## 3 Revisão de Literatura

Estudos de âmbito mundial apontam *T. canis* como um importante agente zoonótico, sendo considerado um dos mais comuns parasitos descritos na população canina, podendo sua prevalência atingir até 81%,conforme descrito por Santarén et al. (1998). No Brasil, as pesquisas apontam prevalências que variam desde 8,7% a 54,8% (FIGUEIREDO et al., 2005; SCHOENARDIE et al., 2013; PEDROSO et al., 2015).

Kimura (2016) reforça que existem mais de 200 zoonoses que são causas importantes de morbidade e mortalidade em grupos vulneráveis como crianças, idosos e trabalhadores envolvidos com saúde pública e medicina veterinária. Para o autor, a ocorrência de doenças parasitárias em solos de localidades públicas é atribuída ao parasitismo por *T. canis*. Os resultados de seus estudos evidenciaram alta incidência de *T. canis* em solos de parques e praças de localidades públicas, uma vez que mais de 60% das amostras analisadas demonstraram a presença deste parasito.

Chieffi; Muller (1976) e Rey (1992) ressaltaram que a prevalência de parasitismo por *T.canis* acomete os cães em todas as fases de sua vida, entretanto sua maior incidência ocorre notadamente em animais jovens, devido a baixa resistência imunológica, bem como, a infecção neonatal de filhotes pelas vias transplacentária e transmamária (BARRIGA, 1991). Desta forma os cães são apontados como os principais responsáveis pela contaminação ambiental.

Os resultados de Moura et al. (2013), realizado em áreas públicas de Pelotas,RS, Brasil, demonstraram um relevante índice de contaminação parasitária.Segundo os pesquisadores,a contaminação com ovos de *T.canis* alcançaram o segundo maior índice de positividade, reforçando os estudos prévios sobre a alta incidência de *T. canis* em parques e praças públicas.

Complementando as pesquisas que abordam a incidência de *T. canis* em cães, há também àquelas que tratam da viabilidade dos ovos deste parasito no ambiente. Na visão de Bourdeau (1986) e Abe; Oselka (1991), os ovos de *T. canis*,possuem três camadas: a mais externa, a camada mamilonada; a central, composta de proteína e quitina, e a camada interna, predominantemente lipídica. Esta última funciona como principal barreira contra a permeabilidade do ovo. Os ovos permanecem viáveis no ambiente por um longo período devido à consistência de

sua cutícula externa, expondo a população humana e outros animais ao risco de infecção e ao desenvolvimento da doença.

Segundo Soulsby (1982) o ciclo biológico de *T. canis* no hospedeiro definitivo pode apresentar duas formas de migração: a hepato-traqueal e a somática. Na migração hepato-traqueal o cão ingere ovos embrionados presentes no solo, libera as larvas no estômago e no intestino delgado; as larvas penetram a mucosa intestinal, invadem a corrente sanguínea ou linfática, chegando ao fígado, coração e os pulmões. Dos pulmões as larvas penetram até os brônquios e passam para traqueia e faringe, sendo deglutidas; após duas mudas, tornam-se adultas iniciando a postura dos ovos. Na migração somática as larvas são transportadas pelo sistema porta, após chegarem aos pulmões retornam ao coração migrando para os tecidos e órgãos permanecendo encistadas.

Em seres humanos, segundo Beaver et al. (1952), ocorre a síndrome *migrans* visceral. Nesta infecção, as larvas de *T. canis*no intestino humano eclodem e migram para vários orgãos, dentre eles fígado, pulmão, coração e sistema nervoso central. Podem ocorrer distúrbios respiratórios como tosse persistente e asma, há registros de alterações neurológicas, incluindo convulsões, meningoencefalite e epilepsia, sendo também relatados casos de pancreatite e miocardite. Na sindrome larva *migrans* ocular estima-se que mais de 700 pessoas são infectadas por ano, sendo descritos vários casos deperda parcial de visão.

Dentre os mecanismos que podem ser empregados no controle de *T. canis,* está o uso de micro-organismos antagonistas naturais, controladores biológicos. O controle biologico tem como princípio manter o equilíbrio do ecossistema do solo, impedindo que o crescimento de uma população de determinados microrganismos seja favorecida (LÝSEK et al., 1982).

Do ponto de vista ecológico o controle biológico é a ação de parasitóides, predadores e patógenos que mantém a densidade populacional de outros organismos numa média mais baixa do que ocorreria em sua ausência (DeBACH, 1964; VAN DEN BOSCH et al. 1982).

Grøonvold et al. (1996) aponta o controle biologico como um método que utiliza inimigos naturais (parasito, parasitóide, predador ou patógeno) a fim de diminuir ou manter as populações em niveis não prejudiciais, neste sentido, o controle biológico utilizando fungos nematófagos surge como uma alternativa promissora no controle de *T.canis.*

A esse respeito, Faedo et al. (2002) elucida que, para que um fungo seja efetivo como controlador biológico, esse deverá estar presente e ativo nas fezes, no solo e no ambiente ao mesmo tempo que as formas pré-parasitárias, neste caso em especial, do parasito *T. canis*.

Seguindo tal linha de pensamento, Barron (1977) afirma que os fungos nematófagos têm alta capacidade reprodutiva, bem como aptidão em suportar condições ambientais diversas.

