

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

ATIVIDADE OVICIDA DE FUNGOS ISOLADOS DO SOLO NO SUL DO BRASIL
SOBRE OVOS DE *Toxocara Canis*

Fernando de Souza Maia Filho

Pelotas, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia



Dissertação

ATIVIDADE OVICIDA DE FUNGOS ISOLADOS DO SOLO NO SUL DO
BRASIL SOBRE OVOS DE *Toxocara canis*

Fernando de Souza Maia Filho

Pelotas, 2012

FERNANDO DE SOUZA MAIA FILHO

**ATIVIDADE OVICIDA DE FUNGOS ISOLADOS DO SOLO NO SUL DO
BRASIL SOBRE OVOS DE *Toxocara Canis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área de concentração em Parasitologia).

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Daniela Isabel Brayer Pereira

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Elisabeth Aires Berne

Pelotas, 2012

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira - UFPel
Orientadora

Prof. Dr. Marcos Marreiro Villela - UFPel

Prof. Dr. Jerônimo Lopes Ruas - UFPel

Prof^a. Dr^a. Renata Osório de Faria - UFPel

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho, apoio, compreensão e estímulo.

À Aline, minha noiva, pelo incentivo, apoio e compreensão durante todo o tempo, principalmente nos mais difíceis sempre dando força para superar as dificuldades, deixando os dias sempre mais agradáveis.

À minha orientadora Daniela, pela orientação, dedicação incansável e por acreditar na minha pessoa, contribuindo para o meu crescimento profissional.

À minha co-orientadora, Beth, pelo apoio e dedicação sempre que precisei.

Ao amigo e professor Marcos por todos os conselhos e orientação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia pela oportunidade.

Aos professores que tive o prazer de conhecer e aprender.

Às colegas de laboratório Juliana, Bianca, Ane, Bruna, Francieli e Júlia, pela ajuda, amizade e momentos de descontração.

À todos meus amigos e familiares que sempre torceram e apoiaram para que esse projeto se realizasse.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À CAPES pela minha bolsa de estudos.

*... "there's nothing you can make that can't be made
no one you can save that can't be saved
nothing you can do, but you can learn how to be you in time
it's easy"...*

Lennon/McCartney

Resumo

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

As altas prevalências de *Toxocara canis* em cães associada à frequente contaminação ambiental e a resistência dos ovos no solo, incrementam a exposição do homem à este parasito. Além disso, as dificuldades de implantação de medidas de controle e desinfecção, aliadas aos problemas inerentes ao controle químico justificam a necessidade de medidas alternativas que auxiliem no controle das parasitoses transmitidas pelo solo. Dentre essas medidas, destaca-se a utilização de fungos nematófagos. O presente estudo objetivou avaliar a atividade ovicida *in vitro* de fungos isolados a partir de solos coletados em áreas públicas do município de Pelotas, RS, Brasil. Amostras de solo de dez locais foram semeadas em agar água 2% com antibióticos e incubadas a 25°C por 21 dias. A atividade ovicida dos isolados fúngicos obtidos foi testada *in vitro*, em cinco repetições para cada isolado analisado. Um mL de uma suspensão de ovos embrionados de *Toxocara canis* (10⁶ ovos) foi vertido sobre as culturas fúngicas crescidas em agar água por 10 dias. Em intervalos de 7, 14 e 21 dias, 100 ovos eram retirados de cada placa e avaliados em microscopia óptica. A partir do solo foram isolados *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* spp., *Mucor* spp. e *Trichoderma* spp. Nesta ordem, efeito ovicida tipo 3 significativo foi observado em *Trichoderma* spp., *Fusarium* complexo *solani* e *Acremonium* spp.. *Trichoderma* spp. apresentou efeito ovicida ao 14º dia de interação fungo-ovo. Os demais gêneros fúngicos testados apresentaram efeito tipo 2. Os resultados obtidos demonstram a presença de fungos nematófagos parasitos de ovos em solos da região sul do Brasil e evidenciam a atividade ovicida do gênero *Trichoderma* spp. e *Fusarium* complexo *solani* sobre ovos de *T. canis*.

Palavras-chave: Toxocaríase, Nematoda, Zoonose, Controle Biológico, *Trichoderma* spp.

Abstract

FILHO, Fernando de Souza Maia. **Ovicide activity of isolated fungi in soil on *Toxocara canis* eggs**. 2012. 57f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The high prevalence of *Toxocara canis* in dogs, associated with environmental contamination and the resistance of eggs in the soil increase the exposure of humans front of the parasite. Moreover, the difficulties of implementation of control measures and disinfection, allied to the problems inherent to chemical control, justifying the need for alternative measures that assist in controlling parasitosis transmitted by the soil. Among these measures, we highlight the use nematophagous fungi. This study had the objective of evaluating the activity of *in vitro* ovicide of isolated fungi based on soil collected in public places in the city of Pelota RS, Brazil. Samples of soil from ten localities were sowed in agar water 2% with antibiotics and incubated at 25°C for 21 days. The ovicide activity of the fungus isolates obtained was tested *in vitro* in five repetitions for each analyzed insulator. A 1 mL of an embryonated egg suspension of *Toxocara canis* (10^3 eggs) was poured over the fungal cultures grown in agar water for 10 days. At intervals of 7, 14 and 21 days, 100 eggs were removed from each plaque and evaluated in optical microscopy. *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* spp., *Mucor* spp. and *Trichoderma* spp. were isolated from the soil. In this order significant ovicidal type 3 effect was observed in *Trichoderma* spp., *Fusarium* complex *solani* and *Acremonium* spp.. *Trichoderma* spp. presented an ovicidal effect on the 14th day of fungus-egg interaction. The other fungal genera tested presented a type 2 effect. The results obtained showed the presence of nematophagous fungi parasites of eggs in soil in the Southern region of Brazil and demonstrated the ovicidal activity of *Trichoderma* spp. and *Fusarium* complex *solani* on *T. canis* eggs.

Key Words: Toxocariasis, Nematoda, Zoonosis, Biological Control, *Trichoderma* spp.

Lista de Figura - Artigo

Figure 1 - Effect type 3 of the isolated *Trichoderma* spp. on *Toxocara canis* eggs on the 14th day of interaction. One can see the adherence of conidia and penetration of hyphae in the cuticle with the destruction of the egg. Optical microscopy (object lense 40X).....49

Lista de Tabelas

Table 1 – Percentages and standard deviation of ovicide activity of the fungi *Acremonium* spp., *Fusarium complex solani*, *Trichoderma* spp. and control group, on *Toxocara canis* eggs at 7, 14 and 21 days of fungus-egg interaction.....48

TABELA 2 - Percentual de atividade ovicida e desvios padrão dos fungos isolados do solo sobre ovos de *Toxocara canis* nos intervalos de 7, 14 e 21 dias.....71

Sumário

1. Introdução.....	12
2. Revisão de literatura.....	14
2.1. <i>Toxocara canis</i>	14
2.1.2. Ciclo biológico.....	15
2.1.3. Toxocaríase.....	16
2.1.4. Contaminação do solo.....	17
2.2. Controle biológico.....	18
2.3. Fungos nematófagos.....	20
3. Referências.....	25
4. Artigo - Ovicide activity of isolated fungi in soils in the southern of Brazil on <i>Toxocara canis</i> eggs.....	38
Abstract.....	40
4.1. Introduction.....	41
4.2. Materials and methods.....	43
4.2.1. Collection of soil samples	43
4.2.2. Isolation of fungi from the soil	43
4.2.3. Collection of <i>Toxocara canis</i>	43
4.2.4. <i>In vitro</i> activity of fungal isolates.....	44
4.2.5. Statistical analysis.....	45
4.3. Results.....	45
Table 1 - Percentages and standard deviation of ovicide activity of the fungi <i>Acremonium</i> spp., <i>Fusarium complex solani</i> , <i>Trichoderma</i> spp. and control group, on <i>Toxocara canis</i> eggs at 7, 14 and 21 days of fungus-egg interaction.....	46
Figure 1 - Effect type 3 of the insulator <i>Trichoderma</i> spp. on <i>Toxocara canis</i> eggs on the 14 th day of interaction. One can see the adherence of conidia and penetration of hyphae in the cuticle with the destruction of the egg. Optical microscopy (object lense 40X).....	47
4.4. Discussion.....	48
4.5. Conclusion.....	50
Acknowledgement.....	50
5. References.....	51
6. Conclusões gerais.....	57

1. Introdução

A toxocaríase visceral, também denominada síndrome larva *migrans* visceral (LMV), é uma zoonose parasitária resultante da migração e persistência de larvas de helmintos em hospedeiros não habituais (BEAVER, 1969). Várias espécies de helmintos podem causar a LMV, porém *Toxocara canis* é o nematóide mais frequentemente associado à doença (DESPOMMIER, 2003). A alta prevalência deste parasito em cães e gatos, associada à frequente contaminação ambiental e a resistência dos ovos no solo, incrementam a exposição humana à toxocaríase, tornando esta enfermidade um problema de saúde pública de distribuição mundial (GORTARI et al., 2007). No homem, a doença apresenta uma ampla variação de apresentações clínicas, podendo manifestar-se sob três formas: larva *migrans* visceral, larva *migrans* ocular e a forma oculta ou subclínica (SANTARÉM et al., 2011). Dados de prevalência da toxocaríase infantil em alguns países demonstram índices variáveis (DEUTZ et al., 2005; ROMANO et al., 2010; ESPINOZA et al., 2010, STENSVOLD et al., 2011). No Brasil, estudos têm relatado prevalências que variam desde 8,7% à 54,8% (FIGUEIREDO et al., 2005, TEIXEIRA et al., 2006, CARVALHO; ROCHA, 2011, SANTARÉM et al., 2011).

Segundo Barriga, (1988) o controle da população canina, a educação da população sobre o potencial zoonótico de *T. canis* e a limitação do acesso de animais às áreas de lazer constituem medidas essenciais para a prevenção da toxocaríase. Entretanto, a dificuldade de implantação dessas medidas, aliada a alta resistência dos ovos no ambiente, as dificuldades de desinfecção e os problemas inerentes ao controle químico, justificam a necessidade de medidas alternativas que auxiliem na descontaminação do solo, já que o mesmo constitui-se em uma das principais fontes de infecção aos hospedeiros suscetíveis.

Pesquisadores de várias partes do mundo buscam medidas alternativas para o controle de endoparasitoses de animais domésticos, visando à diminuição do emprego de quimioterápicos e, conseqüentemente, a redução dos níveis de poluentes no ambiente e nos produtos de origem animal (MOTA et al., 2003). Dentre as diversas metodologias que têm sido testadas com a intenção de melhorar esse controle, sugere-se o controle biológico, como uma alternativa viável e promissora

que reduz as infecções causadas por helmintos parasitos gastrintestinais, e cuja ação se dá por meio de organismos vivos que atuam como antagonistas naturais no ambiente (ARAÚJO et al., 2004b). Desta forma, é crescente o uso de fungos nematófagos, presentes no ecossistema e cuja ação é direcionada ao parasitismo dos ovos e larvas de vida livre dos geohelmintos (BRAGA et al., 2007). Entretanto, a busca por fungos adaptados as condições regionais são necessárias, já que para a escolha de um possível agente de controle deve-se levar em consideração a capacidade de adaptação do fungo ao local que será utilizado, mais do que a facilidade de isolamento e/ou manutenção em condições de laboratório (GRAY, 1988; GRØNVOLD, 1996; GORTARI et al., 2007).

Considerando a importância do *T. canis* na saúde pública e os problemas inerentes ao controle e prevenção da toxocaríase, torna-se nítida a necessidade de estudos que visem minimizar a taxa de infecção deste parasito no ambiente. Desta forma, elaborou-se este estudo, cujos objetivos foram:

- isolar e identificar os fungos a partir de solos coletados em áreas públicas no município de Pelotas, RS;
- pesquisar a presença de fungos com atividade sobre ovos de *T. canis*;
- avaliar a atividade *in vitro* dos fungos isolados.

2. Revisão de Literatura

2.1 *Toxocara canis*

Toxocara canis (Werner, 1782) é um parasito pertencente ao filo Nematoda, classe Secernentea, família Anisakidae, gênero *Toxocara* e espécie *T. canis* (Neves et al., 2005).

