

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA MÉDICA E PARASITOLOGIA

Diretor: Prof. Dr. Zeferino Vaz

## AÇÃO ANTI-HELMÍNTICA DA ÁGUA 'OXIGENADA\*

(ANTI-HELMINTIC ACTION OF THE HYDROGEN PEROXIDE)

DECIO DE MELLO MALHEIRO

Assistente-Docente

O uso da água oxigenada como vermífugo, foi introduzida por BUTZ e LALAND (1934) quando fizeram experimentações "in vitro", sobre o *Ascaris lumbricooides* L., 1758, concluindo pela sua eficiência, ainda que com soluções de baixo teor (0,1%).

Outros pesquisadores, como SCHWARTZ e PORTER (1937) e WHITNEY (1939) trabalhando com essa substância, têm resultados discordantes, sobre a eficiência do produto, quando relacionado ao seu modo de agir, para os diversos grupos de vermes intestinais. À vista dos resultados discordantes de SCHWARTZ e PORTER, com aqueles de WHITNEY, no concernente ao mecanismo de ação da água oxigenada e, para tentar justamente elucidar este ponto da questão, fizeram com que ARAUJO (1942), retomasse o assunto, estudando-o com mais detalhes, após publicação de uma nota prévia que fizera com GUIMARÃES, ainda em 1942. ARAUJO procurou indagar se ocorre ação direta de  $H_2O_2$  sobre os helmintos; se o desdobramento da  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular, por efeito da catalase, criaria meio por demais oxigenado, e portanto impróprio para os helmintos e finalmente, se se trata de ação oxidante enérgica, em virtude da formação de oxigênio atômico, por efeito da peroxidase, presente normalmente no conteúdo intestinal dos animais. Como ARAUJO, em conclusão provisória, aventa a possibilidade de uma menor eficiência da água oxigenada, quando em presença de fermentos do tipo da catalase e da peroxidase, permitindo seu desdobramento antes de agir sobre os helmintos; como sugere novas experimentações para ten-

---

(\*) — Revisão da tese apresentada ao Concurso de Docência Livre de Zoologia Médica e Parasitologia, aprovada com distinção em 1955.

tar confirmar ou infirmar a hipótese emitida e, como sugere o uso de pequenas quantidades do ion CN, em doses inofensivas para os animais, mas que iria agir como catalisador negativo em face da catalase e da peroxidase, resolvemos retomar o assunto. Não será demais, citar trabalhos de LESSER (1906) sobre catalase, dizendo da ação da água oxigenada sobre o **A. lumbricoides**, porque êle tem pouca catalase e, o de LASER (1944), demonstrando que o **A. lumbricoides**, morre em uma hora, em atmosfera de O<sub>2</sub>, pelo acúmulo do peróxido de hidrogênio. O conteúdo baixo de catalase já havia sido verificado para outros helmintos parasitas, por Cooman e Van Grembergen (1942), citado por VON BRAND (1952).

Sabe-se que em presença de catalase e de peroxidase a água oxigenada age com menor intensidade. Nos casos de enterite, a catalase aumenta e a peroxidase aumenta por sua vez, na enterite hemorrágica.

A impressão que nos resta é a de que, a maneira de agir, seja inversa, conforme a espécie de helminto considerado e o teor dos fermentos do tipo da catalase, redutase e peroxidase que êles contenham.

Para uma tentativa de estudo do mecanismo de ação da água oxigenada sobre os helmintos mais comuns do cão doméstico, estabelecemos o seguinte plano de estudos:

a) evidenciar **semi-quantitativamente** a existência de enzimas nos helmintos parasitas, para posteriormente aquilatar a influência que êles possam ter sobre a água oxigenada;

b) uma vez evidenciada a ação da água oxigenada sobre os helmintos, por uma série de provas **in vitro**, verificar qual dentre os helmintos estudados sofre mais a ação dessa substância;

c) verificar, também **in vitro**, se agentes inibidores da ação desses enzimas alteram a capacidade de ação da água oxigenada; na hipótese disto se positivar, verificar se esta ação se observa **in vivo**.

Para a realização dessas provas, estabelecemos o seguinte esquema:

A) Experimentação **in vitro** com a água oxigenada.

1) Provas de sobrevivência, para verificação da resistência dos helmintos a estudar, quando fora de seu "habitat".

2) Provas para verificação do tempo de morte dos helmintos, quando colocados em contacto com a água oxigenada a 10 volumes por cento, em solução a 1%.

3) Verificação do tempo de morte dos helmintos a estudar, quando colocados em contacto com a água oxigenada a 10 volumes por cento, em solução a 1% e com traços de cianeto de potássio.

B) Evidenciar semi-quantitativamente, nos helmintos a estudar, os enzimas do tipo da **catalase**, **redutase** e **peroxidase**.

C) Em seqüência das experiências acima expostas, experimentar **in vivo**:

1) Ação do enema de água oxigenada a 10 volumes por cento, em solução a 15% \*, contra os helmintos parasitas do cão doméstico.

2) Ação do enema de água oxigenada a 10 volumes por cento, em solução a 15% e com traços de cianeto de potássio.

### MATERIAL E MÉTODOS

Para termos idéia do tempo de sobrevivência fora de sua "habitat", dos helmintos com os quais trabalhamos, fizemos algumas provas, utilizando-nos de exemplares adultos de **Ascaridia galli** (Schrank, 1783), por ser material de mais fácil obtenção.

Para tanto, escolhíamos 10 exemplares do referido parasita, colocando-os em placas de Petri contendo solução fisiológica (NaCl a 9 por mil). As placas eram colocadas em estufa a 36-37° C e a verificação de sobrevivência era feita de hora em hora. Em 7 experiências verificou-se que a **A. galli** tem, **in vitro** e nas condições referidas, uma sobrevivência que varia de 10

(\*) Concentração recomendada por ARAUJO e GUIMARÃES (1942).

a 48 horas, sendo mais freqüente a sobrevida de mais de 24 horas. Considerávamos como mortos os exemplares que não mais aparentavam movimentos nem quando excitados com um estilete metálico ou com estímulo elétrico.

Não tiveram êxito as tentativas de melhorar as condições de sobrevida *in vitro*, adicionando à solução fisiológica substâncias outras, como solução de açúcar comum a 5 por mil ou o meio de Fenwick, modificado por Ackert e col. (1948). Ao contrário, a sobrevida de *A. galli* era maior quando se utilizava somente a solução fisiológica.

Com o fim de verificar uma possível ação do cianeto de potássio sobre a sobrevida de *A. galli* várias experiências foram realizadas, mergulhando este nematóide numa mistura de 99 ml de solução fisiológica com 1 ml de uma solução de cianeto de potássio a 1%. As placas eram levadas à estufa a 36-37° C. O tempo médio de sobrevida da *A. galli* não se modificou com a adição de cianeto de potássio.