Mota et al. (2003), destaca que mais de 150 espécies de fungos nematófagos já foram catalogadas. Os fungos nematófagos são conhecidos tanto pela sua capacidade de destruir helmintos, como por sua característica ovicida. É relevante informar que os fungos nematófagos são classificados como antagonistas naturais, pois são capazes de promover a captura, morte ou mesmo destruição de larvas e ovos de helmintos. Tal situação atribuída a estes fungos permite que os mesmos contribuam na minimização dos problemas relacionados à resistência, à contaminação ambiental e a diminuição das sucessíveis infecções por hospedeiros.

Conforme descrito por Mota et al. (2003) e Araújo et al. (2004) os fungos nematófagos são divididos em três grupos: a) Fungos que capturam os nematóides com armadilhas (predadores): estes fungos produzem estruturas em forma de anéis constritores e não constritores, hifas, botões e redes tridimensionais adesivas ao longo do micélio. b) Fungos endoparasitas que se desenvolvem no interior do corpo do nematódeo, sendo o esporo a forma infectante. A infecção inicia-se com a adesão do esporo à cutícula do nematódeo (esporo adesivo) ou através da ingestão. Em seguida, o esporo germina, penetra na cavidade do corpo onde produz o talo infeccioso que cresce e absorve o conteúdo corporal do nematódeo. c) Fungos parasitos de ovos de nematóides (ovicidas): estes fungos não produzem hifas vegetativas fora do corpo do hospedeiro, mas hifas férteis ou conidióforos contendo esporos. Suas hifas penetram a casca do ovo, através de pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume.Os fungos ovicidas penetram na membrana dos ovos de nematóides através de uma estrutura especializada, que é formada a partir do contato com a cutícula do ovo. Após a penetração, as hifas aumentam o tamanho rompendo a membrana vitelínica, quitinosa e lipídica, ocasionando o rompimento da membrana vitelínica, a vacuolização da membrana quitinosa e a dispersão da membrana lipídica, ocorrendo a penetração e a colonização no interior do ovo.

O gênero *Purpureocillium lilacinum* é uma das espécies mais estudadas do gênero devido sua atividade nematicida. Pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Ophiocordycipitaceae, é um anamorfo do ascomiceto que apresenta conidióforos ramificados em grupos de bifurcações irregulares. Caracteriza-se por apresentar conídios separados das fiálides formando correntes. Os conidióforos possuem cerca de 600 µm de comprimento e desenvolvem grupos de correntes laterais (DOMSCH, et al., 1980). (Figura 1).

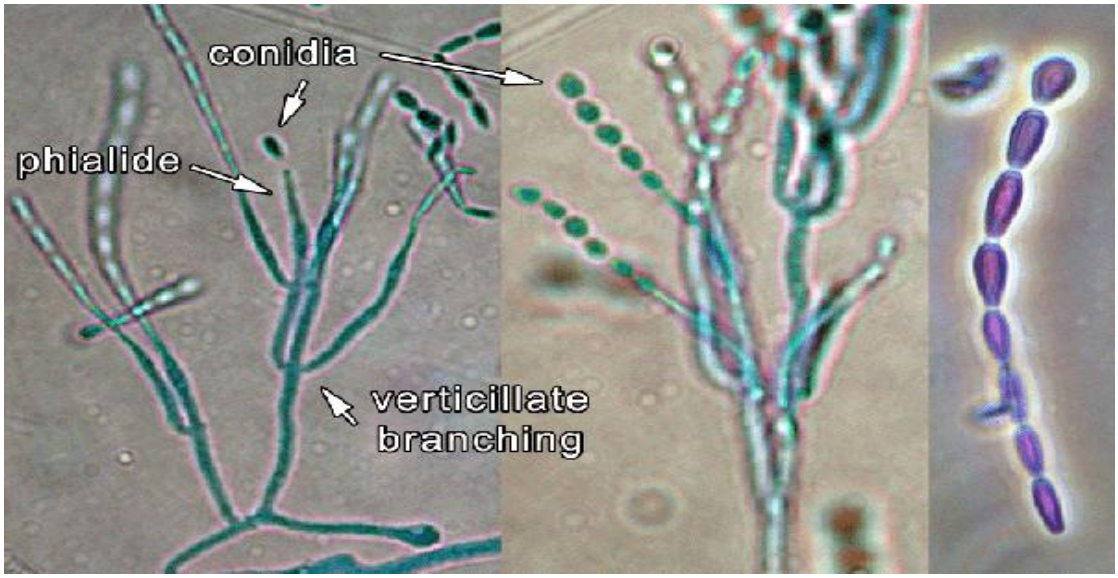


Figura 1:Características micromorfológicas de *Purpureocilium lilacinum.*Visualiza-se conidóforos ramificados e fiálides que originam conídios em cadeias. Azul de algodão. Objetiva 40x. Fonte-https://www.unknown2a-may05.gi

*P.lilacinum,* previamente conhecido como *Paecilomyces lilacinus,* segundo Medrano et al. (2015) é um fungo filamentoso, saprófito, comumente encontrado em solos agrícolas. Seu desenvolvimento é favorecido em temperaturas entre 15 e 30C°, com ótimo crescimento em temperaturas entre 25 e 30C°. Possui uma ampla adaptação aopH do solo tornando-se um ótimo competidor. Quando aplicado no solo e em condições ambientais favoráveis o fungo se estabelece, cresce e dissemina-se rapidamente e, em curto período de tempo, pode ser utilizado como agente de biocontrole sem ocasionar qualquer perigo a animais e seres humanos, não interferindo no crescimento de organismos edáficos.