A fêmea adulta do *T. canis* mede entre 6-18 cm e o macho entre 4-10 cm. Dimorfismo sexual é nítido, sendo que os machos têm a extremidade posterior recurvada no sentido ventral. Na extremidade anterior, observam-se asas cefálicas estreitas. Parasitos adultos vivem, em média, quatro meses e, em cerca de seis meses, quase todos são eliminados espontaneamente pelo hospedeiro (ABE & OSELKA, 1991). A fêmea produz até 200.000 ovos por dia. Como a carga parasitária no animal infectado pode alcançar até várias centenas de parasitos, os hospedeiros podem contaminar o ambiente com milhões de ovos por dia (GLICKMAN & SCHANTZ, 1981).

Os ovos são muito resistentes a fatores adversos, podendo permanecer viáveis por tempo prolongado no solo. Esses ovos 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 nas fezes não são embrionados e, portanto, não são infectantes (ABE & OSELKA, 1991). Para que haja o embrionamento são necessárias condições adequadas de temperatura (15°C a 35°C) e umidade (acima de 85%), sendo que, nessas condições, 85% dos ovos tornam-se infectantes no período de duas a cinco semanas. Há relato demonstrando que existem duas mudas dentro do ovo e, assim, a larva infectante é aquela de terceiro estágio (ARAÚJO, 1972).

2.1.2 Ciclo biológico

T. canis é um nematódeo, cujo principal hospedeiro definitivo é o cão. Esse parasito pode apresentar duas formas de migração: a hepato-traqueal e a somática. Na primeira, o cão ingere ovos embrionados presentes no solo contendo larvas infectantes (SOULSBY, 1982). O cão ao ingerir o ovo embrionado, libera as larvas no estômago e intestino delgado. Estas larvas, medindo $20\mu \times 400\mu$, penetram na mucosa intestinal, invadem a corrente linfática ou sanguínea e alcançam o fígado em 24 horas. Posteriormente, atingem o coração e os pulmões, através do sistema vascular. O acometimento pulmonar acontece após três a cinco dias da infecção. Dos pulmões, algumas larvas passam dos brônquios para a traquéia e faringe, sendo então deglutidas. Após duas mudas, essas larvas tornam-se adultos na luz intestinal, iniciando, então, a postura de ovos. Estes ovos aparecem nas fezes quatro a cinco semanas após a infecção (ABE & OSELKA, 1991; GLICKMAN & SCHANTZ, 1981).

Na migração somática há o transporte das larvas pelo sistema porta, mas quando as mesmas chegam aos pulmões retornam ao coração e migram para os tecidos e órgãos do hospedeiro permanecendo encistadas (SOULSBY, 1982). Em fêmeas gestantes, no terço final de gestação, as larvas são liberadas dos tecidos, provavelmente por influências hormonais, migrando para a placenta e/ou glândulas mamárias, ocasionando assim, a infecção neonatal de filhotes pelas vias transplacentária e transmamária (BARRIGA, 1991).

Os cães também podem ingerir as larvas infectantes em hipobiose dos tecidos de hospedeiros paratênicos. Nestes animais, após ingestão dos ovos embrionados, ocorre migração somática e as larvas permanecem em hipobiose sem concluir o ciclo (MAGNAVAL et al., 2001). Quando os cães ingerem as larvas presentes nos tecidos desses hospedeiros, o ciclo do parasito se completa (NIEC, 1980).

2.1.3 Toxocaríase

A toxocaríase tem sido apontada como importante zoonose, em países desenvolvidos e em desenvolvimento (SCHANTZ, 1989). Magnaval et al. (2001) consideram-na como a mais prevalente helmintíase em países industrializados.

Em alguns países, como Áustria, Malásia, Peru e Dinamarca, os índices da toxocaríase variam de 2,4% a 44% (DEUTZ et al., 2005; ROMANO et al., 2010; ESPINOZA et al., 2010; STENSVOLD et al., 2011). Já no Brasil, estudos relatam prevalências que variam desde 8,7% (TEIXEIRA et al., 2006) a 54,8% (FIGUEIREDO et al., 2005; CARVALHO & ROCHA, 2011; SANTARÉM et al., 2011).

T. canis é considerado um dos agentes de maior impacto causando parasitoses em nível mundiais, cuja prevalência pode chegar até 81% da população de cães (SOULSBY, 1982). Os cães jovens são os principais responsáveis pela contaminação do ambiente, podendo albergar várias fêmeas com capacidade de produzir, em média, mais de 200.000 ovos/dia cada uma (SCHANTZ & GLICKMAN, 1983; REY, 1992). Desta forma, o cão atua como principal fonte de infecção, sendo responsável pela manutenção da contaminação ambiental (MAGNAVAL et al., 2001) de praças (GUIMARÃES et al., 2005), areias de praias (SCAINI et al., 2003), locais de recreação infantil (OLIVEIRA et al., 2007) e pastagens (HUGHES, 1991).

Entre as vias de transmissão da toxocaríase humana, a principal é a ingestão de solo contaminado com ovos contendo a larva L3 (SCHANTZ, 1989), especialmente a população infantil, por ter menor cuidado no contato com os cães, associado aos hábitos de geofagia e onicofagia (FAN et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2005; CHIODO et al., 2006). O homem, além de se infectar com ovos larvados (SCHANTZ ; GLICKMAN, 1978), também pode adquirir a infecção ao ingerir carne crua ou mal cozida de hospedeiros paratênicos (SALEM; SCHANTZ, 1992, FAN et al., 2004; MORIMATSU et al., 2006). Após serem infectados por larvas de *T. canis*, seres humanos e outros animais comportam-se como hospedeiros paratênicos, não permitindo o desenvolvimento completo do helminto. As larvas, contudo, podem sobreviver por longos períodos no organismo humano, realizando migrações por órgãos e tecidos, onde permanecem encistadas e viáveis, podendo determinar manifestações clínicas diversas, que caracterizam a síndrome da larva *migrans* visceral, larva *migrans* ocular e toxocaríase oculta (TAYLOR et al., 1987).

As manifestações da toxocaríase humana são variáveis em gravidade e dependem do número de larvas ingeridas, frequência da infecção, intensidade da resposta imunológica do hospedeiro, duração da infecção, presença de larvas em locais críticos e de, possivelmente, outros fatores ainda não estudados (SCHANTZ, 1989).

Na forma ocular, existem casos de endoftalmite (PARK et al., 2000), estrabismo e uveíte (AZAR et al., 2004). Estima-se que, por ano, mais de 700 pessoas infectadas por *Toxocara spp.* têm perda parcial de visão (CDC, 2008).

Na larva migrans visceral as larvas no intestino do homem eclodem e migram pela via linfática ou circulação porta para diversos órgãos, principalmente fígado e pulmões; e, ocasionalmente, coração e sistema nervoso central, originando a síndrome da larva *migrans* visceral (BEAVER et al., 1952), ou afetando o globo ocular e gerando a síndrome larva *migrans* ocular (ZINKHAM, 1978).

Na forma visceral, podem ocorrer distúrbios respiratórios como tosse persistente e asma (TONELLI, 2005), efusão pleural (ASHWATH et al., 2004) e dermatopatias, como prurido, urticária, eczema (GAVIGNET et al., 2008) e abscessos piogênicos (RAYES et al., 2001). Há registros de alterações neurológicas, incluindo convulsões (MOREIRA-SILVA et al., 2004), meningoencefalite (VIDAL et al., 2003) e epilepsia (BÄCHLI et al., 2004). Também foi relatado hepatomegalia (ALTCHEH et al., 2003), pancreatite (D'ONOFRIO et al., 2006), miocardite (ABE et al., 2002) e ascite (CHIRA et al., 2005).

2.1.4 Contaminação do solo

Os ovos de *T. canis* desenvolvem-se melhor em solos de tipo argiloso, principalmente quando não há exposição permanente ou direta à luz solar, que exerce efeito deletério sobre as larvas (LESCANO, 1991).

Estudos realizados em várias partes do mundo indicam a contaminação em diferentes tipos de solo e em diferentes níveis, o que serve para ratificar o caráter cosmopolita desta zoonose. Levantamentos da contaminação de solos de áreas de recreação infantil, praças e locais públicos, areia de praias, e praças de conjuntos habitacionais por *T. canis* e/ou *Toxocara spp* em diferentes Estados do Brasil,

demonstram índices de contaminação que variam de 16,2 à 60% (CHIEFFI e MÜLLER, 1976; ALCÂNTARA-NEVES et al., 1989; CASEIRO, 1996; SANTARÉM et al., 1998; LIMA et al., 2005; SANTARÉM et al., 2008; TAVARES et al., 2008; SILVA et al., 2009; GALLINA et al., 2011). Similarmente, os índices em outros Países demonstram variações de 5,4 à 75% (DUMENIGO & GALVEZ, 1995; ABE & YASUKAWA, 1997; OGE & OGE, 2000; FERRÉ & DORCHIES, 2000; GIACOMETTI et al., 2000; DE YBANEZ et al., 2001; POLO-TERÁN et al., 2007).

2.2 Controle biológico

Segundo Grønkvold et al. (1996), o controle biológico descreve situações em que um antagonista (parasito, parasitóide, predador ou patógeno) é aplicado no ambiente para diminuir populações de pragas (parasitos) para densidades subclínicas ou manter as populações destes em níveis não prejudiciais. Não atua diretamente sobre os estágios parasitários no hospedeiro, mas concentra suas ações sobre hospedeiros intermediários, paratênicos, vetores de estágios larvais, e fases de vida livre, diminuindo as fontes de infecção para os hospedeiros.

De acordo com Freitas et al., (2006) os mecanismos de controle biológico são o parasitismo, a predação, a competição e a anabiose. Como regra de manutenção dos sistemas biológicos, toda população é regulada por antagonistas. Este processo ocorre espontaneamente na natureza e não é dependente da interferência do homem. Suas vantagens incluem: fácil aplicação, boa dispersão ambiental, menor custo, efeito prolongado (poderá afetar populações subseqüentes de parasitos), diminuição do aparecimento de resistência e possibilidade de associação com outras metodologias. Além disso, não deixam resíduos e não são tóxicos aos animais e ao ambiente.

O método mais comum de controle de helmintos é através do uso de anti-helmínticos. No entanto, esse método apresenta desvantagens como presença de resíduos na carne e no leite, risco de impacto ambiental, além do desenvolvimento de resistência dos parasitos (WALLER & FAEDO, 1993; SUAREZ, 2002).

Tomando por base as desvantagens apresentadas pelo controle químico e com o intuito de aprimorar os programas de controle parasitário, Araújo et al., (2004b) afirmam que os programas de controle devem ser baseados em informações sobre a

disponibilidade de larvas no ambiente, detecção de fontes de infecção, conhecimento sobre as exigências climáticas para eclosão de ovos, viabilidade larval e uso de drogas anti-helmínticas. Todavia, na falta dessas informações, poderá ocorrer utilização inadequada de tratamentos com anti-helmínticos causando o aparecimento de resistência.

Os microorganismos selecionados para atuarem como antagonistas naturais devem ter alta capacidade reprodutiva e suportar as condições ambientais no local em que o controle é realizado. Assim, a seleção de um agente que possa ser empregado comercialmente como controlador biológico de parasitos gastrointestinais está baseada na capacidade de produção do antagonista em escala industrial, nos custos relacionados a esta produção, na competitividade com as drogas tradicionais estabelecidas no mercado e no tempo de sobrevivência do organismo em formulações comerciais. Deve-se atentar para que as formulações ofereçam segurança para os produtores, consumidores, animais tratados, ao meio ambiente e finalmente, que seja efetivo no controle do organismo alvo (MOTA et al., 2003).

São conhecidos três principais grupos de organismos antagonistas de nematódeos, que diferem entre si de acordo com seu modo de ação. Os predadores são organismos que predam nematóides e utilizam partes de seu corpo como nutrientes. Algumas espécies de predadores podem ser polífagas, consumindo um grande número de espécies de presas e outras olífagas, sendo, portanto, mais específicas. Um segundo grupo é composto por parasitos, que crescem juntamente com seus hospedeiros, obtendo deles os nutrientes necessários para seu desenvolvimento e multiplicação. Em contraste com os predadores, estes organismos são capazes de completar seu ciclo e aumentar sua biomassa em um único nematóide. O terceiro grupo de antagonistas contém um variado número de organismos que influenciam a sobrevivência dos nematóides por competição, espaço físico, ou produção de substâncias tóxicas aos mesmos (STIRLING, 1991).