Após verificarmos a sobrevida *in vitro* em solução fisiológica pura ou quando acrescida de traços de cianeto de potássio, passamos então a experimentar, nas mesmas condições de técnica, a ação da água oxigenada quando acrescida à solução fisiológica. Experiências foram feitas também adicionando à solução fisiológica água oxigenada com cianeto de potássio, nas proporções já indicadas. O tempo de sobrevida era determinado sobre o último exemplar a apresentar movimentos, dos 10 colocados em cada placa.

Os resultados estão condensados no quadro I.

## EXPERIMENTAÇÃO E SEUS RESULTADOS

### A) EXPERIMENTAÇÃO "IN VITRO"

Como se pode verificar, é bem nítida a ação da água oxigenada *in vitro* sobre *A. galli*. Parece, mas não com muita nitidez, que a adição de cianeto de potássio acelera a ação da água oxigenada.

## QUADRO I

Ação da água oxigenada e do cianeto de potássio, *in vitro*, sobre *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) em presença e em ausência de muco intestinal.

	Solução fisiológica	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	KCN a 1% (ml)	Muco intestinal	Resultados
1	100	—	—	—	Sobrevida superior a 24 horas.
2	100	—	—	—	Sobrevida superior a 24 horas.
3	99	1	—	—	+ Morte em 1 hora e 40 minutos.
4	99	1	—	—	+ Morte em 25 minutos.
5	99	—	1	—	Sobrevida superior a 24 horas.
6	99	—	1	—	Sobrevida superior a 24 horas.
7	99	—	—	1	Sobrevida superior a 24 horas.
8	98	—	1	1	Sobrevida superior a 24 horas.
9	98	1	—	1	+ Morte em 2 horas e 5 minutos.
10	98	1	1	—	+ Morte em 24 minutos.
11	98	—	2	—	Sobrevida superior a 24 horas.
12	97	1	2	—	+ Morte em 32 minutos.
13	97	1	1	1	+ Morte em 18 minutos.

+ Morte do último exemplar.

**Técnica de avaliação semi-quantitativa da catalase, redutase e peroxidase.**

Depois de feitas experiências preliminares e de termos verificado que a quantidade de catalase presente, v. g. em *Toxocara canis* ou em *Ascaris lumbricoides*, é homóloga à encontrada em

**Ascaridia galli**, mandávamos vir diariamente e na hora da matança vísceras de frangos e de galinhas do matadouro avícola, para obtenção da **A. galli**. No laboratório obtínhamos a maior parte do material de helmintos (**Ascaridia** e **Hymenolepis**), por meio de um jacto de água passando sob pressão forte pelo intestino (ACKERT & NOLF, 1929). Em seguida, lavávamos os helmintos, assim obtidos, em solução fisiológica, conservando-os depois de limpos ainda em solução fisiológica.

Para a avaliação **semi-quantitativa** dos enzimas **catalase**, **redutase** e **peroxidase**, utilizamos técnicas já conhecidas, adaptando-as ao nosso trabalho, conforme adiante se descreve:

#### I — **Catalase**

Tomar 1 g de helmintos recentemente obtidos. Picar com tesoura histológica em gral. Adicionar 0,5 g de areia lavada, triturando a seguir, até obtenção de uma pasta. Completar o volume a 10 ml com solução fisiológica. Colocar o material assim preparado no catalasímetro, acrescentando, a seguir, 1 ml de água oxigenada a 10 volumes por cento.

O catalasímetro por nós usado foi o de Loeb (fig. n.º 1).

Feitas algumas provas preliminares, verificou-se que a leitura da prova deve ser sempre feita nos primeiros 10 minutos; verificamos também que com 1 ml de água oxigenada a 10 volumes por cento, a reação se fazia imediatamente, chegando mesmo a esgotar a água da parte graduada do aparelho; passamos então a usar apenas 0,5 ml da água oxigenada.

Para **Hymenolepis**, as primeiras provas, apesar de mostrarem reação pelo desenvolvimento de gás, deram resultados negativos, uma vez que a quantidade de gás que se formava não era suficiente para fazer baixar a coluna de água da parte alta do aparelho. Por êsse motivo, fomos obrigados a construir um pequeno aparelho baseado nos mesmos princípios que o de Loeb, dotado porém de maior sensibilidade, sendo-nos possível fazer, então, as medidas com êsse cestóide (fig. n.º 2).

O funcionamento do aparelho se faz do modo seguinte: colocar o material, preparado como vem descrito, na parte inferior do aparelho. Para êste grupo de helmintos, junta-se 1 ml

de água oxigenada a 10 volumes por cento. Fechar o recipiente inferior com a rôlha de borracha, tendo-se, porém, o cuidado de deixar aberta a torneira, para que se não faça pressão. Uma vez bem colocada a rôlha de borracha, fechar a torneira. Assim sendo, à medida que o gás se vai formando, êle vai empurrando o líquido contido no tubo em S, que contém em solução um corante, para permitir melhor visão. Ao lado do tubo em S, coloca-se uma pequena régua graduada de 10 cm, fazendo coincidir o zero da régua com o nível da solução corante contida no tubo em S quando em repouso e esta coincidência nos dará o ponto zero do aparelho. À medida que o gás se vai formando, êle tende a sair pelo tubo em S empurrando portanto o líquido corado, fazendo baixar seu nível. Após 10 minutos de reação, faz-se a leitura, multiplicando o resultado por dois, obtendo-se assim a quantidade aproximada de **catalase** em 1g de triturado do helminto. Feitas as medidas preliminares, calculamos a correspondência em ml e verificamos que, para cada três unidades da escala dêste catalasímetro modificado, havia uma correspondência em ml igual a 0.1.

## II — **Redutase**

Pesar 1 g de helminto parasita, obtido como acima foi descrito. Picar e depois triturar com areia lavada. Quando se obtiver uma pasta, completar o volume a 10 ml com solução fisiológica. Colocar o material assim preparado em tubos estéreis, fazendo-se escorrer pelas paredes 1 ml de uma solução de azul de metileno a 0,5%, solução esta obtida a partir de uma solução saturada do corante. Colocar os tubos em banho-maria, mantendo a temperatura entre 38-48° C. O tempo máximo para a leitura destas provas foi também de 10 minutos. Muitas vezes aconteceu que, mesmo antes de se levar os tubos ao banho-maria, a redução já se fazia parcial ou totalmente.

E' de se notar que, com freqüência, não nos foi possível demonstrar a presença de **redutase** em **Hymenolepis**.

## III — **Peroxidade**

Triturar em gral 1 g de helminto recentemente obtido, ajuntando-se 0,5 g de areia lavada. Adicionar 1 ml de solução

fisiológica e quando o material estiver quase pastoso adicionar mais:

a) 1 ml de uma solução de pirogalol a 2%:

b) 1 ml de uma solução de água oxigenada a 10 volumes por cento, a 20%.

A seguir deixar tudo em contacto pelo espaço de um minuto e então adicionar 15 ml de álcool absoluto. Depois de tudo bem misturado, filtrar o material assim obtido, em papel de filtro. A leitura é feita imediatamente no colorímetro de Helligé, usando-se como solução padrão a purpurogalina em solução alcoólica a 0.020 por mil. Depois de algumas provas preliminares, reduzimos a solução padrão à metade, ou seja, solução alcoólica a 0.010 por mil, percentagem que verificamos ser melhor para o tipo de material com que trabalhamos. O restante da técnica usada, tanto para as leituras como para os cálculos, foi feito de acôrdo com o que refere MUCCIOLLO (1941), para a dosagem de **catalase** e de **peroxidase** do leite.