No Brasil, pesquisas realizadas por Araújo et al. (1995) com isolados de vários gêneros de fungos nematófagos, entre eles *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* spp., *Fusarium* spp., *Humicola* spp., *Mortierella* spp., *Mucor* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicilium* spp., *Pochonia* spp. e*Monacrosporium* spp.,

demonstraram que estes fungos apresentam potencial ovicida sobre ovos de helmintos.

Similarmente, Maia Filho et al. (2013) ao avaliarem o efeito ovicida de diferentes fungos isolados de solo do município de Pelotas/RS,demonstraram a ação ovicida de *Trichoderma* spp., complexo *Fusarium solani* e *Acremonium* spp. sobre ovos de *Toxocara canis.* Em outro estudo, Maia-Filho (2016) avaliou a infectividade de ovos embrionados de *T. canis* em animais experimentais previamente expostos aos fungos nematófagos *Trichoderma virens* e *P. lilacinum,* os resultados do estudo evidenciaram que os fungos foram capazes de reduzir a infecção experimental, sendo considerados promissores agentes de biocontrole de *Toxocara canis*.

Entretanto, apesar da importância dos resultados obtidos em testes *in vitro,* bem como, com animais experimentais, estudos avaliando o grau de interação do fungo com o ovo de *T. canis* em seu habitat natural são inexistentes. Desta forma, nesta pesquisa avaliou-se a interação de *P. lilacinum* aplicado a solo contaminado com ovos de *T. canis.*

## 4. Materiais e Métodos

**4.1. Local:** O estudo foi realizado no Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário UFPel - Capão do Leão, s/nº, no período de março de 2016 a dezembro de 2017.

**4.2. Isolados fúngicos e preparação dos inóculos:** O isolado fúngico de *P. lilacinum* utilizado na pesquisa pertence à micoteca do Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, oriundos da Embrapa CENARGEN. A cultura fúngica foi mantida em tubos de ensaio contendo agar batata (PDA) a 4ºC. Imediatamente antes da realização dos experimentos o isolado fúngico foi subcultivado para placas de Petri contendo PDA e incubados a 25°C, durante dez dias.

Para a preparação do inóculo, uma placa de Petri com a cultura fúngica foi inundada com 10 mL de água destilada estéril adicionado de uma gota de Tween 20 e os conídios fúngicos foram raspados com auxílio de lâmina de bisturi esterilizada, o inoculo foi transferido para um tubo de falcon e agitados no Vortex VX – 28, foram realizadas diluições seriadas, para obter $10^8$ conídios/mL. Esses conídios foram contados em câmara de Newbauer, para a confirmação dos conídios utilizou-se o espectrofotômetro, transmitância de 19% - 530nm.

Para testar a viabilidade da suspensão, foi semeada uma alíquota de 100µL do inoculo em placa de Petri contendo meio PDA, incubada em estufa a 25ºC durante dez dias.

**4.3. Obtenção dos ovos de *Toxocara canis*:** Para obtenção doparasito *T. Canis* houve a colaboração de integrantes da comunidade do Bairro Areal, Pelotas, RS. Em frascos coletores estéreis, as fezes de cães jovens parasitados foram coletadas e imediatamente encaminhadas ao laboratório. As amostras de fezes foram submetidas alavagem e as fêmeas do parasito foram separadas. Os ovos foram obtidos por meio de histerectomia, conforme descrito por Maia Filho et al. (2013). Após obtenção, os ovos foram acondicionados em uma solução de formalina 2%, sulfato de estreptomicina 0,05% e cloranfenicol 0,01% e mantidos em refrigeração até a utilização.

**4.4. Ensaios experimentais:** Os ensaios experimentais foram divididos em dois grupos conforme descrito a seguir:

- Grupo T1 (solo com ovos de *T.canis* exposto ao fungo *P. lilacinum*, avaliado no 28° dia de exposição fungo-ovo).

-Grupo C1 (controle - solo adicionado de ovos de *T.canis* sem interação com fungo, avaliado no 28° dia de incubação).

Para os ensaios, dois quilogramos de solo foram coletados no Campus Capão do Leão/UFPel, sendo acondicionados em sacos plásticos, imediatamente transportados ao laboratório e autoclavados em temperaturade 121ºC por 15 minutos. Caixas tipo gerbox receberam 200 gr. do solo e a esse solo foi adicionado um volume de 2mL de solução contendo 300 ovos não embrionados de*T. canis* (obtidos conforme descrito no item 4.3), sendo imediatamente misturados ao solo. Nas caixas referentes aos tratamentos T1 foi adicionado um volume de 10 mL de suspensão contendo aproximadamente $10^8$ conídios/mL do fungo, preparados conforme descrito no item 4.2. O grupo controle (C1) recebeu a solução contendo aproximadamnte 300ovos de *T. canis*e adicionado de 5 mL de água destilada estéril. As caixas foram incubadas em estufa com fotoperíodo de 12 horas, a 25ºC e umidade relativa de 85%. Semanalmente, as caixas eram inspecionadas e borrifava-seaproximadamente 2mL de água destilada estéril para manter a umidade do solo. No 28° dia, foi removida uma alíquota de 100 gr. de solo de cada caixae realizada a recuperação de 100 ovos de *T. canis* empregando a técnica de flotação supersaturada de dicromato de sódio (d=1,35) (técnica de Caldewal), adaptada por Gallina (2011).Posteriormente, os ovos recuperados foram corados com azul de Tripan 0,4% (AT), conforme descrito por Ciarmela et al. (2005) e Martins (2014) para avaliação da viabilidade.Os experimentos foram realizados em cinco replicatas e três repetições.