A maioria dos estudos com fungos sobre o controle biológico das helmintoses tem envolvido a utilização de fungos nematófagos predadores sobre larvas infectantes de helmintos gastrointestinais (WALLER et al., 1994; MENDOZA-DE-GIVES et al., 1999).

A administração de fungos nematófagos aos animais domésticos é considerada uma alternativa no controle dos estágios de vida livre dos nematóides nas pastagens, reduzindo as re-infestações e contribuindo para a sua profilaxia (BARGER, 1999; MOTA et al., 2003). A habilidade dos fungos nematófagos em colonizar a rizosfera tem sido apontada como uma característica importante de um agente de biocontrole (PEARSSON et al., 1995). O sucesso para o estabelecimento desses fungos no solo dependerá basicamente de uma fonte nutricional que possa lhes garantir vantagens competitivas na microbiota existente (KERRY et al., 1984).

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 ambiente ao mesmo tempo que as formas pré-parasitárias.

O controle biológico sobre ovos de helmintos é uma alternativa muito promissora e que vem se destacando atualmente. Além disso, fungos que impedem a evolução de ovos provavelmente são mais promissores como agentes de biocontrole, pois quando comparados aos fungos predadores e endoparasitas, seu efeito na redução de uma população de helmintos será mais acentuado (CIARMELA et al., 2002; BRAGA et al., 2007).

A aplicação de fungos no biocontrole de helmintos parasitos gastrointestinais vem auxiliar o controle químico. Ela deveria ser feita não só em condições em que ocorrer previsão de maior infestação de pastagens por ovos e larvas, mas também quando houver melhores condições para o crescimento dos fungos no meio ambiente. Essas ações previnem, com isso, o parasitismo clínico e a perda de produtividade, fornecendo uma quantidade de larvas suficientes aos animais para provocar o desenvolvimento de uma imunidade adquirida naturalmente (WALLER & FAEDO, 1993; GRAMINHA et al., 2004).

2.3 Fungos nematófagos

A primeira descrição de um fungo predando nematóides foi feita em 1888 por Zopf (GRAY, 1988). Entretanto Jansson & Poinar (1986) relataram o encontro de uma peça de âmbar de milhões de anos contendo um fungo predador de um nematóide do gênero *Oligaphelenchoides atrebora*.

Na literatura cita-se uma grande abundância de antagonistas naturais dos helmintos, entre eles protozoários, bactérias, vírus, ácaros, besouros e fungos. Dentre eles, os fungos nematófagos têm demonstrando bons resultados como agentes de biocontrole, podendo ser encontrados nos ambientes mais distintos (KERRY, 2000; RIBEIRO, 2003). Pesquisas demonstram que esses fungos estão presentes em solos (DIAS et al., 1995), fezes frescas coletadas diretamente do reto de animais (MANUELLI et al., 1999; SAUMELL et al., 2000), ou bolos fecais em decomposição (MAHONEY & STRONGMAN, 1994; SAUMELL & PADILHA, 2000). Ao avaliar a presença de fungos nematófagos em solos, Gortari et al., (2007) na Argentina; Araújo (1995) e Braga et al. (2009a) no Brasil, isolaram vários gêneros fúngicos, entre eles *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Chrysosporium* spp., *Fusarium* spp., *Humicola* spp, *Mortierella* spp., *Mucor* spp, *Paecilomyces* spp, *Penicillium* spp., *Pochonia* spp. e *Monacrosporium* spp., os quais apresentaram alguma atividade sobre ovos de helmintos.

A maioria das espécies de fungos utilizadas no controle biológico era classificada como fungos imperfeitos (reprodução assexuada), divisão Deuteromycetes, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomicetales e família Moliniaceae. Todavia, ao se identificar a reprodução sexuada ou perfeita em algumas espécies permitiu a reclassificação para o filo Ascomycota (GRIFFIN, 1994; MOTA et al., 2003).

De acordo com Barron (1977) e Mota et al., (2003), mais de 150 espécies de fungos nematófagos já foram catalogados. Esses fungos também são conhecidos como fungos destruidores de helmintos, mas por apresentarem características ovícidas podem também predação ovos de helmintos. Comportando-se como antagonistas naturais, são capazes de promover a captura, morte ou mesmo destruição, contribuindo para que os problemas relacionados à resistência e ecotoxicidade sejam minimizados. Entretanto, a utilização desses agentes de controle não excluem a necessidade da empregabilidade de programas integrados de controle parasitário, seleção de animais resistentes e confecção de vacinas (ARAÚJO et al., 1998).

Os fungos nematófagos são divididos em três grupos: endoparasitas, predadores e oportunistas. Existe ainda um quarto grupo conhecido como fungos produtores de metabólitos tóxicos, que embora pouco estudados, também são classificados como fungos nematófagos (ARAÚJO et al., 2004b).

Segundo Mota et al. (2003) e Araújo et al. (2004a) fungos endoparasitas não produzem micélio extenso, mas são capazes de infectar os nematóides através da liberação de conídios, que ao serem ingeridos, promovem o desenvolvimento de hifas responsáveis pela absorção do conteúdo interno do nematóide. Grande parte dos fungos endoparasitas é parasito obrigatório e por isso possuem uma faixa restrita de hospedeiros. Devido a esse fato, a sua utilização e produção *in vitro* é menor, além da produção em escala industrial ser onerosa. Além disso, não possuem capacidade de crescimento no solo, o que o torna impossível de ser proposto como inoculo para o controle ambiental do nematóide-alvo (RIBEIRO, 2003). De acordo com Stirling & West (1991), a dependência de água livre para a atividade dos fungos endoparasitas é o principal fator de limitação para a sua eficiência como controladores biológicos de organismos.

O grupo dos predadores produz até seis tipos de armadilhas: hifas adesivas não diferenciadas; ramificações de hifas que sofrem anastomose, formando redes adesivas tridimensionais; ramificações adesivas, nódulos adesivos; anéis constritores e anéis não constritores. A hifa é usada como armadilha e a presa é capturada por adesão (MOTA et al. 2003). A forma de captura é realizada por meio do desenvolvimento de um amplo sistema de hifas vegetativas e por estruturas de captura dispostas ao longo destas. Algumas dessas estruturas de captura são dependentes de estímulos externos, como quantidade e presença dos nematóides, motilidade, produção de substâncias deles derivadas, estresse fisiológico, e fatores biológicos como luminosidade, presença de água e estado nutricional do isolado fúngico predador, quando em cultivo em laboratório (ARAÚJO et al., 2004b). Este grupo de fungos é o mais estudado e apresenta maior potencial de comercialização, pela facilidade de isolamento e manutenção em laboratório (GRØNVOLD et al., 1996).

Araújo et al. (1999) e Dimander et al. (2003) mencionam os gêneros predadores *Duddingtonia* e *Monacrosporium* como os mais estudados e utilizados no controle biológico de helmintos. Inúmeras pesquisas tem demonstrado resultados promissores com o uso desses fungos no controle de helmintos em animais (RIBEIRO et al., 1999; MELO et al., 2003; JOBIM et al., 2008; BRAGA et al., 2007, 2008, 2009b)

Os fungos oportunistas além de parasitarem ovos, cistos e fêmeas de fitonematóides e de helmintos em geral, são sapróbios e, por essa razão, não dependem da presença do parasito no solo para a sua sobrevivência, sendo por isso facilmente cultivados em laboratório. Suas hifas penetram a casca do ovo através dos pequenos poros existentes na camada vitelínica, causando alteração na permeabilidade da casca e expandindo seu volume. A hifa aumenta de tamanho ao passar pela camada vitelínica e atravessa a camada quitínica e lipídica adjacente. Como consequência do processo, a camada vitelínica se divide, a camada de quitina vacuoliza e a camada de lipídios torna-se dispersa. Hifas endógenas emergem do ovo e produzem conidióforos, funcionando como fonte de conídios. Estes tipos de fungos colonizam o conteúdo do ovo, ou ainda a larva em desenvolvimento no seu interior (ARAÚJO et al., 2004a; CIARMELA et al., 2002). La Mondia & Brodie, (1984) afirmam que nos estágios iniciais de desenvolvimento dos ovos é mais fácil a penetração do fungo do que aqueles em estágios mais maduros, contendo formas juvenis.

A classificação da atividade ovicida é estabelecida de acordo com os seguintes parâmetros: efeito do tipo 1 (efeito lítico sem prejuízo morfológico à casca, na qual são visualizadas as hifas aderidas à casca do ovo); efeito do tipo 2 (efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca); e efeito do tipo 3 (efeito lítico com alteração morfológica da casca e embrião do ovo, com penetração de hifas e colonização interna do ovo) (LYSEK & NIGENDA, 1989; LYSEK & STERBA, 1991). Assim, a classificação de um fungo como espécie ovicida somente acontece se este apresentar durante o processo de infecção dos ovos o efeito do tipo 3 (LYSEK & CHALUPOVÁ, 1978; LYSEK et al., 1982). Contudo, Rodríguez-Kábana et al., (1984) descrevem que numa mesma espécie fúngica poderão ocorrer variações no que se refere à capacidade predatória de ovos, e sendo assim, diferenças entre biótipos serão decisivas na determinação de sua ação. Essas diferenças foram demonstradas por alguns pesquisadores, principalmente em isolados de *Paecilomyces lilacinus* parasitando ovos de *Meilodoyine incognita*, onde em 12 isolados dessa espécie apenas cinco exemplares mostraram ação predatória de forma uniforme (CARNEIRO e GOMES, 1993).

Pochonia chlamydosporia (*Verticillium chlamydosporium*), *Paecilomyces lilacinus* e *Dactyella ovoparasitica* são os principais representantes com significativa atividade

ovicida (LYSEK & STERBA, 1991). Pesquisas envolvendo essas espécies fúngicas têm sido extensivamente desenvolvidas e mostram resultados promissores no controle de *T. canis* (BASUALDO et al., 2000; CIARMELA et al., 2000; ARAUJO, 2008; BRAGA et al., 2008; BRAGA et al., 2009a; CARVALHO et al., 2010)

Alguns estudos têm sido desenvolvidos no intuito de esclarecer os possíveis mecanismos ovicidas exercidos pelos fungos. Bittencourt et al., (1999) e Monteiro et al., (1998) sugerem que a ação ovicida de alguns fungos é decorrente da produção de metabólitos tóxicos que afetam diretamente o embrião em desenvolvimento e a eclosão das larvas. Já Kerry & Hidalgo, (2004) afirmam que a produção de enzimas quitinolíticas está potencialmente envolvida no processo de infecção dos ovos. Similarmente, Dackman et al. (1989), dizem que a habilidade de uma espécie para parasitar ovos está diretamente relacionada com sua atividade enzimática lítica, podendo ser de natureza quitinolítica e proteolítica. Já, Basualdo et al., (2000) acreditam que o mecanismo de atuação desses fungos contra os ovos de helmintos esteja baseado na decomposição enzimática e biossíntese de toxinas. Segundo Araújo et al. (2004a), a hifa penetra no ovo através de pequenos poros existentes na camada vitelínica da casca, provocando com isso uma alteração na sua permeabilidade e, em consequência disso, uma expansão em seu volume com colonização do conteúdo do ovo. Alguns estudos ultra-estruturais em ovos e juvenis de *Meloidogyne arenaria* demonstraram que o fungo ovicida penetra o ovo de forma direta, através de pequenos poros existentes na sua camada vitelínica (FREIRE & BRIDGE, 1985). Estas aberturas são produzidas pela pressão das hifas intumescidas, uma vez que em ovos de helmintos não existem aberturas naturais.

Ciarmela et al. (2000), demonstraram o quão promissor é esse grupo para ser empregado no controle biológico de helmintos, principalmente porque reduzem em cerca de 70 a 90% os níveis de ovos viáveis no solo. Muitas vezes o que impede sua plena eficácia é a estratégia desenvolvida pelos parasitos. A maioria desses helmintos parasitos gastrointestinais produz ovos que rapidamente darão origem a larvas, dificultando o processo de interação com os ovos (JANSSON & NORDBRING-HERTZ, 1988).

3. REFERÊNCIAS

ABE, K.; SHIMOKAWA, H.; KUBOTA, T.; NAWA, Y.; TAKESHITA, A. Myocarditis associated with visceral larva migrans due to *Toxocara canis*. **Internal Medicine**, v.41, p.706-708, 2002.

ABE, N.; YASUKAWA, A. Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in sandpits of parks in Osaka city, Japan, with notes. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.59, p.79–80, 1997.