Os resultados obtidos da avaliação semi-quantitativa da **catalase**, **redutase** e **peroxidase** estão resumidos nos quadros II, III e IV.

## QUADRO II

MATERIAL — *Ascaridia galli* (Schrank, 1788), de *Gallus gallus domesticus*.

Medidas semi-quantitativas de **Catalase**, **Redutase** e **Peroxidase**.

	Catalase (10')	Redutase (10')	Peroxidase
1	3.5	Positiva	0.0040
2	4.5	"	0.0022
3	3.5	"	0.0045
4	4.5	"	0.0022
5	3.5	"	0.0032
6	5.0	Negativa	0.0061
7	3.0	Positiva	0.0056
8	4.0	"	0.0027
9	3.5	"	0.0024
10	3.0	"	0.0033
11	3.5	"	0.0028
12	1.5	"	0.0046
13	3.0	"	0.0042
14	3.5	"	0.0032
15	0.5	"	0.0029
16	4.5	"	0.0081
17	3.5	"	0.0027
18	5.5	"	0.0047
19	3.5	"	0.0051
20	3.5	"	0.0027
21	3.0	"	0.0035
22	1.5	"	0.0032
23	3.5	"	0.0054
24	2.5	"	0.0038
25	3.5	"	0.0042
26	3.5	"	—
27	4.0	"	—
28	3.0	—	—
29	3.5	—	—
30	3.5	—	—
31	2.5	—	—
32	3.0	—	—
33	3.5	—	—
34	5.0	—	—

## QUADRO III

MATERIAL — *Hymenolepis* sp. de *Gallus gallus domesticus*.  
Medidas semi-quantitativas de **Catalase**, **Redutase** e **Peroxidase**.

	CATALASE		REDUTASE	PEROXIDASE
	Unidades do catalasímetro modificado (10') *	Correspondência em ml de O <sub>2</sub>	10'	Colorímetro de Helligé
1	2.0	0.066	Negativa	0.0048
2	6.0	0.2	Negativa	0.0032
3	2.0	0.066	Negativa	0.0039
4	4.0	0.133	Negativa	0.0032
5	2.0	0.066	Negativa	0.009
6	Negativa	Negativa	Negativa	0.0023
7	0.4	0.0134	Negativa	0.0013
8	Negativa	Negativa	Negativa	0.0064
9	Negativa	Negativa	Negativa	0.0063
10	5.0	0.167	—	0.0075
11	2.0	0.066	—	—
12	3.0	0.1	—	—
13	2.0	0.066	—	—

(\*) Cada 3 unidades do catalasímetro modificado correspondem, segundo determinados, a 0,1 ml de O<sub>2</sub>.

Apenas para comparar resultados de **catalase** e de **peroxidase**, fizemos umas poucas provas com helmintos de outras espécies parasitas e de outros hospedeiros. No quadro IV, condensamos os resultados obtidos, respeitando a ordem seguinte:

**Catalase:**

- 1 prova com *Hymenolepis* sp., obtido de rato de esgôto;
- 1 prova com *D. caninum*;
- 2 provas com *Eurytrema coelomaticum* (Giart & Billet, 1892), material de bovino.
- 4 provas com *Ancylostoma caninum*.

**Peroxidase:**1 prova com **E. coelomaticum**;1 prova com **A. caninum**.

QUADRO IV

1) <b>Hymenolepis</b> sp.	(Catalasímetro modificado)
Catalase em 10' — 1.5	igual a 0.1 em ml de O <sub>2</sub>
2) <b>Dipylidium caninum</b>	(Catalasímetro modificado)
Catalase em 10' — 0.75	igual a 0.1 em ml de O <sub>2</sub>
3) <b>Eurytrema coelomaticum</b>	
Catalase em 10' — 0.50 ml de O <sub>2</sub> (Loeb)	
" " 10' — 0.75	
Peroxidase — 0.018	
4) <b>Ancylostoma caninum</b>	
Catalase em 10' — 3.5 (Loeb)	
" " 10' — 3.0	
" " 10' — 3.0	
" " 10' — 4.0	
Peroxidase — 0.045	

Devemos notar que para as provas realizadas com **Hymenolepis**, **Dipylidium** e **Eurytrema** também utilizamos 1 g de helminto, ao passo que para **Ancylostoma caninum**, em virtude de sua pequena dimensão e pouco pêso, trabalhamos com apenas 0,1 g.

Dos resultados obtidos verifica-se que o **A. caninum** é muito mais rico de **catalase** e de **peroxidase** do que os demais helmintos por nós estudados.

A quantidade de **catalase** em **A. caninum** é cerca de dez vezes maior que a encontrada em **A. galli** e, a de **A. galli** é cerca de 25 vezes maior que a encontrada nos cestóides por nós estudados.

## B) EXPERIMENTAÇÃO "IN VIVO"

### **Ação da água oxigenada e da água oxigenada com traços de cianeto de potássio, "in vivo" com uma só aplicação, sobre helmintos intestinais do cão doméstico**

Tendo em vista os resultados obtidos nas experiências **in vitro**, sobre **Ascaridia galli**, resolvemos experimentar a água oxigenada como anti-helmíntico, **in vivo**.

Tomamos então 36 cães, vindos do Depósito Municipal da Prefeitura, os quais foram numerados e deixados, 18 em cada canil, recebendo a mesma alimentação e nas mesmas condições de ambiente, durante quatro dias. Após êsse tempo, sorteamos os cães, para organizar três lotes de 12 animais. Os do primeiro lote serviram como testemunhos. Os animais do segundo lote receberam por enema 500 ml de água oxigenada de dosagem volumétrica conhecida, em solução a 15%. Os animais do terceiro lote receberam também 500 ml de água oxigenada, nas mesmas condições já referidas, adicionados de 1 ml de cianeto de potássio a 1%. A adição do cianeto de potássio ao enema feito nos animais do terceiro lote teve como finalidade verificar se a droga iria, também **in vivo**, agir como inibidor da **catalase** e impedir o desdobramento da água oxigenada antes desta entrar em ação. A dosagem volumétrica percentual da água oxigenada por nós usada, foi, em média, igual a 9,71 volumes por cento. De cada partida, tirávamos uma amostra da água oxigenada para a feitura da dosagem volumétrica e os resultados obtidos foram os seguintes: 9,73 — 9,73 — 9,71 — 9,60 — 9,70 e 9,59 volumes por cento. A solução de cianeto de potássio empregada foi sempre de preparação recente.

Fazíamos a seguir exame rigoroso do tubo intestinal, dividindo o delgado em três porções mais ou menos iguais e atendendo principalmente para o ceco no intestino grosso.