**4.5. Avaliação da presença do fungo no solo:** Após a autoclavação do solo, uma alíquota de 25gr. de solo foi diluída em 250 mL de água peptonada estéril 0,1% e submetida a diluições seriadas até $10^8$ conídios/mL. Uma alíquota de 1mL de cada diluição foi plaqueada pelo método de espalhamento em superfície com alça de Drigalski em placas de Petri contendo agar PDA. A mesma metodologia foi realizada no solo do grupo T1 aos 28 dias de tratamento. Todas as placas ficaram incubadas

em estufa bacteriológica a 25ºC, durante dez dias, sendo posteriormente submetidas a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL.

**4.6. Análise Estatítica:**O deliamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições e cinco replicatas. Os dados foram submetidos aanálise de variância ($p<0,05$) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SigmaPlot 12.0.

## 5.Resultados

Na avaliação da presença do fungo *P. lilacinum* percebeu-se em microscopia que as amostras submetidas a contagem de unidades formadoras de colônias, formaram colônias fungicas, evidenciando um significativo crescimento fúngico em solo autoclavado. Os resultados sobre o efeito ovicida baseado nos parâmetros estabelecidos por Lysek et al. (1978) que determina o efeito tipo 1 (efeito lítico,não traz prejuízo morfológico a casca, na qual são visualizadas hifas aderidas na casca do ovo); efeito tipo 2 (efeito lítico, com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, porém sem penetração das hifas através da casca) e efeito tipo 3 (efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo), não foram evidenciados neste estudo, tal fato se deu devido a técnica de recuperação dos ovos *de T. canis,* intitulada Técnica de Caldewal. Este método de recuperação de ovos utiliza solução clorada em uma das suas etapas, o que ocasionou a retirada das hifas aderidas a casca do ovo, impossibilitando a visulalização dos efeitoslíticos sobre os ovos.

Todavia, para a avaliação da viabilidade dos ovos empregou-se o indicador de viabilidade Azul de Tripan (AT), onde as células viáveis com membrana intacta agem excluindo o AT, enquanto as células danificadas apresentam-se impregnadas de AT.Os resultados do presente estudo evidenciaram em microscopia ótica a ruptura das membranas do ovo embrionado de *T.canis,* ocorrendo a liberação das larvas, e a impregnação pelo azul de Tripan. Na figura 2 evidencia-se que os ovos expostos ao *P. lilacinum* e que apresentavam rupturas nas membranas (ovos inviáveis), estavam impregnados com AT (Fig. 2 A e B), enquanto que os ovos do grupo controle que apresentavam a membrana intacta (ovos viáveis) não foram corados com o AT (Fig. 2 C e D).