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

ALCÂNTARA, N.; BAVIA, E.; SILVA, R.M.; CARVALHO, E. Environmental contamination by *Toxocara* sp eggs in public areas of Salvador, Bahia State, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.22, n.4, p.187-190, 1989.

ALTCHER, J.; NALLAR, M.; CONCA, M.; BIANCARDI, M. & FREILIJ, H. Toxocariasis: clinical and laboratory features in 54 patients. **Anales de Pediatría (Barcelona)**, v. 58, p. 425-431, 2003.

ARAUJO, J.M. Ação *in vitro* dos fungos das espécies *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Pochonia chlamydosporia* (syn. *Verticillium chlamydosporium*) e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas ovíferas de *Dipylidium caninum* e ovos de *Taenia saginata*, 75f. **Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais**, 2008.

ARAUJO, P. Observações pertinentes à primeiras ecdises de larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* e *Toxocara canis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.14, 1972.

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

ARAÚJO, J.V.; GOMES, A.P.S.; GUIMARÃES, M.P. Biological control of bovine gastrointestinal nematode parasites in southern Brazil by the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys robusta*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.7, n.2, p.117-122, 1998.

ARAÚJO, J.V.; STEPHANO, M.A.; SAMPAIO, W.M. Passage of nematode-trapping fungi through the gastrointestinal tract of calves. **Veterinarski Arhiv**, v.69, n.2, p.69-78, 1999.

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, 2004a.

ARAÚJO, J.V.; ASSIS, R.C.L.; CAMPOS, A.K.; MOTA, M.A. Atividade in vitro dos fungos nematófagos dos gêneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* sobre nematóides trichostrongilídeos (Nematoda: *Trichostrongyloidea*) parasitos gastrintestinais de bovinos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, n.2, p. 65-71, 2004b.

ASHWATH, M.L.; ROBINSON, D.R.; KATNER, H.P. A presumptive case of toxocariasis associated with eosinophilic pleural effusion: case report and literature review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 764, 2004.

AZAR, D.M.; MARTIN, F. Pediatric uveitis: a Sydney clinic experience. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v.32, p.468-471, 2004.

BÄCHLI, H.; MINET, J.C.; GRATZL, O. Cerebral toxocariasis: a possible cause of epileptic seizure in children. **Child's Nervous System**, v.20, n.7, p.468-472, 2004.

BARGER, I.A. The role of epidemiological knowledge and grazing management for helminth control in small ruminants. **International Journal of Parasitology**, v. 29, p. 41-47, 1999.

BARRIGA, O.O. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. **Veterinary Parasitology**, v.29, p.195-234, 1988.

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

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

BASUALDO, J.A.; CIARMELA, M.L.; SARMIENTO, P.L.; MINVIELLE, M.C. Biological activity of *Paecilomyces lilacinus* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v. 86, n. 1, 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. Report of three cases. **Pediatrics**, v. 9, p. 7-19, 1952.

BEAVER, P.C. The nature of visceral larva migrans. *Journal of Parasitology*, v.55, n.1, p.3-12, 1969.

BITTENCOURT, V.E.P.; MASCARENHAS, A.G.; FACCINI, J.L.H. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. **Ciência Rural**, v.29, n.2, p. 351-354, 1999.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J.V.; CAMPOS, A.K. Observação *in vitro* da ação dos isolados fúngicos *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* e *Verticillium chlamydosporium* sobre ovos de *Ascaris lumbricoides* (Lineu, 1758). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 356-358, 2007.

BRAGA, F.R., ARAÚJO, J.V., CAMPOS, A.K., ARAÚJO, J.M., CARVALHO, R.O., SILVA, A.R., TAVELA, A.O.. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1559–1564, 2008.

BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.V.; SILVA, A.R.; CARVALHO, R.O.; ARAUJO, J.M.; CAMPOS, A.K.; TAVELA, A.O. Ação *in vitro* dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (Duddington, 1955), *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) e *Pochonia chlamydosporia* (Gams & Zare, 2001) sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892). Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v.76, n.1, p.131-134, 2009a.

BRAGA, F. R.; ARAÚJO, J.V.; ARAUJO, J.M.; SILVA, A. R.; CARVALHO, R.O.; CAMPOS, A. K. Avaliação *in vitro* do fungo predador de nematoides *Duddingtonia flagrans* sobre larvas infectantes de ciatostomíneos de equinos (Nematoda: Cyathostominae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 18, supl. 1, p. 83-85, 2009b..

CARNEIRO, R.M.G.G.; GOMES, C.B. Metodologia e teste de patogenicidade de *Paecilomyces lilacinus* e *P. fumosoroseus* em ovos de *Meloidogyne javanica*. **Nematologia Brasileira**, v.7, n.1, p.66-75, 1993.

CARVALHO, E.A., Rocha, R.L., Toxocariasis: visceral larva migrans in children. **Jornal de Pediatria (Rio J)**, v.87, p. 100-110, 2011.

CARVALHO, R.O.; ARAÚJO, J.V.; BRAGA, F.R.; ARAÚJO, J.M.; ALVES, C.D. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 169, p. 123-127, 2010.

CASEIRO, M.M. Síndrome da larva migrans visceral causada por larvas de *Toxocara canis* (Wrener, 1782 e Stiles, 1905), no município de Santos, 121f. Dissertação (Mestrado). **Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 1996.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). *Toxocara* infection (toxocariasis) and Animals. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/healthypets/diseases/toxocariasis.htm>>, 2008.

CHIEFFI, P.P.; MULLER, E.E. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara* sp no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p. 367-372, 1976.

CHIODO, P.; BASUALDO, J.; CIARMELA, L.; PEZZANI, B.; APEZTEGUÍA, M.; MINVIELLE, M. Related factors to human toxocariasis in a rural community of Argentina. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 397-400, 2006.

CHIRA, O.; BADEA, R.; DUMITRASCU, D.; SERBAN, A.; BRANDA, H.; HAJJAR, N.; CHIOREAN, E.; CRUCIAT, C. Eosinophilic ascites in patient with *Toxocara canis* infection. A case report. **Roman Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 397-400, 2005.

CIARMELA, M.L.; BASUALDO, F.; BASUALDO, J.A. Biological control of *Paecilomyces lilacinus* genus against *Toxocara canis* eggs. **Parasitology Research**, v.86, n.1, p.854-859, 2000.

CIARMELA, M.L.; LORI, M.G.; BASULADO, J.A. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v.103, n.3, p.251-257, 2002.

D'ONOFRIO, M.; ZAMBONI, G.; TOGNOLINI, A.; MALAGÒ, R.; FACCIOLI, N.; FRULLONI, L.; MUCELLI, R.P. Mass-forming pancreatitis: value of contrastenhanced ultrasonography. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, p.4181-4184, 2006.

DACKMAN, C.; CHET, I.; NORDBRING-HERTZ, B. Fungal parasitism of the cyst nematode *Heterodera schachtii* infection and enzymatic activity. **FEMS Microbiology Ecology**, v.62, n.1, p.151-156, 1989.

DE YBÁÑEZ, R.M.R.; GARIJO, M.M.; GOYENA, M.; ALONSO, F. Improved methods for recovering eggs of *Toxocara canis* from the soil. **Journal of Helminthology**, n. 74, p.349–353, 2001.

DESPOMMIER, D. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.265-272, 2003.

DEUTZ, A., FUCHS, K., AVER, H., KERBL, U., ASPÖCK, H., KÖFER, J. *Toxocara* – infestations in Austria: a study on the risk of infection of farmers, slaughterhouse staff, hunters and veterinarians. *Parasitology research*, v. 97, p. 390-394, 2005.

DIAS, W.P., FERRAZ, S., MUCHOVEJ, J. J. Detecção, isolamento e identificação de fungos predadores de nematóides em amostras de solo de diferentes regiões do Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v.42, n.244, p.615-620, 1995.

DIMANDER, S.O.; HÖGLUND, J.; UGGLA, A.; SPÖRNDLY, E.; WALLER, P.J. Evaluation of gastro-intestinal nematode parasite control strategies for first-season grazing cattle in Sweden. **Veterinary Parasitology**, v.111, n.2-3, p.192-209, 2003.

DUMÉNIGO, B.E.; GÁLVEZ, D. Contaminación de suelos en Ciudad de La Habana com huevos de *Toxocara canis*. Revista Cubana de Medicina Tropical, v.47, p.178-80, 1995.

ESPINOZA, Y.A.; HUAPAYA, P.E.; ROLDÁN, W.H.; JIMÉNEZ S.; ABANTO E.P.; ROJAS C.A.; CAVERO, Y.A.; GUTIÉRREZ C.A. Seroprevalence of human toxocariasis in andean communities from the northeast of Lima, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, p.31-36, 2010.

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

FAN, C.K.; HUNG, C.C.; DU, W.Y.; LIAO, C.W.; SU, K.E. Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among mountain aboriginal schoolchildren living in contaminated districts in eastern Taiwan. **Tropical Medicine and International Health**, v.9, n.12, p.1312-1318, 2004.

FERRÉ, P.; DORCHIES, P. Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in sandpits of eight public parks in Toulouse (SW France). **Reviev Medycyna Veterynaryjna**, v. 151, p.501-506, 2000.

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

FREIRE, F.C.O.; BRIDGE, J. Parasitism of eggs, females and juvenis of *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* and *Verticillium chlamydosporium*. **Fitopatologia Brasileira**, v.10, n.3, p.557-596, 1985.

FREITAS, L.G.; OLIVEIRA, R.D.L.; FERRAZ, S. Introdução à nematologia. **Universidade Federal de Viçosa**, p.57-59 (Caderno Didático, 58), 2006.

GALLINA, T., SILVA, M.A.M.P., CASTRO, L.L.D., WENDT, E.W., VILLELA, M.M., BERNE, M.E.A. Presence of eggs of *Toxocara* spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, Jaboticabal. V.20, p.176-177, 2011.

GAVIGNET, B.; PIARROUX, R.; AUBIN, F.; MILLON, L.; HUMBERT, P. Cutaneous manifestations of human toxocariasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.59, p.1031-42, 2008.

GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; FORTUNA, M.; OSIMANI, P.; ANTONICELLI, L.; DEL PRETE, M.S.; RIVA, A.; D'ERRICO, M.M.; PETRELLI, E.; SCALISE, G. Environmental and serological evidence for the presence of toxocariasis in the urban area of Ancona, Italy. **European Journal of Epidemiology**, v.16, p.1023-1026, 2000.

GORTARI, C.; CAZAU, C.; HOURS, R. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 24-28, 2007.

GLICKMAN, L.T; SCHANTZ, P.M. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. **Epidemiology Review**, v.3, p.230-50, 1981.

GRAMINHA, E.B.N. Isolamento e atividade predatória de fungos nematófagos sobre nematóides gastrintestinais de ovinos da micro região de Jaboticabal-SP. Jaboticabal: UNESP, 2004. 72p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, 2004.

GRAY, N.F. Fungi attackhing vermiform nematodes. In: POINAR, O.G.; BORNE, J.H. (Eds). **Diseases of nematodes**. Boca Raton: CRC Press, p. 3- 38, 1988.

GRIFFIN, D.H. Fungal physiology. Wiley-Liss, New York, p. 1- 458, 1994.

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. **Veterinary Parasitology**, v. 64, n.1-2, p.47-64. 1996.

GUIMARÃES, A.M.; ALVESSA, E.G.L; REZENDE, G.F.; RODRIGUES, M.C. Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, Minas Gerais, Brasil. **Revista saúde pública**, v. 39, n. 2, p. 293-295, 2005.

HUGHES, P.L., Internal parasitism in farm dogs. In: Proceedings of the 21st Seminar of Sheep and Beef Cattle Society, **New Zealand Veterinary Association, New Zealand**, 1991.

JANSSON, H.B.; POINAR, O.G. Some possible fossil nematophagous fungi. **Transactions of the British Mycological Society**, v.87, p. 471-474, 1986.

JANSSON, H.B.; NORDBRING-HERTZ, B. Infection mechanisms in the fungus nematode system. In: POINAR, G.O.; JANSSON, H.B. **Diseases of nematode, v. II. CRC Press, Boca Raton**, p.1-72, 1988.

JOBIM, M.B., SANTURIO, J.M., RUE, M.L. *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematódeos de bovinos à campo. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.38, n.8, p.2256-2263, 2008.