Os parasitas encontrados eram separados por gênero e contados. Os animais testemunhos serviam para nos dar o número de parasitas possível de ser encontrado nas infestações naturais reveladas pelo exame das fezes. Ao sacrificar os que haviam recebido os enemas de água oxigenada e de água oxigenada com

traços de cianeto de potássio, tínhamos em mente, fazendo-se a pesquisa e a contagem dos helmintos encontrados, comparar o número médio deles, com o número médio revelado pelos animais testemunhos. Naturalmente, não são dados absolutamente seguros, uma vez que, por fatores vários, os helmintos podem abandonar o meio em que se encontram, não só nos animais testemunhos, como também naqueles que tenham recebido o enema com as drogas, sem que isto tenha acontecido por efeito delas.

Da literatura sabemos que das várias pesquisas realizadas resulta que a postura de uma fêmea de *Ancylostoma caninum*, v. g., é de cerca de 4.700 a 11.300 ovos diários, sendo em média igual a 8.000. A postura por fêmea baixa quanto maior fôr o número de fêmeas em parasitismo e, inversamente, aumenta quando o número de fêmeas diminui.

Segundo trabalhos de PETERS, LEIPER & CLAPHAM, realizados em 1941, vemos que êsses AA. demonstram a ineficácia do exame das fezes, antes e depois do tratamento, como meio de contrôle da ação anti-helmíntica dos vermífugos.

LEIPER & PETERS, em 1941, trabalhando com carneiros, concluem que o estudo da avaliação do pêso dos hospedeiros é um critério mais sensível na avaliação da ação vermífuga da fenotiazina, do que a contagem de ovos antes e depois do tratamento.

SPPEDING, em 1953, mostra que, com relação às fezes de carneiro, a variação do número de ovos é alta demais, hora a hora, dia a dia, para que se possa confiar em simples exames quantitativos. A própria amostra de fezes apresenta variações muito grandes, de porção a porção.

GIBSON, em 1953, verifica que, às doses de fenotiazina, segue-se um período em que a contagem dos ovos cai a zero, subindo depois gradativamente. Cavalos mantidos em condições de não reinfestação por cerca de três anos, durante os quais foram medicados até oito vezes com fenotiazina (30 g), e êsse fenômeno se repetiu, no fim dos três anos, quando sacrificados. continham algumas centenas de parasitas cada um. Essa observação foi feita entre nós por VAZ & FRANCO ROCHA (1948),

QUADRO V

Número de vermes encontrados nas necrópsias dos 36 cães da experiência n.º 1.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>				H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + KCN				Testemunhos			
Cão n.º	A.	T.	D.	Cão n.º	A.	T.	D.	Cão n.º	A.	T.	D.
11	38	8	0	38	112	0	28	18	21	14	0
26	27	10	2	14	16	11	0	30	114	1	0
35	0	26	0	31	2	7	0	29	50	0	3
27	1	1	1	17	33	0	0	36	73	2	2
40	0	4	0	13	0	8	0	39	26	38	22
34	1	0	0	47	4	0	0	25	42	0	0
8	3	2	0	24	0	8	0	43	58	24	0
41	217	5	5	45	0	2	0	33	5	10	2
15	5	8	0	44	4	3	0	10	114	4	0
37	0	0	0	28	18	1	0	7	13	7	0
42	229	15	0	12	2	0	0	32	1	13	8
16	24	2	1	46	0	0	0	48	28	12	10
Soma	545	81	9		191	40	28		545	125	47
Média	45.4	6.7	0.7		15.9	3.3	2.3		45.4	10.4	3.9
D. P.	84.0	7.6	1.5		31.9	4.0	8.1		38.5	11.2	6.6
C. V. %	185.0	113.4	214.3		200.6	121.2	352.2		84.8	107.7	169.2

Notações — A. = **Ancylostoma**  
 T. = **Trichuris**  
 D. = **Dipylidium**  
 D.P. — desvio padrão

quando em Araçatuba (Estado de São Paulo — Brasil), trabalhando com fenotiazina em centenas de bovinos, tiveram também a oportunidade de encontrar infestações maciças em animais tratados e cujos exames de fezes estavam negativos.

Para controle do efeito dos enemas feitos nos nossos animais de experiência, o sacrifício deles se impunha, uma vez que o simples exame de fezes para pesquisa de ovos dos parasitas após os enemas, poderia não dar as indicações de que necessitávamos. Todos os animais foram por isso sacrificados, oito dias após a administração do enema.

Para melhor clareza, condensamos os resultados das nossas experimentações no quadro V.

Para as comparações (test "t") das médias dos números de helmintos de cada um dos gêneros supra, colhidos em animais tratados e em testemunhos, verificamos que, para que os resultados fôssem significanets, o valor de "t" deveria ser igual ou maior que 2,074. Destas comparações vimos que o resultado se aproximou da significância, no nível de 5% ("t" = 2,049), para *Ancylostoma* sp., enquanto atingiu o limite de significância, no nível de 5% ("t" = 2,088), para *Trichuris* sp. Estes resultados foram obtidos quando comparamos animais tratados com **água oxigenada contendo traços de cianeto de potássio e os testemunhos**. Com a água oxigenada sem cianeto de potássio, os resultados foram não significantes.

#### **Experiências com três aplicações de água oxigenada sobre helmintos do cão doméstico**

Pela grande variabilidade no número de helmintos encontrados nas necrópsias dos 36 cães da experiência n.º 1 e porque, mesmo entre os testemunhos, encontramos em alguns tão poucos parasitas, resolvemos fazer mais uma experimentação, como segue:

Tomamos 15 cães e os colocamos nas mesmas condições que os da experiência anterior. Depois de quatro dias, sorteamos os animais, que passaram a constituir três lotes de cinco animais cada um. Os do primeiro lote serviram como testemunhos. Os animais do segundo lote receberam 500 ml de água oxige-

nada, de concentração volumétrica de oxigênio conhecida, em solução a 15%, sob a forma de enema. Os do terceiro lote receberam também 500 ml de água oxigenada nas mesmas condições acima referidas, aos quais adicionamos 1 ml de cianeto de potássio a 1%.

Fizemos três enemas para cada animal, com espaço de quatro dias entre cada aplicação. Sacrificamos os animais 24 horas após o último enema. Os resultados desta nova série encontram-se condensados no quadro VI.

Nas mesmas condições usadas para os animais da experiência n.º 1, para as comparações das médias do número de helmintos de cada um dos gêneros supra, helmintos colhidos em animais tratados e em testemunhos (teste "t"), verifica-se que para que os resultados fôsem significantes, o valor de "t" deveria ser igual ou maior que 2,306.

O único resultado que chegou ao limite de significância ao nível de 5% ("t" = 2,326) nos foi dado por *Ancylostoma* sp., quando comparamos animais tratados com água oxigenada e os testemunhos. Nas demais comparações, inclusive aquelas que compreendiam tratamentos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais KCN, os resultados foram não significantes.

Com a finalidade de verificar se a água oxigenada e a água oxigenada adicionada de traços de cianeto de potássio agia diferentemente sobre machos e fêmeas e sobre vermes de idades diferentes, fizemos a contagem de machos e fêmeas de *Ancylostoma caninum*, colhidos em todos os animais da experiência n.º 1, num total de 1.217 exemplares, e os medimos um a um, com um curvímeter, após projetá-los em tela de projeção, com **Epidiascópio Zeiss**, segundo técnica original de FRANCO ROCHA (1954).