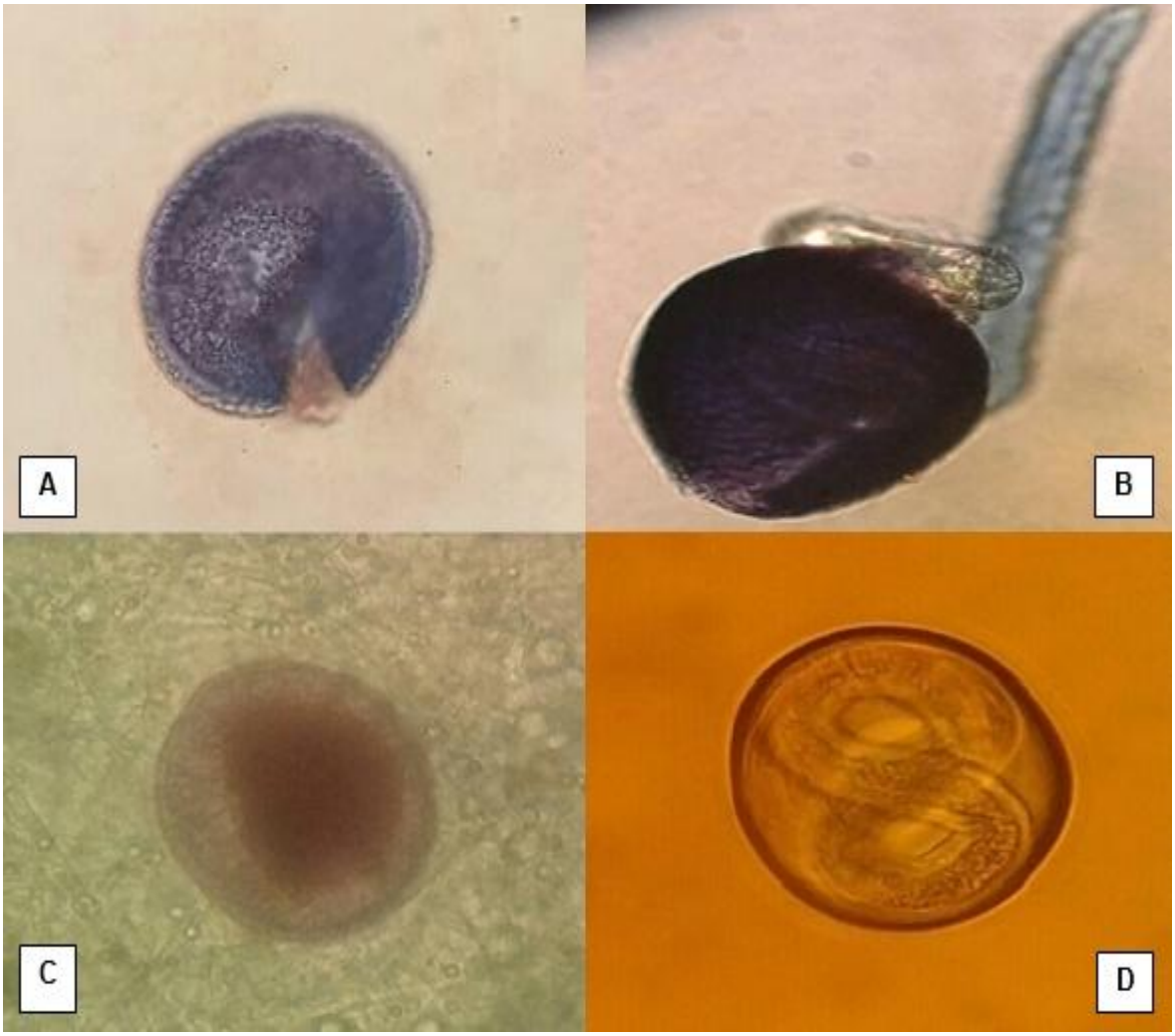


Figura 2 – Ovos de *Toxocara canis* submetidos à avaliação de viabilidade com azul de Tripan (AT). (A) Ovo não embrionado impregnado com AT e ruptura da casca do ovo (grupo tratado), (B) Ovo embrionado rompido com larva impregnada pelo AT (larva inviável) (grupo tratado. (C) Ovo não embrionado não impregnado com AT (grupo controle). (D)Ovo embrionado não impregnado pelo AT (grupo controle). Objetiva 100 X.

Os resultados do efeito ovicida de *P. lilacinum* aplicado a solo previamente contaminado com ovos de *T. canis* estão demonstrados na Tabela 1. Evidenciou-se efeito ovicida significativo na interação entre o fungo e os ovos de *T. canis* ($p<0,001$). Ao avaliar-se a viabilidade dos ovos, no grupo controle observou-se predominância de ovos embrionados e viáveis (não impregnados pelo AT)($P<0,05$), enquanto no grupo tratado, evidenciou-se grande quantidade de ovos não embrionados e inviáveis (impregnados pelo AT) ($P<0,05$) (Tabela 2; Figura 3).Ovos embrionados viáveis e inviáveis, bem como ovos não embrionados viáveis e

inviáveis diferiram entre os grupos tratado e controle (P<0,05). Adicionalmente, no grupo tratado observou-se que tanto os ovos de *T. canis* embrionados como os não embrionados apresentavam-se inviáveis pelo efeito lítico de *P. lilacinum*(P>0,05)(Tabela 2; Figura 3).

Tabela 1: Atividade ovicida de *Purpureocillium lilacinum* em solo contaminado com ovos de *Toxocara canis.*

| Fontes de variação | GL | SQ | QM | F | P |
|---|---|---|---|---|---|
| Grupo controle – C1 | 3 | 470,253 | 156,751 | 4,939 | 0,013* |
| Tratamento | 1 | 1,82E-09 | 1,82E-09 | 5,73E-11 | 1,000 |
| Grupo tratado – T1 | 3 | 9801,853 | 3267,284 | 102,944 | <0,001** |
| Resíduo | 16 | 507,813 | 31,738 | | |
| Total | 23 | 10779,920 | 468,692 | | |

GL= Grau de liberdade;SQ= soma dos quadrados;QM=Quadrado Médio;F= Teste de Fisher;P= Nível de probabilidade;Resíduo=erro experimental.
*signifcativo ao nivel de 5% de probabilidade.**significativo ao nivel de 1% de probabilidade.

Tabela 2: Média de ovos de *Toxocara canis* embrionados viáveis e inviáveis, não embrionados viáveis e inviáveis expostos ao fungo *Purpureocillium lilacinum.*

| Grupos | Ovos de *Toxocaracanis* | | | | Média |
|---|---|---|---|---|---|
| | Embrionados viáveis | Embrionados inviáveis | Não embrionados viáveis | Não embrionados inviáveis | |
| Grupo controle – C1 | 58,33 Aa | 3,67 Bc | 32,0Ab | 6,0 Bc | 25,0 |
| Grupo tratado – T1 | 3,54 Bb | 37,73 Aa | 9,53 Bb | 49,2 Aa | 25,0 |
| Média | 30,93 | 20,7 | 20,76 | 27,6 | ---- |
| CV (%) | 22,53 | | | | |

Médias seguidas por letras maiúsculasiguais na coluna e minúsculasna linha não diferem entre si peloteste de Tukey (P<0,05).