KERRY, B.R.; SIMON, A.; ROVIRA, A.D. Observations on the introduction of *Verticillium chlamydosporium* and other parasitic fungi into soil for control of the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Annals of Applied Biology**, v.105, p.509-516, 1984.

KERRY, B.R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**, v.38, n.1, p.323-441, 2000.

KERRY, B.R.; HIDALGO, L. Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematode on organically grown vegetable crops in Cuba: **IOBC Bulletin**, En prensa, 2004.

LA MONDIA, J.A.; BRODIE, B.B. An observation chamber for evaluating potential biocontrol agents of *Globodera rostochiensis*. **Journal of Nematology**, v.16, p.112-15, 1984.

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, São Paulo**, 1991.

LIMA, J.L.; ANDRADE, L.D.; AGUIAR-SANTOS, A.M.; ALVES, L.C.; MEDEIROS, Z. Contaminação por ovos de *Toxocara* sp. em solo no município de Moreno, estado de Pernambuco, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 5, p. 339-346, 2005.

LYSEK, H.; CHALUPOVÁ, V. Quantitative determination of activity of ovicidal fung. **Acta Univesity Palackianae Olomucensis (in the Press)**, 1978.

LYSEK, H.; NIGENDA, G. Capacidad de autodeshelmintización del suelo. **Salud Pública de México**, v.31, n.6, p.763-771, 1989.

LYSEK, H. The problem of human geohelminthoses and the prospects for their biological control. **Acta Univesity Palackianae Olomucensis, Fac Med**, v.103, p.315-329, 1982.

LYSEK, H.; STERBA, J. Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. **Folia Parasitologica**, v.38, p.255-259, 1991.

MAGNAVAL, J.F.; GLICKMAN, L.T.; DORCHIES, P.; MORASSIN, B. Hightlights of human toxocariasis. **Korean Journal Parasitology**, v. 39, p. 1-11, 2001.

MAHONEY, C.J.; STRONGMAN, D.B. Nematophagous fungi from cattle manure in four states of decomposition at three sites in Nova Scotia, Canada. **Mycologia**, v.86, n.3, p.371-375, 1994.

MANUELLI, P.R.; WALLER, P.J.; FAEDO, M.; MAHOMMED, F. Biological control of nematode parasites of livestock in Fiji: screening of fresh dung of small ruminants for the presence of nematophagous fungi. **Veterinary Parasitology**, v.81, p. 39-45, 1999.

MELO, L.M., BEVILAQUA, C.M.L., ARAÚJO, J.V., MELO, A.C.F. Atividade predatória do fungo *Monacrosporium thaumasium* contra o nematóide *Haemonchus contortus*, após passagem pelo trato gastrintestinal de caprinos. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.33, n.1, p. 169-171, 2003.

MENDOZA-DE-GIVES, P.; DAVIES, K.G.; CLARK, S.J.; BEHNKE, J.M. Predatory behavior of trapping fungi against srf mutants of *Caenorhabditis elegans* and different plant and animal parasitic nematodes. **Parasitology**, v.119, p.95-104, 1999.

MONTEIRO, S.G.; BITTENCOURT, V.E.P.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisople* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.461-466, 1998.

MOREIRA-SILVA, S.F.; RODRIGUES, M.G.; PIMENTA, J.L.; GOMES, C.P.; FREIRE, L.H.; PEREIRA, F.E. Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37,n.2, p.169-74, 2004.

MORIMATSU, Y.; AKAO, N.; AKIYOSHI, H.; KAWAZU, T.; OKABE, Y.; AIZAWA, H. Case reports: a familial case of Visceral Larva Migrans after ingestion of raw chicken livers: appearance of specific antibody in bronchoalveolar lavage fluid 10 of the patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.75, p.303-306, 2006.

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

NIEC, R. Toxocariasis animal y humana: reseña del ciclo evolutivo y de la enfermedad. **Revista de Medicina Veterinária (Buenos Aires)**, v.61, p.494-498, 1980.

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

OGE, H.; OGE, S. Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. **Veterinary Parasitology**, V.92, p.75-79, 2000.

OLIVEIRA, C.B.; SILVA, A.S.; MONTEIRO, S.G. Ocorrência de parasitas em solos de praças infantis nas creches municipais de Santa Maria-RS, Brasil. **Revista da FZVA, Uruguaiana**, v.14, n.1, p. 174-179, 2007.

PARK, S.P. et al. Five cases of ocular toxocariasis confirmed by serology. **The Korean Journal of Parasitology** , v. 38, p. 267-273, 2000.

PEARSSON, Y.; ERLAND, S.; JANSSON, H.B. Identification of *Arthrobotrys* species using RFLP analysis of PCR amplified rDNA. **Nematologica**, v.41, p.329-332, 1995.

POLO-TERÁN, L.J.; CORTÉS-VECINO, J.A.; VILLAMIL-JIMENEZ, L.C.; PRIETO,E. Contaminación de los parques públicos de La localidad de Suba, Bogotá con nemátodos zoonóticos. **Revista de la Salud Pública**, v. 9, n. 4, p.550-557, 2007.

RAYES, A.A. et al. Human toxocariasis and pyogenic liver abcess: A possible association. **The American journal of Gastroenterology**, v. 96, p. 563-566, 2001.

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

RIBEIRO, R.C.F., FERRAZ, S., MIZOBUTSI, E.H. Avaliação da eficiência de isolados de *Monacrosporium* spp. No controle de *Meloidogyne javanica* e *Heterodera glycines*. **Nematologia Brasileira**, v.23, 1999.

RIBEIRO, R.R. Atividade predatória sobre larvas de tricostrongilídeos de isolados fúngicos do gênero *Monacrosporium* após a passagem pelo trato gastrointestinal de bovinos. Viçosa: UFV, 2003. 46p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.

RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; GINTIS, B.A. Effectiveness of species of *Gliocladium*, *Paecilomyces*, and *Verticillium* for control of *Meloidogyne* in field soil. **Nematropica**, v.14, p.155-170, 1984.

ROMANO, N.; NOR AZAH, M.O.; RAHMAH, N.; LIM, Y.A.L.; ROHELA, M. Seroprevalence of toxocariasis among Orang Asli (Indigenous people) in Malaysia using two immunoassays. *Tropical Biomedicine*, v.27, n.3, p.585–594, 2010.

SALEM, G.; SCHANTZ, P. Toxocaral visceral larva migrans after ingestion of raw lamb liver. **Clinical Infectious Diseases**, v.15,n.4, p.743-744, 1992.

SANTARÉM, V.A.; SARTOR, I.F.; BERGAMO, F.M.M. Contaminação por ovos de *Toxocara spp.* em parques e praças públicas de Botucatu, São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, 1998.

SANTARÉM, V.A.; FRANCO, E.C.; KOZUKI, F.T.; FINI, D.; PRESTES-CARNEIRO, L.E. Environmental contamination by *Toxocara spp.* eggs in a rural settlement in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.5, p.279-281, 2008.

SANTARÉM, V.A.; CHESINI, P.A.F.; LAMERS, B.E.L.; ELEFANT, G.R.; GIUFFRIDA, R. Anti-*Toxocara spp.* antibodies in sheep from southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.283-286, 2011.

SAUMELL, C. A.; PADILHA, T.; SANTOS, C. DE P. Nematophagous fungi in sheep faeces in Minas Gerais, Brazil. **Mycological research**, v.104, n.8, p.1005-1008, 2000.

SAUMELL, C.A.; PADILHA, T. Influence of weather and time of deposition on sheep faeces colonization by nematophagous fungi in the Mata region of Minas Gerais state, Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.14, p.63-70, 2000.

SCAINI, C.J.; TOLEDO, R.N.; LOVATEL, R. et al. Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, p.617-619, 2003.

SCHANTZ, P.M.; GLICKMAN, L.T. Toxocaral visceral larva migrans. **The New England Journal of Medicine**, v.23, n.8, p.436-439, 1978.

SCHANTZ, P.M.; GLICKMAN, L.T. Ascaridos de perros y gatos: um problema de salud publica y de medicina veterinaria. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v.94, p.571-586, 1983.

SCHANTZ, P. *Toxocara larva migrans* now. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.41, p.21-34, 1989.

SILVA, M. A.; WENDT, E.W.; DIAS de CASTRO, L. L.; FIGUEIREDO, M.I.O.; GARCIA, A.N.; GALLINA, T.; VILLELA, M.M.; BERNE, M.E.A. Contaminação ambiental por formas parasitárias na área perimetral do campus da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão – RS. **XVIII CIC UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS-RS**, 2009.

SOULSBY, E.J.L. Helminths, **arthropods and protozoa of domesticated animals**. 7^a Ed. Baillière Tindall, London, 806p, 1982.

STENSVOLD, C.R.; SKOV, J.; MØLLER, L. N.; JENSEN, P. M.; KAPEL, C.M.O.; PETERSEN, E.; NIELSEN, H.V. Seroprevalence of Human Toxocariasis in Denmark. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, p.1372–1373, 2009.

STIRLING, G.R.; WEST, L.M. Fungal parasites of root-knot nematodes eggs from tropical and sub tropical regions of Australia. **Australasian Plant Pathology**, v.20, n.4, p.149-154, 1991.

STIRLING, G. R. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects. **Wallingford: CAB International**, p. 282, 1991.

SUAREZ, V.H. Helminthic control on grazing ruminants and environmental risks in South America. **Veterinary Research**, v.33, p.563-573, 2002.

TAVARES, A.L.C.; SCAINI, C.J.; MÜLLER, G.; FARIAS, N.A.R.; BERNE, M.E.A. Contaminação do solo de praças de conjunto habitacionais por helmintos e protozoários em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Vittale, Rio Grande**, v.20, p.59-63, 2008.

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

TEIXEIRA, C.R.; CHIEFFI, P.P.; LESCANO, S.A.; MELO SILVA, E.O.; FUX, B.; CURY, M.C. Frequency and risk factors for toxocariasis in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p.251-255, 2006.

TONELLI, E. Toxocaríase e asma: associação relevante. **Jornal de Pediatria (Rio de Janeiro)**, v.81, p.95-96, 2005.

VIDAL, J.E.; SZTAJNBOK, J. & SEGURO, A.C. Eosinophilic meningoencephalitis due to *Toxocara canis*: case report and review of the literature. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.69, p.341-343, 2003.

WALLER, P.J.; LARSEN, M.; FAEDO, M.; HENESSY, D.R. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. **Veterinary Parasitology**, v.51, n.3-4, p.289-299, 1994.

WALLER, P.J.; FAEDO, M. The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematodes parasites of sheep: screening studies. **Veterinary Parasitology**, v.49, n.4, p.285-297, 1993.

ZINKHAM, W.H. Visceral larva migrans. A review and reassessment indicating two forms of clinical expression: visceral and ocular. **American Journal of Diseases of Children**, v.132,n.6, p.627-633, 1978.

4. ARTIGO: conforme as normas da revista Parasitology Research (Anexo 1).

ARTIGO:

Ovicide activity of isolated fungi in soils in the south of Brazil on *Toxocara canis* eggs

Ovicide activity of isolated fungi in soils in the south of Brazil on *Toxocara canis* eggs

Ovicide activity of isolated fungi in soils in the south of Brazil on *Toxocara canis* eggs

Fernando de Souza Maia Filho¹, Elisabeth Aires Berne¹, Juliana Nunes Vieira¹,
Francieli Elisa Stoll², Patrícia da Silva Nascente¹, Daniela Isabel Brayer Pereira^{1*}

¹ Department of Microbiology and Parasitology, Biology Institute, Post Graduate Programme in Parasitology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Brazil

² Department of Microbiology and Parasitology, Biology Institute, Laboratory of Mycology, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Brazil

^{1*}Corresponding author: Department of Microbiology and Parasitology, Biology Institute. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. CEP: 96010-900. Brazil

Abstract:

This study had the objective of evaluating the activity of *in vitro* ovicide of isolated fungi based on soil contaminated with *Toxocara* spp. in public places in the city of Pelotas, RS, Brazil. Samples of soil from ten localities were sowed in agar water 2% with antibiotics and incubated at 25°C for 21 days. The ovicide activity of the fungal isolates obtained was tested *in vitro* in five repetitions for each analyzed insulator. An mL of an embryonated egg suspension of *Toxocara canis* (10^3 eggs) was poured over the fungal cultures grown in agar water for 10 days. At intervals of 7, 14 and 21 days, 100 eggs were removed from each plaque and evaluated in optical microscopy. *Acremonium* spp., *Aspergillus* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* spp., *Gliocladium* spp., *Mucor* spp. and *Trichoderma* spp were isolated from the soil. In this order, a significant ovicidal type 3 effect was observed in *Trichoderma* spp., *Fusarium* complex *solani* and *Acremonium* spp. *Trichoderma* spp. presented an ovicidal effect on the 14th day of fungus-egg interaction. The other fungal genera tested presented a type 2 effect. The results obtained showed the presence of nematophagous fungi parasites of eggs in soil in the Southern region of Brazil and demonstrated the ovicidal activity of *Trichoderma* spp. and *Fusarium* complex *solani* on *T. canis* eggs.