Resumimos abaixo a técnica de mensuração adotada:

- 1) Fixação dos helmintos em formol acético.
- 2) Colocar de 10 a 20 exemplares em lâmina de vidro, recobrando-os com uma lamínula e adicionando por capilaridade quantidade suficiente de solução fisiológica.

QUADRO VI

Número de vermes encontrados nas necrópsias dos 15 cães da experiência n.º 2.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + KCN			Testemunhos					
Cão n.º	A.	T.	D.	Cão n.º	A.	T.	D.	Cão n.º	A.	T.	D.
29	116	0	4	41	105	19	6	44	156	0	0
32	0	0	0	37	1	0	0	15	105	14	4
24	0	0	0	30	107	0	4	48	61	16	21
16	1	3	0	28	0	0	0	13	81	19	11
43	0	0	0	39	6	0	0	40	56	24	1
Soma	117	3	4		219	19	10		459	73	37
Média	23.4	0.6	0.8		43.8	3.8	2.8		91.8	14.6	7.4
D. P.	51.7	1.3	1.8		56.8	8.5	2.8		40.7	9.0	8.7
C. V. %	220.9	216.7	225.0		129.7	223.7	140.6		44.3	61.6	117.6

Notações — A. = **Ancylostoma**  
 T. = **Trichuris**  
 D. = **Dipylidium**  
 D.P. = desvio padrão  
 C.V. = coeficiente de variabilidade

QUADRO VII

Frequência de representantes de cada sexo nos vermes ancilostomídeos,  
encontrados nos cães de cada lote da experiência n.º 1.

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>			H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + KCN			Testemunhos		
Cão n.º	F.	M.	Cão n.º	F.	M.	Cão n.º	F.	M.
41	123	85	38	68	37	25	28	11
42	140	74	12	2	1	30	75	37
11	25	11	28	15	3	10	74	44
26	13	7	17	26	5	29	26	21
37	0	0	14	13	3	7	8	3
8	4	0	44	2	2	18	15	4
27	0	1	31	2	0	43	33	25
15	2	2	47	4	0	39	17	8
34	1	0	46	0	0	48	22	5
16	19	5	13	0	0	36	46	24
35	0	0	24	0	0	33	1	4
40	0	0	45	0	0	32	1	0
Totais	317	185		132	51		346	186

Notações — F. = fêmeas  
M. = machos

3) Levar a lâmina assim preparada com o material ao **Epidiascópio** previamente ajustado para um aumento de 10 diâmetros, fazendo-se a seguir a projeção da imagem dos helmintos em tela de projeção.

4) Medir a imagem sobre a tela de projeção com um "curvímetro", de cartografia e dividir o resultado por 10.

Os tamanhos máximo e mínimo, para adultos de **Ancylostoma caninum**, dados por quatro autores, vêm expressos no quadro VIII.

QUADRO VIII

	Machos	Fêmeas
Neveu-Lemaire	9 — 12 mm	9 — 21 mm
Morgan & Hawkins	9 — 12 mm	15 — 21 mm
Mönning	10 — 12 mm	14 — 16 mm
Cesar Pinto	10 — 12 mm	14 — 16 mm

As medidas por nós obtidas e feitas pelo "curvímetro", como atrás vêm descritas, estão condensadas no quadro IX, sendo os limites inferior e superior, respectivamente: machos = 4 — 15 mm; fêmeas = 3 — 16 mm.

QUADRO IX

	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + KCN		Testemunhos	
	De 9 mm para cima	Com menos de 9 mm	De 9 mm para cima	Com menos de 9 mm	De 9 mm para cima	Com menos de 9 mm
Machos	69	114	25	26	105	81
Fêmeas	365	73	87	43	317	16

Os machos foram medidos desde a extremidade anterior até ao cône genital.

As diferenças obtidas quando comparamos a ação da água oxigenada e da água oxigenada com cianeto de potássio, sobre **ancilostomídeos** machos e fêmeas e de tamanhos diferentes, colhidos nas necrópsias dos cães da experiência n.º 1, **também foram não significantes.**

O motivo da escolha de **ancilostomídeos** dos cães de experiência, para interpretação da possível influência da ação da água oxigenada e da água oxigenada com cianeto de potássio em relação ao sexo e ao tamanho dos vermes colhidos nas necrópsias dos cães da experiência n.º 1, foi devido ao fato de serem sempre os mais numerosos e por sua localização se fazer mais alta no intestino.

## DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### A) PROVAS "IN VITRO"

Apesar de os dados referentes às provas **in vitro** não obedecerem o rigor quantitativo, uma vez que as provas foram semi-quantitativas, foi nossa intenção dar valores que pudessem ser ao menos comparados entre si. Quando encontramos referências relativas à quantidade de enzimas, principalmente do tipo da **catalase**, são elas sempre expressas como "**os ascarídeos têm pouca catalase; os vermes como a Taenia pisi-formes e a Fasciola hepática têm teor muito baixo de catalase**". Não nos cabe discutir o mérito de tais afirmativas, ditadas pela prudência. Fazendo, porém, numerosas provas para evidenciar a quantidade de enzimas do tipo de **catalase**, da **redutase**, e da **peroxidase** e, obtendo valores de provas feitas semi-quantitativamente, julgamos poder, a **simples título de comparação**, lançar mão desses valores, para dizer, v. g., que os **ascarídeos têm pouca catalase**, em média 3,35 unidades do catalasímetro de Loeb, enquanto os **cestóides** acusam um **teor baixo** desse enzima, em média 0,51 unidades.

Ao fazermos o estudo comparativo do teor de **catalase**, de **redutase** e de **peroxidase** de helmintos parasitas, englobando os cestóides (**Dipylidium** e **Hymenolepis**), os trematóides **Eu-**

**rytrema**), os nematóides (**Ascaridia**, **Ascaris**, **Ancylostoma**).  
pudemos verificar o seguinte:

a) **Proporcionalmente aos valores relativos expressos**, os trematóides e os cestóides são os que têm **teor mais baixo de catalase**. Encontramos a seguir os nematóides não sugadores de sangue, com cêrca de duas vêzes e meia mais **catalase** e, finalmente, os nematóides sugadores de sangue, nos quais a quantidade é proporcionalmente **muito maior** (cêrca de dez vêzes mais).

b) Julgamos poder afirmar que a **redutase** está sempre presente nos nematóides, não acontecendo o mesmo para os cestóides (**Hymenolepis**), uma vez que as provas realizadas foram sempre negativas para êstes helmintos.

c) Pelo estudo dos dados colhidos após leituras colorimétricas (colorímetro de Hellige), encontramos valores aproximados de **peroxidase** em nematóides não sugadores de sangue (**Ascaridia**) e em cestóides (**Hymenolepis**). Os maiores valores foram: **Trematoda (Eurytrema)** e **Nematoda** sugadores de sangue (**Ancylostoma**).

