

EFEITO DO DIFLUBENZURON SOBRE LARVAS DE
NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS E OVINOS

CAROLINE BITTENCOURT MIRANDA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Fevereiro – 2025

EFEITO DO DIFLUBENZURON SOBRE LARVAS DE
NEMATÓIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS E OVINOS

CAROLINE BITTENCOURT MIRANDA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis de Paula Santos

Campos dos Goytacazes – RJ

Fevereiro – 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M672

Miranda, Caroline Bittencourt.

Efeito do Diflubenzuron sobre larvas de nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos. / Caroline Bittencourt Miranda. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2025.

69 f. : il.

Bibliografia: 54 - 69.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2025.

Orientador: Clovis de Paula Santos.

1. diflubenzuron. 2. nematoides gastrointestinais. 3. equinos. 4. ovinos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

EFEITO DO DIFLUBENZURON SOBRE LARVAS DE NEMATOIDES GASTRINTESTINAIS DE EQUINOS E OVINOS

CAROLINE BITTENCOURT MIRANDA

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Aprovado em: 26/02/2025

Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente



DEIVID FRANÇA FREITAS
Data: 18/04/2025 11:13:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Deivid França Freitas (Dr. Biociências e Biotecnologias) – UENF

Documento assinado digitalmente



FERNANDO DE ALMEIDA BORGES
Data: 22/04/2025 16:00:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Fernando de Almeida Borges (Dr. Medicina Veterinária) - UFMS

Documento assinado digitalmente



RENATO AUGUSTO DA MATTA
Data: 16/04/2025 14:52:50-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Renato Augusto DaMatta (Dr. Ciências) – UENF

Prof. Clóvis de Paula Santos (Dr. Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – UENF
Orientador

Á minha vó Izete (*in memoriam*) que fez tanto por mim ao longo da sua vida. Dedico a você esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Clóvis de Paula Santos pela oportunidade oferecida de orientação, por ser uma pessoa calma e paciente para ensinar e conduzir, contribuindo imensamente com minha formação acadêmica.

Ao corpo docente da UENF, sou grata pelos conhecimentos passados durante minha graduação e pós-graduação através das disciplinas cursadas.

A UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em especial ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), pela disponibilização de recursos que auxiliaram minha formação profissional, como laboratórios, bibliotecas e o campus em geral.

Aos meus pais, Valtair e Elizete, por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem com tanto amor e dedicação.

Ao meu irmão Rafael, pela amizade e por estar sempre ao meu lado nesta jornada.

Aos amigos do laboratório, Caroline Silvestre, Cindy, Edna, Maicley, Maria Clara, Maria Vitória, Isabelli, Vanessa e Viviane pela ajuda, companheirismo e momentos de descontração.

Às técnicas do LBCT Beatriz e Giovana, que contribuíram com seu conhecimento e habilidade para que os experimentos fossem realizados com excelência.

Ao professor Sérgio e Pedro Souto, pela valiosa orientação e suporte técnico nas análises microscópicas, que enriqueceram os resultados deste estudo.

Aos meus colegas do curso de Ciências Biológicas que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, sou grata pelo seu espírito colaborativo, pelas trocas de ideias e ajuda mútua.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Muito obrigada!

“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos”.

(Clarice Lispector)

RESUMO

A infecção por nematoides gastrintestinais é um problema significativo na pecuária, exacerbado pela resistência crescente desses parasitas aos anti-helmínticos tradicionais, o que torna urgente a busca por novas alternativas de controle. Uma possibilidade é o uso do diflubenzuron (DFB), um inseticida que inibe a síntese de quitina, polissacarídeo presente na casca e faringe dos nematoides. Em investigações preliminares, foi observada a redução do número de larvas infectantes (L3) em cultivos fecais de ovinos e equinos tratados com DFB, além da ausência de fluorescência em *Panagrellus* spp. tratados com DFB e marcados com calcofluor que é específico para quitina, ao contrário dos cultivados sem DFB. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* do DFB na ultraestrutura e sobrevivência de L3 de equinos e ovinos. Amostras fecais de ovinos e equinos foram coletadas diretamente da ampola retal, processadas por filtração e centrifugação para obtenção dos ovos, e cultivadas em solução fecal filtrada, que serviu como meio nutritivo para os estádios larvares (L1, L2 e L3). Os ovos foram cultivados com DFB, e comparados com controles (água destilada e DMSO 1%) e incubados por sete dias em condições ideais para o desenvolvimento larval. Após, as larvas foram analisadas via microscopia óptica e eletrônica. Foi observado que as larvas tratadas com DFB apresentaram degeneração dos órgãos internos, resultando em morte antes de atingirem o estágio L3, enquanto as do grupo controle mantiveram sua integridade. A microscopia eletrônica revelou que as larvas expostas ao DFB apresentaram perda de integridade estrutural da bainha, deformação corporal, ruptura da hipoderme com extravasamento celular e degeneração da cutícula. Além disso, foi observada alta concentração de vesículas eletrodensas e células internas distorcidas, contrastando com as larvas controle, que mantiveram sua estrutura normal. Esses resultados sugerem que o DFB pode ser uma alternativa eficaz no controle de nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos, com potencial para novas pesquisas e aplicações terapêuticas.