Key Words: Toxocariasis, Nematoda, Egg fungal parasites, Soil, Biological control, *Trichoderma* spp.

4.1. Introduction

Visceral toxocariasis, also called syndrome of visceral *migrans* larva (VML), is a parasitic zoonosis, a result of the migration and persistence of helminthic larva in uncommon hosts (Beauver, 1969). Several species of helminthes can cause VML, however, *Toxocara canis* is the most frequent nematode associated to the disease (Despommier, 2003). The high prevalence of this parasite in dogs and cats, associated to the frequent contamination of the environment and the resistance of the eggs in the soil, increase human exposure to toxocariasis, making this disease a problem of public health of a world distribution (Gortari et al., 2007). Prevalence data of child toxocariasis in some countries demonstrate quite variable indexes (Romano et al., 2010; Sharif et al., 2010; Espinoza et al., 2011; Stensvold et al., 2011). In Brazil, studies have reported a prevalence that varies from 8.7% (Teixeira et al., 2006) to 54.8% (Figueiredo et al., 2005; Carvalho and Rocha, 2011; Santarém et al., 2011).

According to Barriga (1988) the control of the canine population, the education of the population about the zoonotic potential of *T. canis* and the limitation of the access of animals to leisure areas constitute essential measures to prevent toxocariasis. Nevertheless, the difficulty in implementing these measures, joined to a high resistance of the eggs in the environment, the difficulties of disinfection, and the problems inherent to chemical control justify the need of alternative measures that would help in the decontamination of the soil, as it constitutes one of the main sources of infection of susceptible hosts. The use of nematophagous fungi, natural enemies present in the ecosystem, and the action of which is directed to the parasitism of the eggs and larvae of free life of the geohelminthes are increasing (Braga et al., 2007). These fungi live in the organic matter of the soil, where they develop parasitoid or predator relations with the nematodes, being classified as ovicide, endoparasites, or predators (Graminha et al., 2005). The parasitoid fungi of eggs do not depend on the presence of nematodes in the soil for their survival. Due to this characteristic, they establish themselves easier than the predator fungi (Ferreira et al., 2008). Their ovicide activity is characterized by the penetration of hyphae in the egg shell, through the pores of the vitelline layer, which causes alteration in the permeability of the shell and the expansion of its volume (Mota et al.,

2003). Among these fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* stand out and are extensively studied in relation to their ovicidal activity on *T. canis* (Araújo et al., 1995; Gortari et al., 2007; Carvalho et al., 2010; and Frassy et al., 2010). However, the search for fungi adapted to the regional conditions is necessary, since the research on autochthonous fungi, with a nematophagous potential is important to the biological control. To choose a possible control agent, the capacity of adaptation of the fungus to the locality that will be used, must be taken into consideration, more so than the facility of isolation and/or maintenance in laboratory conditions (Gray, 1983; Gronvold, 1996; Gortari et al., 2007).

Faced with this, it becomes important to evaluate the ovicidal activity of isolated fungi based on the soil of public localities in the municipality of Pelotas, RS, Brazil on *T. canis* eggs.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Collection of soil samples: Soil was collected in public areas in the municipality of Pelotas, State of Rio Grande do Sul, Brazil. The municipality is located at latitude 31° 46'19"S and longitude 52° 20'33"O. It is seven meters above sea level, has a subtropical climate, damp, with an annual average of 17.5°C, 1,379 mm of rain per year and a relative humidity of the air of 80% per year (<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pelotas#Clima>). The areas selected for the collection (10 localities; 3 equidistant places per locality) were based on previous work performed in the region, and which had presented contamination by *Toxocara* spp. eggs (Tavares et al., 2008; Gallina et al., 2011). Samples of approximately 500 grams of soil were obtained at a depth of 10cm, ignoring dead leaves and residual of the top layer. After the collection, the samples were packed in plastic bags, duly identified, and immediately transported to the Mycology Laboratory of the Biology Institute/UFPel for processing.

4.2.2. Isolation of fungi from the soil: The technique for the isolation of fungi was based on Duddington (1955), adapted for the research on fungi with ovicidal activity, described by Gortari et al. (2007). The surface of the agar water culture medium at 2%, with the addition of streptomycin (5 mg/1L) and chloramphenicol (5mg/1L) was inoculated with one mL of a suspension of *T. canis* eggs (approximately 10³ eggs) and immediately pulverized with 0,5 grams of the soil, in the form of a cross. The plaques were incubated at 25°C and observed daily for 21 days. After fungal growth, new culture plates were placed into Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA). The identification of the fungi was based on macro and micro morphological characteristics (Domsch et al., 1995; De Hoog et al., 2000) and determined up to the lowest taxonomic level possible. After the identification, the cultures were maintained in test tubes containing corn-meal-agar (CMA) at room temperature.

4.2.3. Collection of *T. canis* eggs: Firstly, young dogs with parasites were treated with pamoato of pyrantel (12,5 mg/Kg, by mouth). The specimen of parasites recovered were washed in isotonic saline solution with PBS 0.15M, pH 7.2 for

identification and sexing. The eggs were obtained directly from the uterine tubes of the adult females and washed 10 times per centrifugation, in distilled sterile water, at 1.000 rpm per 5 minutes. Afterwards, they were incubated at 25°C, for 14 days in a solution containing formalin at 0.05%, streptomycin sulphate at 0.05%, and chloramphenicol at 0.01%. Following this period, the process of washing with distilled water was repeated as described above.

4.2.4. *In vitro* activity of fungal isolates: The tested isolates were previously peaked for Petri dishes containing PDA, incubated at 25°C for 10 days. Based on this cultivation, disks of the culture of 4mm in diameter were transferred for Petri dishes containing agar water at 2%. All the dishes remained incubated at 25°C for 10 days. One mL of a suspension of embryonated *T. canis* eggs (10^3 /mL) were poured over each one of the fungal cultures, as well as over the surface of the Petri dishes containing only agar water medium at 2% (without fungus), becoming the control group. Five repetitions were performed for each insulator analyzed. Previously, the embryonated eggs had been analyzed morphologically in relation to their integrity, by means of an optical microscopy, in an objective lense of 10x, following the criteria described by Araújo et al. (1995). At intervals of 7, 14 and 21 dias, 100 eggs were removed from each dish, according to the technique described by Araújo et al. (1995), colored with Aman-blue at 1% and evaluated in microscopy of light, according to the parameters established by Lysek et al. (1978). As a positive control, the fungus *Paecilomyces lilacinus* (CG 193) was used, and as a negative control, *Duddingtonia flagrans* (CG 768). These isolates were kindly provided by CENARGEN (National Research Center for Genetic Resources and Biotechnology).

4.2.5. Statistical Analysis: The data obtained were submitted to the non-parametric Friedman test with a significance level of 1%.

4.3. Results

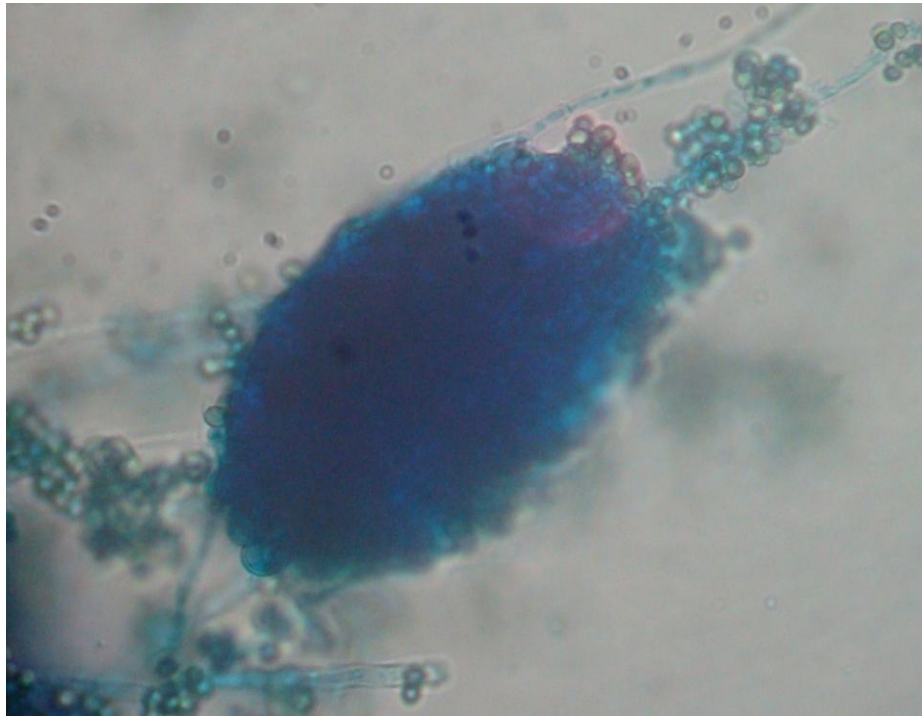
Based on the soil analyzed, fungi of the *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* complex *oxysporum*, *Fusarium* complex *solani*, *Gliocladium* spp., *Mucor* spp. and *Trichoderma* spp. were isolated. All the fungal isolates showed some degree of fungus-egg interaction. However, the isolates of *Acremonium* spp., *Fusarium* complex *solani* and *Trichoderma* spp. were the ones that presented a significant ovicidal effect (type 3 effect) on the embryonated *Toxocara canis* eggs. The results in average for the type 1, 2, and 3 effects at 7, 14, and 21 days for the groups treated with the fungi *Acremonium* spp., *Fusarium* complex *solani*, *Trichoderma* spp., and the control group are represented in Table 1. In the control group, the presence of fungi was not found. The ovicidal activity of the isolate *Trichoderma* spp. was observed on the 14th day of interaction (Figure 1). In *Acremonium* spp. and *Fusarium* complex *solani* the same effect was observed on the 21st day. In the remaining evaluated fungi, although they had not shown a significant type 3 effect, the type 2 effect was observed on the 21st day in *Aspergillus* spp. (55.2%), *Bipolaris* spp. (52.4%), *Fusarium* complex *oxysporum* (46.8%), *Mucor* spp. (42.0%) and *Gliocladium* spp. (39.2%).

Table 1 – Percentages and standard deviation of ovicide activity of the fungi *Acremonium* spp., *Fusarium complexo solani*, *Trichoderma* spp. and control group, on *Toxocara canis* eggs at 7, 14 and 21 days of fungus-egg interaction.

	Effect at 7 days		
	Effect 1(%)*	Effect 2 (%)**	Effect 3 (%) ***
<i>Acremonium</i> spp.	27.4 ^A ± 3,3	0 ^A ± 0	0 ^A ± 0
<i>Fusarium complexo solani</i>	52.0 ^B ± 3,8	0 ^A ± 0	0 ^A ± 0
<i>Trichoderma</i> spp.	64.0 ^C ± 2,6	10.6 ^B ± 5,9	0.2 ^A ± 0,4
Control	0 ^D ± 0	0 ^A ± 0	0 ^A ± 0
	Effects at 14 days		
	Effect 1 (%)*	Effect 2 (%)**	Effect 3 (%) ***
<i>Acremonium</i> spp.	49.0 ^A ± 1.6	4.8 ^A ± 2.7	0 ^A ± 0
<i>Fusarium complexo solani</i>	59.6 ^B ± 1.5	7.0 ^A ± 2.0	0 ^A ± 0
<i>Trichoderma</i> spp.	35.2 ^C ± 3.9	41.2 ^B ± 6.4	3.4 ^B ± 1,1
Control	0 ^D ± 0	0 ^C ± 0	0 ^A ± 0
	Effects at 21 days		
	Effect 1 (%)*	Effect 2 (%)**	Effect 3 (%) ***
<i>Acremonium</i> spp.	51.6 ^A ± 3,7	30.2 ^A ± 3,0	1.8 ^A ± 0.8
<i>Fusarium complexo solani</i>	49.0 ^A ± 4,3	26.0 ^A ± 3,5	4.6 ^B ± 1.1
<i>Trichoderma</i> spp.	30.8 ^B ± 3,6	53.4 ^B ± 5,1	7.8 ^C ± 1.3
Control	0 ^C ± 0	0 ^C ± 0	0 ^D ± 0

Percentage followed by a different capital letter in the column statistically differs ($P < 0,01$) by the Friedman test.*Effect type 1, physiological, biochemical effect, without morphological damage to the egg shell, on which hyphae can be observed adhered to the shell; **Effect type 2, lithic effect with alterations in the morphology of the shell and embryo of the egg, without penetration of the hyphae through the shell; ***Effect type 3, lithic effect, with morphological alteration of the shell and the embryo, as well as penetration of the hyphae and internal colonization of the egg.