Seria temerário avançar que, ao medirmos a **catalase** e a **peroxidase** de **Eurytrema** e de **Ancylostoma**, estivéssemos medindo não apenas o enzima dêsses helmintos, mas também o do sangue que êles pareciam conter, uma vez que não dispúnhamos, no momento, de meios para essas determinações.

Nessas condições, parece-nos possível admitir que, pelo menos **in vitro**, quanto menor seja o teor de enzimas do tipo de **catalase** e da **peroxidase**, encontrados nos helmintos por nós estudados, mais sensíveis êles se mostram aos efeitos da água oxigenada.

Relativamente à potencialização do efeito da água oxigenada, quando se usa um veneno da **catalase**, que iria agir como catalisador negativo, verificamos que êste fato se dá **in vitro**, em tôdas as placas. Acontece, porém, que, nas placas onde colocamos uma certa porção de muco do próprio intestino, a morte ocorria em espaço de tempo mais curto.

Parece-nos permitido indicar que a ação da água oxigenada **in vitro** depende dos enzimas **catalase** e **peroxidase**, seu efeito se fazendo sentir na razão inversa da quantidade dêles e não pelo desdobramento da água oxigenada.

### B) PROVAS "IN VIVO"

Ao analisarmos os dados obtidos com as experiências n.ºs 1 e 2, cujos resultados se encontram condensados nos quadros V e VI, verificamos, de imediato, a grande variabilidade do número de vermes na luz do intestino, quer nos animais que serviram como testemunhos, quer naqueles que foram tratados com água oxigenada e com água oxigenada contendo traços de cianeto de potássio. Essa grande variabilidade poderia talvez indicar o porquê de não resultarem significantes as diferenças entre as médias obtidas, quando comparados os resultados entre as médias do número de vermes encontrados nos animais que serviram como testemunhos, com as do número de vermes encontrados nos animais que haviam sido tratados, bem como entre as médias do número de vermes encontrados nos animais que haviam recebido seja água oxigenada, seja água oxigenada com cianeto de potássio. Como trabalhamos com animais que sofreram infestação natural a aplicação do teste de heterogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) revelou que as variâncias de algumas populações (quadros V e VI) se mostraram, quando cotejadas, **significantes**, prejudicando ou mesmo anulando a validade do teste "t".

Na experiência n.º 1, para que os resultados fôssem significantes, o valor de "t" deveria ser igual ou superior a 2,074. Da comparação, vimos que o resultado se aproximou da significância ao nível de 5% ("t" = 2,049), para **Ancylostoma** sp., enquanto atingiu o limite de significância ao nível de 5% ("t" = 2,088) para **Trichuris** sp. quando comparamos **animais tratados com água oxigenada contendo traços de cianeto de potássio, com os animais que serviram como testemunhos**.

Na experiência n.º 2, o valor de "t" deveria ser igual ou superior a 2,306. O único resultado que atingiu o limite de significância ao nível de 5% ("t" = 2,326) nos foi dado por **Ancy-**

**lostoma** sp., quando comparamos **animais tratados com água oxigenada e os testemunhos**.

Nas demais comparações feitas nas duas experiências, os resultados **foram não significantes**. É preciso, também (e isto se verifica ao estudarmos o conteúdo dos quadros V e VI), levar em linha de conta que, ao lado de resultado praticamente negativo (cão testemunho n.º 32), com apenas um exemplar de **Ancylostoma** sp., encontramos animais tratados que, após a necrópsia, não apresentavam nenhum exemplar desse parasita (quadro V — caes n.ºs 35, 40 e 37, dos tratados com água oxigenada, e cães n.ºs 13, 24, 45 e 46, dos tratados com água oxigenada contendo traços de cianeto de potássio).

A fim de verificar se havia ação diferente da água oxigenada e da água oxigenada com traços de cianeto de potássio, sobre machos e fêmeas de idades diferentes, dos vermes **ancilostomídeos** colhidos nos animais da experiência n.º 1, fizemos a contagem dos vermes colhidos, separando-os em sexos e medindo-os segundo técnica descrita (pág. 35) e cujos resultados condensamos no quadro IX. As diferenças obtidas quando comparamos a ação das substâncias em experiências, sobre sexo e tamanho dos **ancilostomídeos** colhidos dos animais da experiência n.º 1, **também foram não significantes**.

A análise estatística dos resultados obtidos nas provas que visavam esclarecer a ação da água oxigenada e da água oxigenada contendo traços de cianeto de potássio, tanto sobre os vermes mais comuns do cão doméstico, como sobre sexo e tamanho dos **ancilostomídeos** colhidos nos animais da experiência n.º 1, não nos permitiu concluir se essas substâncias são ou não eficientes como anti-helmíntico.

Como se pode inferir dos diversos dados colhidos na literatura, quando se fazem estudos experimentais de helmintologia, particularmente para avaliar a ação de anti-helmínticos, depara-se com a variabilidade do número de vermes encontrados nos animais testemunhos, como um entrave para a interpretação dos resultados. Vários fatores interferem nas infestações experimentais, não permitindo, muitas vezes, que se dê uma interpretação satisfatória dos fenômenos observados. Um dos fa-

tôres importantes diz respeito à resistência individual do hospedeiro e, ao lado dêle, segundo CULBERTSON (1941), devemos ainda considerar a idade, o sexo, a alimentação, o estado de saúde e a existência de parasitismo, por helmintos parasitas de grupos diferentes.

Êstes fatôres, já evidentes nas infestações experimentais, talvez se mostrem ainda mais acentuados nas infestações naturais, particularmente se considerarmos que os nossos animais de experiência eram cães de rua, nos quais o patrimônio genético é de uma heterogeneidade marcante.

### CONCLUSÕES

A análise, discussão e interpretação dos resultados experimentais conduzem a uma série de conclusões, que passamos a relatar, separando, para maior clareza, as referentes às provas **in vitro** daquelas relativas às provas **in vivo**.

#### PROVAS "IN VITRO"

- 1) É nítida a ação da água oxigenada **in vitro** sobre **Ascaridia galli**.
- 2) Determinações semi-quantitativas de **catalase**, **redutase** e **peroxidase** em helmintos indicam que os **Nematoda** são mais ricos que os **Cestoda**, sendo que, dos primeiros, os hematófagos são mais ricos que os não hematófagos.
- 3) Há indicação de que a ação anti-helmíntica da **água oxigenada in vitro** é inversamente proporcional à concentração daqueles enzimas nos helmintos com os quais é posta em contacto.
- 4) Há também indícios de que o **cianeto de potássio** reforça **in vitro** a ação anti-helmíntica da **água oxigenada**.

#### PROVAS "IN VIVO"

- 1) Os cães de rua da cidade de São Paulo apresentam infestação natural por **Ancylostoma caninum** (Ercolani, 1859), **Frichuris vulpis** (Froelich, 1789), **Dipylidium caninum** (L.,

1758), com grande variabilidade numérica de indivíduo para indivíduo.

2) Esta grande variabilidade condiciona um erro residual elevado na análise, dificultando a obtenção de significância estatística nas comparações entre grupos de animais tratados e não tratados.