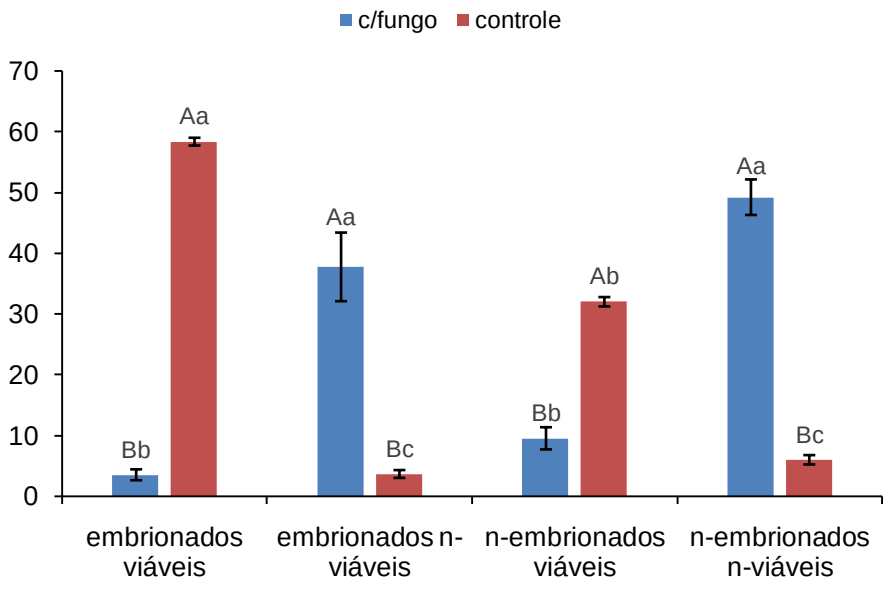


Figura 3: Ovos de *Toxocara canis* embrionados viáveis e inviáveis, não embrionados viáveis e inviáveis expostos ao fungo *Purpureocillium lilacinum*.

## 6. Discussão

Segundo Faedo et al. (2002), para que um fungo seja efetivo como controlador biológico, esse deverá estar presente e ativo nas fezes, no solo e no ambiente. No presente estudo ao avaliar o crescimento de*P. lilacinum* no solo previamente autoclavado, observou-se que houve crescimento fúngico, reforçando os estudos de Barron (1977) sobre a aptidão dos fungos em suportar condições ambientais diversas. Adicionalmente, Medrano et al. (2015) destacam que *P. lilacinum* é um fungo que quando aplicado no solo e em condições ambientes favoráveis se estabelece, cresce e dissemina-se rapidamente.

As pesquisas realizadas por Araújo et al. (1995)com *P. lilacinum*, juntamente com outros fungos nematófagos, apontam um significativo efeito ovicida sobre os ovos de *Toxocara*spp.Similarmente, estudos realizados por Basualdo et al. (2000); Ciarmela et al. (2002); Gortari et al.(2007) e Carvalho et.(2010), reforçam os estudos anteriores apontando os fungos ovicidas como um importante agente no controle biologico de parasitos gastrointestinais.

Araújo et al. (1995), constataram que a exposição do ovo aos fungos no 14° dia não causou a destruição dos ovos de *T.canis.* Desta forma, os pesquisadores destacaram a necessidade de aumentar o tempo de exposição dos ovos ao fungo para que o efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, bem como a penetração de hifas e colonização interna do ovo, que caracterizam o efeito ovicida tipo 3 pudesse ocorrer.No presente trabalho evidenciou-se que o fungo *P. lilacinum* apresentou significativa atividade ovicida sobre ovos de *T. canis* ao 28° dia de exposição fungo-ovo, reforçando os estudos de Martins (2014), que aponta que períodos mais longos de interação fungo-ovo correspondem a resultados de parasitismo mais eficazes. Todavia, Maia Filho et al. (2013) ao avaliarem o efeito ovicida de diferentes fungos de solo sobre ovos de *T. canis,* evidenciaram que os efeitos líticos ocorreram a partir do 14º dia da exposição.

Um importante resultado observado na microscopia ótica foi a ruptura da membrana da casca do ovo embrionado de *T.canis,* ocorrendo a liberação das larvas, concordando com os estudos de Martins (2014). Embora a ruptura da membrana do ovo libere a larva, esta não é apta a sobreviver no ambiente devido a composição de sua cutícula (BRUNASKÁ et al.,1995 apud MARTINS et al., 2014). A ruptura do ovo pode ser explicada pelos estudos de Mota et al. (2003) e Araújo et al.

(2004) que relatam que os fungos ovicidas penetram na membrana dos ovos de nematóides através de uma estrutura especializada, que é formada a partir do contato com a cutícula do ovo, após há a penetração das hifas que aumentam de tamanho rompendo as diferentes camadas do ovo.Por outro lado, estudos prévios têm demonstrado que o mecanismo de infecção pelos fungos ovicidas além de mecânico, pode também ser enzimático ou ambos (BONANTS et al., 1995). Neste sentido, a identificação de numerosas enzimas extracelulares em fungos nematófagos, incluindo *P. lilacinum*, tem confirmado o envolvimento enzimático como um importante fator de virulência associado ao processo de infecção de ovos de parasitos (HUANG et al., 2004).

No presente estudo, a exposição dos ovos de *T. canis* ao fungo *P. lilacinum* aplicado ao solo autoclavado causou significativo efeito lítico, tanto de ovos embrionados como não embrionados ($P<0,05$). Resultados similares foram relatados por Martins (2014) ao avaliar a viabilidade *in vitro* de ovos de *T. canis* expostos a *P. lilacinum.* Todavia, diferentemente do presente estudo, Martins (2014) desenvolveu sua pesquisa cultivando o fungo em agar água 2%. Adicionalmente, observou-se que o efeito lítico do fungo foi superior, embora não significativo, sobre os ovos não embrionados. Segundo Kerry (2001) apud Martins (2014), os ovos na sua fase inicial de desenvolvimento embrionário estão mais sucetíveis a ação enzimática dos fungos.