Palavras-chave: diflubenzuron, nematoides gastrointestinais, equinos, ovinos.

ABSTRACT

Gastrointestinal nematode infection is a significant problem in livestock farming, exacerbated by the increasing resistance of these parasites to traditional anthelmintics, which makes it urgent to search for new control alternatives. One possibility is the use of diflubenzuron (DFB), an insecticide that inhibits the property of chitin, a polysaccharide present in the shell and pharynx of nematodes. In preliminary studies, a reduction in the number of infective larvae (L3) was observed in fecal cultures of sheep and horses treated with DFB, as well as the absence of fluorescence in *Panagrellus* spp., treated with DFB and marked with calcofluor which is specific to chitin, in contrast to those cultured without DFB. This study aimed to evaluate the in vitro effect of DFB on the ultrastructure and survival of L3 of sheep and horses. Fecal samples from sheep and horses were collected directly from the rectal ampulla, processed by filtration and centrifugation to obtain eggs, and cultured in filtered fecal solution, which served as a nutrient medium for the larval stages (L1, L2 and L3). Eggs were cultured with DFB and compared with distilled water and 1% DMSO controls and incubated for seven days under ideal conditions for larval development. The larvae were then examined by optical and electron microscopy. It was observed that larvae treated with DFB presented degeneration of the internal organs leading to death before reaching L3 stage, while the control group maintained its integrity. Electron microscopy revealed that larvae exposed to DFB exhibited loss of structural integrity of the sheath, body deformation, rupture of the hypodermis with cell extravasation and degeneration of the cuticle. Furthermore, a high concentration of electron-dense vesicles and distorted internal cells were observed, in contrast to the control of larvae, which maintained their normal structure. These results suggested that DFB may be an effective alternative for the control of gastrointestinal nematodes in horses and sheep, with potential for new research and therapeutic applications.

Keywords: Diflubenzuron, gastrointestinal nematodes, horses, sheep.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Corte transversal comum da fêmea de um nematódeo.....	18
Figura 2. Corte longitudinal comum de um nematoide.....	19
Figura 3. Ciclo de vida dos pequenos estrogilídeos pertencentes a subfamília Cyathostominae.....	21
Figura 4. Ciclo de vida de Trichostrongyloidea.....	25
Figura 5. Estrutura molecular do diflubenzuron.....	27
Figura 6. Número médio de L3 em cultivos fecais de ovinos (A) e equinos (B) contendo 2 e 4g e tratados ou não com DFB a 30mg/mL, incubados por sete dias.....	31
Figura 7. Ovos extraídos de fêmeas de <i>A. galli</i>	31
Figura 8. Fluorescência de <i>Panagrellus</i> spp. cultivados por sete dias em tratamento ou controle.....	32
Figura 9. Coproculturas incubadas em copos descartáveis de 50mL.....	36
Figura 10. Coproculturas invertidas sobre placas de Petri.....	36
Figura 11. Larvas de amostras fecais ovinas após 7 dias de cultivo em Solução Fecal.	40
Figura 12. Larvas de amostras fecais equinas após 7 dias de cultivo em SF.....	41
Figura 13. Microscopia confocal de nematoides gastrintestinais de equinos cultivado por 7 dias em DFBou controle.....	42
Figura 14. Microscopia eletrônica de transmissão de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com diflubenzuron e não tratados.....	43
Figura 15. Microscopia eletrônica de varredura de nematoides gastrintestinais de ovinos cultivados em condições controle.....	44
Figura 16. Microscopia eletrônica de varredura de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com diflubenzuron.....	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1. Animais de produção	15
2.2. Nematoides gastrintestinais	16
2.2.1. Caracterização morfológica	17
2.2.2. Principais nematodioses em equinos	19
2.2.3. Principais nematodioses em ovinos	22
2.3. Resistência antihelmíntica	25
2.4. Diflubenzuron	27
2.4.1. Inibição da síntese de quitina	28
2.4.2. Eficácia em nematoides	29
3. OBJETIVO.....	33
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. Obtenção dos ovos	34
4.2. Teste de eclosão.....	34
4.2.1. Meio nutritivo	34
4.2.2. Químicos	35
4.3. Coprocultura.....	35
4.4. Identificação das larvas	36
4.5. Preparação do material para microscopia.....	37
4.5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET.....	37
4.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	37
4.5.3. Microscopia Óptica	38
4.5.4. Microscopia Confocal.....	38
5. RESULTADOS	39
5.1. Análise do meio nutritivo.....	39
5.2. Análise de eclosão de larvas.....	39
5.3. Análise de microscopia óptica	39
5.4. Análise de Microscopia Eletrônica.....	42
5.4.1 Transmissão.....	42
5.4.2 Varredura.....	44
6. DISCUSSÃO	46
6.1. Aproveitamento de Fezes como Meio para Cultivo <i>In Vitro</i> de Nematoides Gastrointestinais	46
6.2. Atividade Ovicida do DFB em Insetos e Nematoides.....	46
6.3. Eficácia do DFB na Redução Larval e Combinação Terapêutica	48
6.4. Alterações Estruturais em Nematoides Via Microscopia Óptica.....	49
6.5. MET Revelou Efeitos na Morfologia e Ultraestrutura.....	50