Figure 1 - Effect type 3 of the insulator *Trichoderma* spp. on *Toxocara canis* eggs on the 14th day of interaction. One can see the adherence of conidia and penetration of hyphae in the cuticle with the destruction of the egg. Optical microscopy (object lense 40X).



4.4. Discussion

This study is the first in the research of parasitic fungi for eggs in soil in the Southern region of Brazil. Seven genera of filament fungi were isolated, from soil with high *Toxocara* spp. egg contamination. *Trichoderma* spp., *Fusarium* complex *solani* and *Acremonium* spp. stood out for their promising ovicide activities. According to Lysek (1978) a fungus with ovicide potential is that which demonstrates the largest percentage of lithic effect, with morphological alteration of the shell and embryo, with penetration of hyphae and internal colonization of the egg (type 3 effect). Within the fungi evaluated, *Trichoderma* spp. stood out, as it presented a significant type 3 effect after the 14th day of fungus-egg interaction. This result is relevant, because according to Overgaauw (1997) the *T. canis* eggs become infectious in around 2 to 6 weeks. Hence, the fungus could induce the eggs to inactivity and thus, reduce the level of environmental contamination. Several studies have evaluated ovicidal action of different fungi on *T. canis* eggs (Araújo et al., 1995, Carvalho et al., 2010; Ciarmela et al. 2002; Gortari et al., 2007; Ciarmela et al., 2010; Frassy et al., 2010). Only Ciarmela et al. (2010) evaluated the activity of *Trichoderma harzianum*. This genus has been extensively researched in the biological control of innumerable phytopathogenic fungi (Mafia et al., 2003; Ethur et al., 2005; Patrício et al., 2007) and in the control of phytonematodes (Sharon et al., 2001, 2007; Ferreira et al., 2008). Surveys have shown the capacity of parasitism of *Trichoderma* spp. on eggs of different species of nematodes from the branches of *Meloidogyne exigua* (Ferreira et al., 2008), *M. incognita* (Eapen et al., 2005; Santin, 2008), *M. arenaria* (Windham et al., 1989) and *M. javanica* (Sharon et al., 2001, 2007). Mechanisms have been suggested to explain the activity of *Trichoderma* spp. against phytopathogenic fungi like: antibiosis, competition, micro parasitism and production of enzymes (chitinases, glucanases and proteases). All these mechanisms, except competition, can potentially be involved in the process of biological nematode control (Sharon et al., 2001). Santin (2008), on assessing the potential of *Trichoderma* spp. on *M. incognita* suggests that the mechanisms used by the fungus in the control of nematodes consists of the production of inhibiting volatile metabolites and in the production of lithic enzymes that degrade the chitin of the eggs. Morton et al. (2004) state that the chitinolytical activity is probably the most relevant for the lesion on the sheath of the egg. It is suggested that ovicide activity of the observed *Trichoderma* spp. on *T. canis*

eggs in the current study can be due to some of the mechanisms mentioned afore. However, research needs to be developed to determine the exact ovicide mechanism used by the fungus. Though our results differ from Ciarmela et al. (2010), who state that *T. harzianum* does not affect the viability of *T. canis* eggs, it is probable that this divergence is due to the species of the *Trichoderma* evaluated. Moreover, Sharon et al. (2007) verified differences in the capacity of the adherence of conidia and the parasitism of three species of *Trichoderma* on eggs of *M. javanica*, reporting less activity of *T. harzianum*.

In Argentina, Ciarmela et al. (2002, 2010), on evaluating ovicide activity of isolated fungi in soil of public localities in the city of La Plata, showed the activity of *Fusarium pallidoroseum*, *F. oxysporum*, *F. sulphureum* and *F. moniliforme* on *T. canis* eggs. In a similar study, Gortari et al. (2007) demonstrated the efficiency of various fungal genera on eggs of the same parasite, amongst which: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, and others. The ovicide effect by the genus *Fusarium* in our study and in that of Ciarmela et al. (2002, 2010) and Gortari et al. (2007) is indicative of the probable potential of these fungi as agents of biological control of helminthic eggs and deserves larger *in vitro* investigations.

The result obtained from the isolate *Acremonium* spp., although significant, was the one that presented a lesser percentage of type 3 effect (1.8%), when compared to *Trichoderma* spp. and *Fusarium complex solani*. Reports describing ovicide activity of this genus are rare. However, Gortari et al. (2007) demonstrated adversary action in this fungus on *Toxocara* spp. eggs. The other genera evaluated, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Fusarium complex oxysporum*, *Gliocladium* and *Mucor* presented type 2 effect, not considered ovicide, according to the parameters determined by Lysek (1978).

Amongst the nematophagous fungi studied most, *Paecilomyces lilacinus* and *Pochonia chlamydosporia* stand out for their ovicide activity. *In vitro* studies have shown the efficiency of these fungi on embryonated *T. canis* eggs (Araújo et al., 1995; Carvalho et al., 2010; Frassy et al., 2010), *Taenia saginata* (Braga et al., 2008a), *Fasciola hepatica* eggs (Braga, 2008b), egg capsules of *Dipylidium caninum* (Araujo et al., 2009) and *Eurytrema coelomaticum* eggs (Braga et al., 2009). Although they are the species most cited as ovicides, *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* were not isolated from soil in this study. This fact could have

occurred due to the influence of biotic and abiotic factors, which affect the growth and development of fungi in the environment (Gortari et al., 2007).

4.5. Conclusion

The results of this study demonstrate the presence of parasitic fungi of eggs in soil in the Southern region of Brazil and show the ovicide activity of the genus *Fusarium* complex *solani* and *Trichoderma* spp. on *T. canis* eggs.

Acknowledgement:

The authors would like to thank CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel, Brazil) for financial support.

5. References

Araújo, J.V., Santos, M.A., Ferraz, S., 1995. Efeito ovicida de fungos nematófagos sobre ovos embrionados de *Toxocara canis*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 47, 37-42.

Araujo, J.M., Braga, F.R., Araújo, J.V., Carvalho, R.O., 2009. Atividade dos fungos nematófagos *Pochonia chlamydosporia* e *Paecilomyces lilacinus* sobre cápsulas de ovos de *Dipylidium caninum*. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 68, 488-491.

Barron, G.L., 1977. The nematode-destroying fungi. Topics in Mycobiology. Guelph: Canadian Biological Publications. 140.

Barriga, O.O., 1988. A critical look at the importance, prevalence and control of toxocariasis and the possibilities of immunological control. Vet. Parasitol. 29, 195-234.

Beaver, P. C., 1969. The nature of visceral larva migrans. J Parasitol. 55, 3-12.

Braga, FR; Araújo, JV; Campos, AK; Carvalho, RO; Silva, AR; Tavela, AO; Maciel, AS; 2007. 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. Tropic. 40, 356-358.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Araujo, J.M., Carvalho, R.O., Silva, A.R., 2008a. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. Rev. Soc. Bras. Med. Tropic. 41, 686-688.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Campos, A.K., Araujo, J.M., Carvalho, R.O., Silva, A.R., Tavela, A.O. 2008b. In vitro evaluation of the action of the nematophagous fungi

Duddingtonia flagrans, *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* on *Fasciola hepatica* eggs. World J. Microbiol. Biotechnol. 24, 1559–1564.

Braga, F.R., Araújo, J.V., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Araujo, J.M., Campos, A.K., Tavela, A.O., 2009. Ação in vitro dos fungos nematófagos *Duddingtonia flagrans* (Duddington, 1955), *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler, 1937) e *Pochonia chlamydosporia* (Gams & Zare, 2001) sobre ovos de *Eurytrema coelomaticum* (Giard & Billet, 1892). Arq. Inst. Biol., São Paulo. 76, 131-134.

Carvalho, R.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Araújo, J.M., Alves, C.D.F., 2010. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. Vet. Parasitol. 169, 123-127.

Carvalho, E.A., Rocha, R.L., 2011. Toxocariasis: visceral larva migrans in children. J Pediatr (Rio J). 87, 100-110.

Ciarmela, M.L., Minvielle, M.C., Lori, G., Basualdo, J.A., 2002. Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. Vet. Parasitol. 103, 251–257.

Ciarmela, M. L., Arambarri, A. M., Basualdo, J. A., Minvielle, M. C., 2010. Effect of saprotrophic soil fungi on *Toxocara canis* eggs. Mal. J. Microbiol. 6, 75-80.

De Hoog, G.S., Guarro, J., Gene e Figueras MJ., 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Utrecht, Holanda.

Despommier, D., 2003. Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. Clin. Microbiol. Rev. 16, 265-272.

Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H., 1995. Compendium of soil fungi. IHW-Verlag, Alemanha, 859p.

Duddington, C.L., 1955. Notes on the technique of handling predaceous fungi. Trans. Brit. Mycol. Soc. 38, 97-103.

Eapen, S.J., Beena, B., Ramana, K.V., 2005. Tropical soil microflora of spice-based cropping systems as potential antagonists of root-knot nematodes. J Invertebr Pathol. 88, 218-225.

Espinoza, Y.A., Huapaya, P.E., Roldán, W.H., Jiménez S., Abanto E.P., Rojas C.A., Cavero, Y.A., Gutiérrez C.A., 2010. Seroprevalence of human toxocariasis in andean communities from the northeast of Lima, Peru. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 52, 31-36.

Ethur, L.Z., Blume, E., Muniz, M., Silva, A.C.F., Stefanelo, D.R., Rocha, E.K., 2005. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. Fitopatol. bras. 30, 127-133.

Ferreira, P. A., Ferraz S., Lopes E.A., Freitas, L.G., 2008. Parasitismo de ovos de *Meloidogyne exigua* por fungos nematófagos e estudo da compatibilidade entre os isolados fúngicos. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas. 2,15-21.

Figueiredo, S.D., Taddei, J.A., Menezes, J.J., Novo, N.F., Silva, E.O., Cristóvão, H.L., 2005. Estudo clínico-epidemiológico da toxocaríase em população infantil. J Pediatr (Rio J).81, 126-32.

Frassy, L.N., Braga, F.R., Silva, A.R, Araújo, J.V., Ferreira, S.R., Freitas, L.G., 2010. Destruição de ovos de *Toxocara canis* pelo fungo nematófago *Pochonia chlamydosporia*. Rev Soc Bras Med Trop. 43,102-104.

Gallina, T., Silva, M.A.M.P., Castro, L.L.D., Wendt, E.W., Villela, M.M., Berne, M.E.A., 2011. Presence of eggs of *Toxocara* spp. and hookworms in a student environment in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal. 20, 176-177.

Gortari, C., Cazau, C., Hours, R., 2007. Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Rev. Iberoam. Micol.* 24, 24-28.

Gray, N.F., 1983. Ecology of nematophagous fungi: distribution and habitat. *Ann. Appl. Biol.* 102, 501-509.

Grønkvold, J., Henriksen, S.A., Larsen, M., Nansen, P., Wolstrup, J., 1996. Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet. Parasitol.* 64:47-64.

<http://pt.wikipedia.org/wiki/Pelotas#Clima>

Lysek, H., 1978. A scanning electron microscope study of the effect of an ovicidal fungus on the eggs of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology.* 77, 139-141.

Mafia, R.G., Alfenas, A.C., Maffia, L.A., Ventura, G.M., Sanfuentes, E.A., 2003. Encapsulamento de *Trichoderma inhamatum* para o controle biológico de *Rhizoctonia solani* na propagação clonal de *Eucalyptus*. *Fitopatol. bras.* 28, 101-105.

Morton, C.O., Hirsch, P.R., Kerry, B.R., 2004. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi –a review of the application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. *Nematol.* 6, 161-170.