Com esta pesquisa comprova-se que é possível manter a ação lítica de *P. lilacinum* sobre ovos de *T. canis* quando aplicado a solo. Todavia, outros estudos precisam ser desenvolvidos para avaliar a ação do fungo em solos em condições naturais.

## 7 Conclusão

Concluiu-se com esse trabalho uma importante redução na viabilidade dos ovos de *T.canis* quando expostos ao fungo *Purpureocilium lilacinum* aplicado ao solo.

**Referências**


ABE JACOB, C.M.; OSELKA, G.W. Toxocaríase na infância. **Pediatra**. v.13, p.48-55,1991.

ARAÚJO, J.V.; SANTOS, M.A.; FERRAZ, S. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária eZootecnia**, v.47, n.1, p.37-42, 1995.

ARAÚJO, J.V.; MOTA, M.A.; CAMPOS, A.K. Controle de helmintos de animais por fungos nematófagos. **Revista brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.0, p.165-169, 2004.

BARRIGA, O.O. Rational control of canine toxocariasis by the veterinary practioner. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 98, p. 216-221, 1991.

BARRON, G.L. The nematode-destroying fungi. Canadá: **Canadian BiologicalPublications,** p.140, 1977.

BASUALDO, J.A.; CIARMELA, M.L.; SARMIENTO, P.L.; MINVIELLE, M.C. Biological activity of *Paecilomyceslilacinus*genus against *Toxocaracanis* eggs.**Parasitology Research**, v. 86, p. 854-859, 2000.

BEAVER, P.C.; SNYDER, C.H.; CARRERA, G.M.; DENT, J.H. & LAFFERTY, J.W. - Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans.Reportofthreecases.**Pediatrics**, v.9, p.7-19, 1952.

BONANTS, P. J. M., FITTERS, P. F. L., THIJS, H., DEN BELDER, E., WAALWIJK, C., HENFLING, J. W. D. M.,.A basic serine protease from *Paecilomyceslilacinus* with biological activity against *Meloidogynehapla* eggs.**Microbiol.**141, 775–784,1995.

BOURDEAU P. *Toxocaracanis*: infestation du chienetdel'homme, méthodesdelutte. **Point Vet**; v.18, n.551-564, 1986.

CARVALHO, R.O; ARAÚJO, J.V.;BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; ALVES, C.D.Ovicidal activity of *Pochoniachlamydosporia* and *Paecilomyceslilacinus* on *Toxocaracanis* eggs.**Veterinary Parasitology**,v. 169, p.123-127, 2010.

CIARMELA, M.L.; LORI, M.G.; BASULADO, J.A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocaracanis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.103, p.251-257, 2002.

CIARMELA, M.L., THEVENET, P.S., ALVAREZ, H.M., MINVIELLE, M.C.,BASUALDO, A.M.,. Effect of *Paecilomyceslilacinus*on the viability of oncospheres of *Taeniahydatigena.***VeterinaryParasitology**.131, 61–64,2005.

CHIEFFI, P. P. & MÜLLER, E. E. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocarasp*. no solo de localidadespúblicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Rev. Saúde públ.,** S. Paulo, 10:367-72, 1976.

DE BACH, P. O escopo do controle biológico. *No* controle biológico de pragas e ervas daninhas de insetos (P. DeBach, editor). **Chapman and Hall Ltd., Londres.** p. 3-20, 1964**.**

DOMSCH, K. H.; GAMS, W.; ANDERSON, T, H. Compendium of soil fungi. CRC Pres, London, p.630, 1980.

COOKE, R.C.; GODFREY, B.E.S.A key of nematode-destroying fungi.**Transactions of the British Mycological Society**, v.47, n.1, p.61-74, 1983.

FAEDO, M.; LARSEN, M.; DIMANDER, S.O.; YEATES, G.W.; HÖGLUND, J.; WALLER, P.J. Growth of the Fungus *Duddingtonia flagrans*in soil surroundingfeces deposited by cattle or sheep fed the fungus to control nematode parasites. **Biological Control**, v.23, n.1, p.64-70, 2002.

FIGUEIREDO, S.D.P.; TADDEI, A.A.C.; MENEZES, J.J.C.- Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro),** v.81, p.126-132, 2005.

GALLINA, T., SILVA, M.A.M.P., CASTRO, L.L.D., WENDT, E.W., VILLELA, M.M., BERNE, M.E.A. Presence of eggsof*Toxocara* spp. andhookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. **RevistaBrasileira de ParasitologiaVeterinaria**, Jaboticabal. V.20, p.176-177, 2011.

GORTARI, C.; CAZAU, C.; HOURS, R. Hongosnematófagos de huevos de *Toxocara canis* enunpaseo público de La Plata, Argentina. ***Revista Iberoamericana de Micología,*** v.24, p.24-28, 2007.

GRØONVOLD, J.; HENRIKSEN, S.A.; LARSEN, M.; NANSEN, P.; WOLSTRUP, J. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. **VeterinaryParasitology,** v. 64, n.1-2, p.47-64. 1996.