3) Das experiências realizadas, não se pode afirmar a eficiência da ação anti-helmíntica da água oxigenada, mesmo quando adicionada de cianeto de potássio, sobre helmintos intestinais do cão doméstico.

### SUMMARY

The action of  $H_2O_2$  on helminth with poor degree of catalase was already mentioned by BUTZ and LALAND (1934), SCHWARTZ and PORTER (1937) WHITNEY (1939), ARAUJO and MACHADO GUIMARÃES (1942), ARAUJO (1942), and LASER (1944). The latter has demonstrated that the *Ascaris lumbricoides* dies in one hour in an atmosphere of  $O_2$ , because of the forming hydrogen peroxide.

Our own investigations, trying to explain the action of  $H_2O_2$  on the canine helminthiasis, were done as follows:

#### A — Experiments *in vitro*:

- 1) Behavior of the helminths out of their habitat.
- 2) Behavior of the helminths when in contact with an 1%  $H_2O_2$ , 10 volumes, solution.
- 3) Behavior of the helminths when in contact with an 1% 10 volumes solution, with traces of potassium cyanide.

#### B — Half-quantitative searching of enzymes — catalase, reductase and peroxydase in the helminths.

#### C — Experiments *in vivo*:

- 1) Action of the 15%  $H_2O_2$  10 volumes solution on the canine helminthiasis.
- 2) Action of the 15%  $H_2O_2$  10 volumes solution with traces of potassium cyanide on the canine helminthiasis.

### EXPERIMENTS "IN VITRO"

To test the behavior of the helminths out of their own habitat. *Ascaridia galli* (Schrank, 1788) were put in saline solution in an oven at 36°-37° C. They were checked every each hour and those which did not respond to mechanical or electrical stimulation were considered dead.

The results were not satisfactory because they died easily, even if the saline solution was enriched by saccharose 5/1000 or by "Fenwick" modified by Ackert et al (1948).

Using saline solution (99 ml) with 1 ml of a 1% solution of potassium cyanide, the time of death remained the same as in the former test, but different results were obtained using saline solution (99 ml) with 1 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volumes, or saline solution (98 ml) with 1 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> volumes 1% and 1 ml of 1% potassium cyanide solution (see table I).

### HALF-QUANTITATIVE SEARCHING OF ENZYMES

As the amount of catalase in *Toxocara canis* or in *Ascaris lumbricoides* is equivalent to that of *Ascaridia galli*, chicken helminths were used by convenience, chiefly *Ascaridia* and *Hymenolepis*. They were treated by ACKERT and NOELF (1929) technique and kept in saline solution.

For the catalase, redutase and peroxydase searching, the general techniques were used, sometimes slightly modified.

**CATALASE** — 1 gr of helminth was cut into little pieces and mixed with 0.5 gr of washed sand in order to form a paste, to which was added saline solution until a volume of 10 ml. To this material, after being in the catalasemetre of Loeb was added 0.5 ml of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 volumes.

While searching the catalase of *Hymenolepis*, a more sensible catalasemetre had to be built (Fig. 2).

The results are shown in tables II, III and IV.

**REDUTASE** — The material was prepared as for the catalase test. To the 10 ml of saline solution which contains the helminth extract, and is kept in a steril tube, 2 ml of liquid

vaseline is added and then 1 ml of a 0,5% solution of methylene blue is gently powdered in. The steril tube remains in hot water at 38°-40° C for 10 minutes. The results are shown in tables II and III.

**PEROXYDASE** — 1 gr of helminth cut into little pieces is mixed with 0,5 gr of washed sand and 1 ml of saline solution in order to form a past, to which are added 1 ml of a 2% pyrogallol solution and 1 ml of a 20%  $H_2O_2$  10 volumes solution. After 1 minute, 15 ml of absolute alcohol are added and well mixed. Immediately after filtering the material is checked in a Hellingé colorimetre using as basic solution purporogalin 0.010-1000. The next steps were the same as used by MUCCIOLO (1941) while testing the milk peroxydase. The results are in tables II, III and IV.

#### EXPERIMENTS "IN VIVO"

Fifty one dogs were used; 36 in a first test and 15 in a second, all under the same experimental and maintenance conditions.

The first 36 animals were separated into three groups from which 12 remained as testimony; 12 received 500 ml of a 15%  $H_2O_2$  10 volumes solution (one dosis each) and 12 received 500 ml of a 15%  $H_2O_2$  10 volumes solution with 1 ml of 1% potassium cyanide (one dosis each).

After eight days all 36 animals were killed and examined, because just fezes examinations would not be absolute as demonstrated by PETERS, LEIPER and CLAPHAM (1941); LEIPER and PETERS (1941); VAZ and FRANCO ROCHA (1948); SPEDING (1953) and GIEBSON (1953).

The other 15 animals were also separated into three groups: 5 testimony dogs; 5 which received 500 ml of a 15%  $H_2O_2$  10 volumes solution (3 dosis, one every 4th day); and 5 which received 500 ml of a 15%  $H_2O_2$  10 volumes solution with 1 ml of potassium cyanide 1% (3 dosis, one every 4th day).

Twenty four hours after the last dosis all 15 animals were killed and examined. The findings of the 51 tested dogs are shown in tables V and VI.

In order to check if there was any difference in the action of hydrogen peroxide and hydrogen peroxide with traces of potassium cyanide on the different ages, males and females of **Ancylostoma caninum**, 1217 parasites from 36 of the first dogs were measured by FRANCO ROCHA (1954) technique using a Zeiss epidiascope. The results are shown in tables VII and IX.

### CONCLUSIONS

- 1) The action of hydrogen peroxide **in vitro** on **Ascari- dia galli** is evident.
- 2) Considering the half-quantitative search of enzymes, the **Cestoda** has less catalase, redutase and peroxydase than the **Nematoda**, and among the latter, the non hematophagous have less than the hematophagous.
- 3) It seems that the action of hydrogen peroxide on helminths, **in vitro**, is inversely proportional to their enzyme amount.
- 4) It seems too, that the potassium cyanic reinforces, **in vitro**, the action of  $H_2O_2$  on helminths.
- 5) Most of the canine population of São Paulo shows a natural infestation by **Ancylostoma caninum** (Ercolani, 1859), **Trichuris vulpis** (Froelich, 1789) **Dipylidium caninum** (L., 1758), with great numeric variability from one dog to another.
- 6) The numeric variability determines such an analytical error, that it is difficult to compare the statistical significance between the treated and non treated animals.
- 7) The efficiency of  $H_2O_2$ , even with traces of potassium cyanide, in the treatment of canine helminthiasis is not absolute.