Mota, M. A., Campos, A. K., Araújo, J. V., 2003. Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesq. Vet. Brás.* 23, 93-100.

Overgaauw, P.A.M., 1997. Aspects of *Toxocara* epidemiology: Human toxocarosis. *Crit. Rev. Microbiol.* 23, 215-231.

Patrício, F.R.A., Kimati, H., Neto, J. T., Petenatti, A., Barros, B.C., 2007. Efeito da solarização do solo, seguida pela aplicação de *Trichoderma* spp. ou de fungicidas, sobre o controle de *Pythium aphanidermatum* e de *Rhizoctonia solani* AG-4. *Summa Phytopathol., Botucatu.* 33, 142-146.

Romano, N., Nor Azah, M.O., Rahma, N., Lim, Y.A.L., Rohela, M., 2010. Seroprevalence of toxocariasis among Orang Asli (Indigenous people) in Malaysia using two immunoassay. *Trop Biomed.* 27, 585-594.

Santarém, V.A., Chesini, P.A.F., Lamers, B.E.L., Elefant, G.R., Giuffrida, R., 2011. Anti-*Toxocara* spp. antibodies in sheep from southeastern Brazil. *Vet. Parasitol.* 179, 283-286.

Santin, R.C.M., 2008. Potencial do uso dos fungos *Trichoderma* spp. e *Paecilomyces lilacinus* no biocontrole de *Meloidogyne incognita* e *Phaseolus vulgaris*. Tese de Doutorado. Programa de Pós Graduação em Fitotecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 91pp.(thesis in portuguese)

Sharif, M., Daryani, A., Barzegar, G., Nasrolahei, M., Khalilian, A., 2010. Seroprevalence of toxocariasis in schoolchildren in northern Iran. *Pak J Biol Sci.* 13, 180-184.

Sharon, E., Bar-Eyal, M., Chet, I., Herrera-Estrella, A., Kleifeld, O., Spiegel, Y., 2001. Biocontrol of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. 91, 687–693.

Sharon, E., Chet, I., Viterbo, A., Bar-Eyal, M., Nagan, H., Samuels, G.J., Spiegel, Y., 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *Eur J Plant Pathol*. 118, 247–258.

Stensvold, C.R., Skov, J., Møller, L. N., Jensen, P. M., Kapel, C.M.O., Petersen, E., Nielsen, H.V., 2009. Seroprevalence of Human Toxocariasis in Denmark. *Clin Vaccine Immunol*. 16, 1372–1373.

Tavares, A.L.C., Scaini, C.J., Müller, G., Farias, N.A.R., Berne, M.E.A., 2008. Contaminação do solo de praças de conjunto habitacionais por helmintos e protozoários em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Vitalle, Rio Grande*. 20, 59-63.

Teixeira, C.R., Chieffi, P.P., Lescano, S.A., Melo Silva, E.O., Fux, B., Cury, M.C., 2006. Frequency and risk factors for toxocariasis in children from a pediatric outpatient center in southeastern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 48, 251-255.

Windham, G.L., Windham, M.T., Williams, W.P., 1989. Effects of *Trichoderma* spp. on maize growth and *Meloidogyne arenaria* reproduction. *Plant Disease*. 73, 493-495.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos demonstram a presença de fungos com atividade ovicida em solos da região sul do Brasil (município de Pelotas, RS) sobre ovos de *Toxocara canis*. No presente estudo foram isolados, identificados e testados os seguintes fungos: *Aspergillus* spp., *Acremonium* spp., *Bipolaris* spp., *Fusarium* complexo *oxysporum*, *Fusarium* complexo *solani*, *Gliocladium* spp., *Mucor* spp. e *Trichoderma* spp. Todos os isolados demonstraram algum nível de atividade sobre os ovos embrionados de *T. canis*, porém, *Acremonium* spp., *Fusarium* complexo *solani* e *Trichoderma* spp., demonstraram resultados significativos, evidenciando assim, uma possível utilização destes no controle biológico sobre ovos de *T. canis*.

7. Anexo 1

Instructions for Authors

Manuscript submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

ReferencesCitation

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi:10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 3 kB)

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

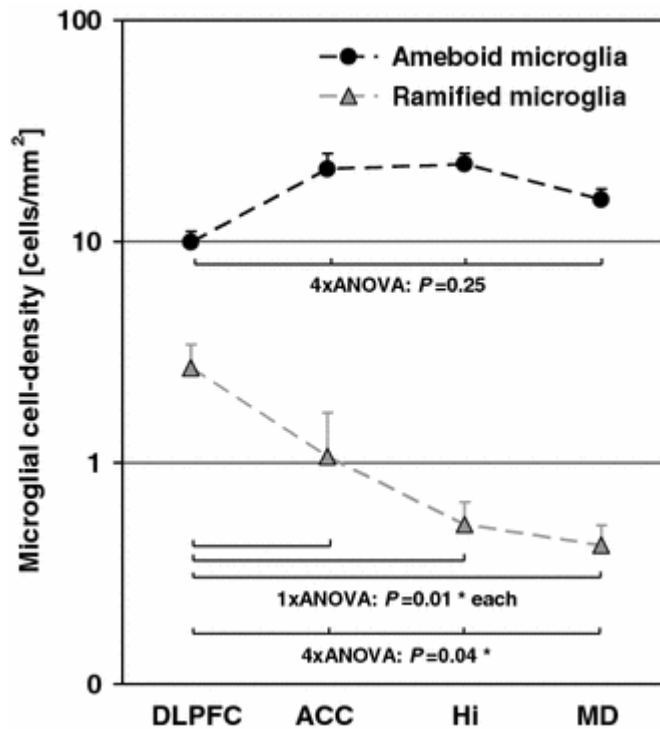
Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

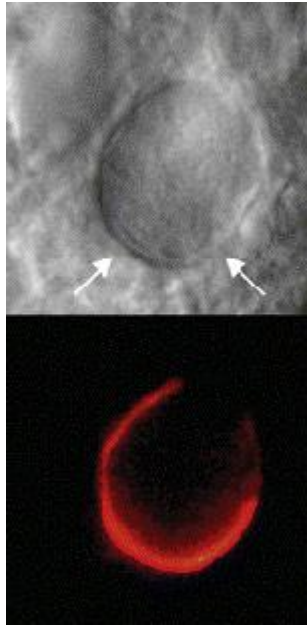
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

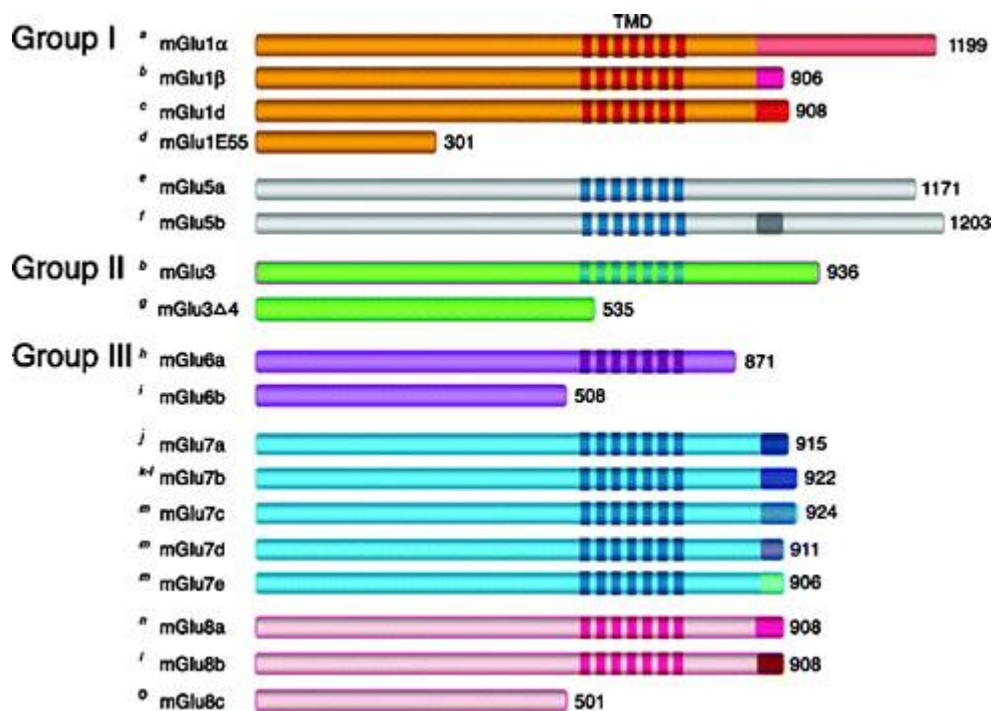


Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.

If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in:

Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

Edanz Editing Global

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

理文编辑

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

エダンズ グループ ジャパン

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

Edanz Editing Global

Integrity of research and reporting

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a declaration that the experiments comply with the current laws of the country in which they were performed. Please include this note in a separate section before the reference list.

Conflict of interest

All benefits in any form from a commercial party related directly or indirectly to the subject of this manuscript or any of the authors must be acknowledged. For each source of funds, both the research funder and the grant number should be given. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

7.1. Anexo 2

Tabela não publicada

TABELA 2- Percentual de atividade ovicida e desvios padrão dos fungos isolados do solo sobre ovos de *T. canis* nos intervalos de 7, 14 e 21 dias.

<i>Acremonium</i> spp	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	27,4 (3,3)	49,0 (1,6)	51,6 (3,7)	0,015
Efeito II**	0 (0)	4,8 (2,7)	30,2 (3,0)	0,007
Efeito III***	0 (0)	0 (0)	1,8 (0,8)	0,007
Controle	0	0	0	0
<i>Fusarium</i> complexo <i>solani</i>	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	52,0 (3,8)	59,6 (1,5)	49,0 (4,3)	0,015
Efeito II**	0 (0)	7,0 (2,0)	26,0 (3,5)	0,007
Efeito III***	0 (0)	0 (0)	4,6 (1,1)	0,007
Controle	0	0	0	0
<i>Trichoderma</i> spp.	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	64,0 (2,6)	35,2 (3,9)	30,8 (3,6)	0,007
Efeito II**	10,6 (5,9)	41,2 (6,4)	53,4 (5,1)	0,007
Efeito III***	0,2 (0,4)	3,4 (1,1)	7,8 (1,3)	0,007
Controle	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	61,4 (2,1)	36,4 (4,1)	30,4 (2,9)	0,007

Efeito II**	0,8 (1,1)	41,4 (3,5)	55,2 (2,4)	0,007
Efeito III***	0 (0)	2,0 (0,7)	3,0 (0,7)	0,008
Controle	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i>	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	67,4 (1,8)	39,2 (2,6)	38,2 (2,5)	0,019
Efeito II**	1,2 (2,2)	40,0 (2,9)	44,2 (2,8)	0,007
Efeito III***	0 (0)	0,6 (0,5)	2,0 (0,7)	0,009
Controle	0	0	0	0
<i>Fusarium complexo oxysporum</i>	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	57,4 (3,6)	59,6 (3,4)	46,8 (3,9)	0,008
Efeito II**	0,4 (0,5)	7,8 (2,3)	32,8 (3,4)	0,007
Efeito III***	0 (0)	0,2 (0,4)	4,8 (1,5)	0,009
Controle	0	0	0	0
<i>Mucor spp.</i>	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	33,2 4,(1)	42,0 (4,2)	37,2 (2,9)	0,007
Efeito II**	11,2 (2,4)	34,6 (3,4)	42,0 (3,2)	0,007
Efeito III***	0 (0)	1,6 (0,5)	5,2 (0,8)	0,008
Controle	0	0	0	0
<i>Gliocladium spp</i>	7 dias	14 dias	21 dias	p-valor
Efeito I*	55,6 (2,9)	49,0 (1,4)	42,2 (3,6)	0,007
Efeito II**	12,6 (2,1)	26,8 (1,8)	39,2 (1,6)	0,007

Efeito III***	0 (0)	0,8 (0,8)	2,0 (0 ,7)	0,029
Controle	0	0	0	0

*Efeito do tipo I, efeito fisiológico, bioquímico sem prejuízo morfológico à casca do ovo, onde observa-se hifas aderidas à casca; **Efeito do tipo II, efeito lítico com alteração da morfologia da casca e embrião do ovo, sem penetração das hifas através da casca; ***Efeito do tipo III, efeito lítico, com alteração morfológica da casca e embrião, além da penetração de hifas e colonização interna do ovo.