HOFSTATTER, B. D. M. ; FONSECA, A. da S.; MAIA-FILHO, F. de S.; VALENTE, J. de S. S.; PERSICI, B. M.; POTTER, L.; SILVEIRA, A.; PEREIRA, D. I. B. Effect of Paecilomyceslilacinus, Trichodermaharzianum and Trichodermavirens fungal extracts on the hatchability of Ancylostoma spp. Eggs. **RevistaIberoamericana de Micologia**, 2016.

HUANG, X., ZHAO, N., ZHANG, K.,.Extracellular enzymes serving as factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. **Res. Microbiol**. 155, 811–816, 2004.

KIMURA, L.M.S. **Principais zoonoses**. Disponível em: < http://books.scielo.org/id/sfwtj/pdf/andrade-9788575413869-26.pdf >, 2016.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo: Sarvier, 1998.

LARSEN, M. Biological control of helminths.**International Journal for Parasitology**,v.29, n.1, p.139-146, 1999.

LESCANO, S.A.Z. Estudo epidemiológico da toxocaríase na área urbana de Lima, Peru. 1991. 90 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**, 1991.

LYSEK, H.; CHALUPOVÁ, V. Quantitative determination of activity of ovicidalfung.**ActaUnivesityPalackianaeOlomucensis (in the Press)**, 1978.

LÝSEK, H.; FASSATIOVÁ, O.; PINEDA, NC.; HERNÁNDEZ, NL. Ovicidal fungi in soils of Cuba. **Folia Parasitologica,** v. 29, p.265-270, 1982.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

MAIA FILHO, F. S. M. **Atividade ovicida de fungos isolados do solo no sul do Brasil sobre ovos de *Toxocara canis*.** 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

MAIA FILHO, F.S., VIEIRA, J.N., BERNE, M.E.A., STOLL, F.E., NASCENTE, P.S., PÖTTER, L., PEREIRA,D.I.B.(2013). FungalOvicidalActivityon*Toxocaracanis*eggs**.** ***Revista Iberoamericana de Micologia***,30,I.4.p. 226-230,2013

MAIA FILHO, F. S., **Ação dos fungos nematófagos*Purpureocilliumlilacinum* e *Trichodermavirens* sobre ovos de *Toxocara canis* e avaliação da infectividade em modelo experimental**, 2016, 82f. Tese (Doutorado em Parasitologia) Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

MAIA FILHO, F. S.; FONSECA, A. O. S.; PERSICI, B. M.; SILVEIRA, J. S.; BRAGA, C. Q.; POTTER, L.; BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B. *Trichodermavirens* as a biocontrolof*Toxocara canis*: In vivo evaluation. **Revista Iberoamericana de Micología**,2017.

MARTINS, N.O **Avaliação do efeito de *Paecilomyceslilacinus*sobre ovos de *Toxocaracanis*utilizando indicadores viabilidade.**Universidade Federal do Rio Grande, junho de 2014.

MEDRANO-LÓPES, R.; MADERA, A. P.; FOZ, C. F. Infecciones oculares por Purpureocilliumlilacinum: presentación de um caso y revisión de la literatura. **Revista Iberoamericana de Micología,** v. 32, n. 2, p. 111 -114, 2015.

MOURA, M.Q; JESKE, S.;VIEIRA, J.N;CORRÊA, T.G;BERNE, M.E.A;VILLELA, M.M.Frequência de geohelmintos em praças públicas de Pelotas, RS, Brasil.**Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal**, v. 22, n. 1, p. 175-178, jan.-mar. 2013

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

PAWLOWSKI, Z. Toxocariasis in humans: clinic lexpressionandtreatment dilemma. **Journal of Helminthology**, v.75, p.299-305, 2001.

PEDROSO, D.; COMPARSI, B.; WEBER, D.M.; WALCHER, D.L.; NOVICKI, A.; BERNE, M.E.A. Avaliação soro epidemiológica da infecção por *Toxocara spp* em crianças indígenas. **Arquivos de Ciência e Saúde**, v. 22, p.51 – 56, 2015.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, 2ª Edição, Rio de Janeiro .p. 186-193, 1992.

ROBERTSON, I.D.; IRWIN, P.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C.A.The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses.**InternationalJournalforParasitology**, v.30, n.12-13, p.1369-1377, 2000.

SANTARÉM, V. A.; SARTORE, I. F.; BERGAMO, F. M. M. Contaminação, por ovos de Toxocaraspp, de parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 31, p. 529 – 532, 1998.

SOULSBY, E.J.L. Helminths, **arthropodsandprotozoaofdomesticatedanimals.7ª Ed.** BaillièreTindall, London, 806p, 1982.

SCHOENARDIE, E.; SCAINI, C.J.; BROD, C.S.; PEPE, M.S.; VILLELA, M.M.; MCBRIDE, A.J.A.; BORSUK, S.; BERNE, M.E.A. Prevalence of *Toxocara*Infection in Children from Southern Brazil. **Journal of Parasitology**, v.99, p.537–539, 2013.

TAYLOR, M.R.; KEANE, C.T.; O'CONOR, P.; GIRDWOOD, R.W.; SMITH, H. Clinical features of covert toxocariasis. **ScandinavianJournalofInfectiousDiseases**, v.19, p.693-696, 1987.

VAN DEN BOSCH, R., PS Messenger e AP Gutierrez**.** Uma introdução ao biológico ao controle. **Plenum Press, Nova York e Londres**. 247 pp, 1982.