### BIBLIOGRAFIA

- ACKERT, J. E. & NOLF, L. O. — 1929 — **Science**, **70**: 310-1
- ARAUJO, T. L. — 1942 — Do emprêgo da água oxigenada na profilaxia terapêutica das helmintoses intestinais do cão doméstico. Tese. Fac. Med. Vet. USP
- ARAUJO, T. L. e GUIMARÃES, L. M. — 1942 — **Rev. Fac. Med. Vet. São Paulo**, **2** (2): 51-2

- AUSTRALIA — 1946-7 — **Helminthological abst.**, 16 (5): 164 — 1948-50
- BALDWIN, E. — 1949 — *Dynamic aspects of Biochemistry* — Cambridge, University Press
- PAYLIS, H. A. — 1929 — *A manual of Helminthology medical and veterinary* — New York, William Wood & Co.
- BUTZ, L. & LALAND W. A. — 1934 — **Jour. Am. Pharm. Ass.**, 23 (11): 1088-94
- CARBALLO POU, M., FIELITZ, F. O. & RODRIGUEZ GONZALEZ, M. — 1945 — *Anais do III Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária — Pôrto Alegre*
- CAMERON, T. W. — 1951 — *The parasites of domestic animals* — 2nd ed. — Philadelphia, J. B. Lippincott Company
- CHOPRA, R. N., CHANDLER, A. C. — 1928 — *Anthelmintics and their uses* — Baltimore, William & Wilkins Co.
- CULBERTSON, J. T. — 1941 — *Immunity against animal parasites* — New York, Columbia University Press
- DEULOFEU, V. & MARENZI, A. D. — 1942 — *Curso de Química Biológica* — 3a. ed. Buenos Aires, "El Ateneo"
- FRANCO ROCHA, U. — 1954 — *Comunicação verbal sobre "Modificação da técnica de mensuração de helmintos"*
- GIBSON, T. E. — 1953 — **Jour. Helminthology**, 27 (1-2): 29-40
- GUIMARÃES, L. M. — 1942 — *Contribuição ao conhecimento da patogenia da ancilostomose canina. A absorção do ferro através da mucosa gastro-intestinal. Tese — Fac. Med. Vet. USP*
- LASER, H. — 1944 — **Biochem. J.**, 38: 333-8
- LAZARUS, M. — 1950 — **Aust. Jour. Scientific Res. Series B — Biol. Sci.**, 3 (2): 245-50
- LEIPER, J. W. G. & PETERS, B. G. — 1941 — **Jour. Helminthology**, 19 (1-2): 71-4
- LESSER, E. J. — 1906 — **Z. Biol.** 48: 1-18
- MÖNNIG, B. A. — 1941 — *Veterinary Helminthology and Entomology*, 2a. ed. — London, Bailliere, Tindall & Cox.
- MORGAN, B. B. & HAWKINS, P. A. — 1949 — *Veterinary Helminthology* — Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minn., U.S.A.
- MUCCIOLO, P. 1941 — *De um novo método de doseamento da peroxidase no leite e seu emprêgo na fiscalização desse produto. Tese. Fac. Med. Vet., USP*
- NEVEU-LEMAIRE, M. — 1936 — *Traité D'Helminthologie Médicale et Vétérinaire* — Tomo II — Vigot Frères, Editeurs — Paris
- NICHOLSON, J. A. — 1945 — *Lander's Veterinary Toxicology* — 3a. ed. London, Bailliere, Tindall & Cox.

- PETERS, B. G., LEIPER, W. G. & CLAPHAM, P. A. — 1941 — **Jour. Helminthology**, **19** (1-2): 9-24
- PINTO, C. — 1938 — Zooparasitas de interêsse medico e veterinário — Rio de Janeiro, Pimenta de Mello & Cia.
- RENCO, P. — 1939 — Microbiologia del latte e dei latticini — Milano, Ulrico Hoepli
- RODRIGUEZ GONZALEZ, M. & BREGANTE, L. J. — 1945 — **An. Fac. Vet. Montevideo**, **4** (4): 357-9
- ROGER'S, W. P. — 1949 — **Aust. Jour. Scientific Res. Series B. — Biol. Sci.**, **2** (2): 157-65
- ROGER'S, W. P. — 1949 — **Aust. Jour. Scientific Res. Series B. — Biol. Sci.**, **2** (2): 166-74
- SCHWARTZ, B., PORTER, D. A. — 1937 — **Rev. Med. Trop. y Parasitol. Bacteriol. Clin. y Labor.**, Habana, **3**: 11-24
- SPEEDING, C. R. W. — 1953 — **Jour. Helminthology**, **27** (1-2): 9-16
- TALIAFERRO, W. H. — 1929 — The immunology of parasitic infections. New York-London, Century Co.
- VAZ, Z. & FRANCO ROCHA, U. — 1948 — Comunicação pessoal sobre o tratamento de verminose de bovinos pela fenotiazina em Araçatuba — São Paulo, Brasil
- VON BRAND, T. — 1952 — Chemical Physiology of Endoparasitic Animals. New York, Academic Press Inc.
- WHITNEY, L. — 1939 — **Vet. Med.**, **34** (9560-566)

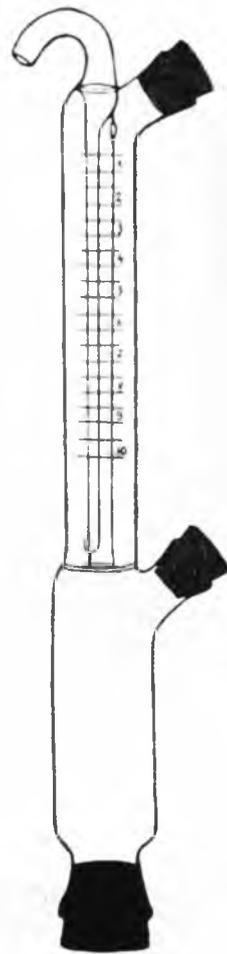


fig 1

Catalasímetro de Loeb.

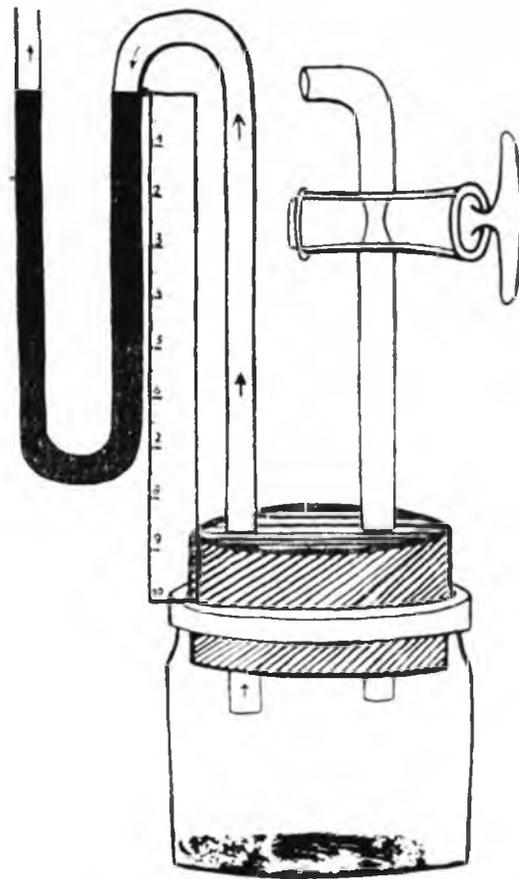


Fig. 2 — Catalasimetro modificado.