6.6. MEV Revelou Efeitos do DFB na Bainha de Nematoides	51
7. CONCLUSÃO	53
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. INTRODUÇÃO

Helmintoses gastrintestinais se destacam dentre os principais fatores que interferem no desenvolvimento pleno da atividade pecuária (MOTA et al., 2003), com os nematoides consistindo em um dos principais grupos de parasitos que infectam ruminantes no mundo todo. Estes nematoides afetam a produção de ruminantes devido à redução no ganho de peso, produção de leite e fertilidade dos animais (BASTIANETTO et al., 2012; CHARLIER et al., 2014), além de custos com tratamentos profiláticos, curativos e, em casos extremos, a mortalidade dos animais mais debilitados (CHARLES, 1992). Esta interferência no desenvolvimento dos animais resulta em perdas econômicas bilionárias na produção de pequenos e grandes ruminantes (GRISI et al., 2014; POLITI et al., 2018). Nematoides gastrintestinais também tem destaque no parasitismo de outros animais de produção e/ou de companhia, tais como equinos, ovinos e aves, impactando a saúde e bem-estar destes animais.

O controle destes parasitas é feito, tradicionalmente, fazendo-se uso de produtos com efeito anti-helmíntico. Porém, o uso de esquemas de tratamento tem como consequência a seleção de populações de helmintos resistentes aos diferentes grupos químicos (AMARANTE, 1992). Assim, já foram descritos inúmeros relatos de resistência anti-helmíntica frente à diferentes classes destes antiparasitários, como em ovinos (SALGADO; SANTOS, 2016), bovinos (SUTHERLAND e LEATHWICK, 2011), caprinos (COELHO et al., 2010; VÁRADY et al., 2007) e equinos (MATTHEWS, 2014), sendo um problema cada vez mais corriqueiro.

O desenvolvimento e comercialização de novas drogas é lento e excessivamente caro (GEARY, 2013), sendo de extrema importância prolongar a vida útil dos produtos existentes por meio de sua utilização estratégica para o controle dos nematoides (FORTES e MOLENTO, 2013). As benzoilúreias foram os primeiros inseticidas descritos com atividade baseada na interferência na deposição de quitina, sendo diflubenzuron (DFB) o primeiro inseticida comercialmente disponível. Este produto foi desenvolvido pela companhia farmacêutica Philips-Duphar em 1970 e sua descoberta desencadeou a pesquisa sobre benzoilureias como uma nova classe de inseticidas (SUBRAMANIAN; SHANKARGANESH, 2016).

DFB atua na inibição da síntese da quitina, polissacarídeo que proporciona

integridade à casca do ovo e revestimento faríngeo de nematoides. Partindo deste princípio, alguns estudos iniciais foram feitos avaliando sua eficácia contra fitonematoides (VEECH, 1977, 1978a), nematoides de vida livre (VEECH, 1978b) e posteriormente contra nematoides parasitos de animais (FETTERER et al., 1989).

Recentemente observamos redução significativa ($P < 0,0001$) na contagem de larvas infectantes em cultivos fecais ovinos e equinos tratados com DFB, além de identificar atividade ovicida em cultivos de ovos de *Ascaridia galli*. Adicionalmente, *Panagrellus* spp. cultivados na presença de DFB e marcados com calcofluor (marcador fluorescente de quitina) não fluoresceram porém, aqueles cultivados na ausência de DFB tornaram-se fluorescente indicando que houve a inibição da síntese de quitina nos nematoides tratados com o DFB (MIRANDA, 2022).

Considerando-se o elevado prejuízo que os nematoides gastrintestinais proporcionam na produção animal aliada à comprovação da resistência de nematoides gastrintestinais frente a diversas classes de anti-helmínticos, é necessária a realização de pesquisas com compostos alternativos. Neste contexto, o DFB se destaca como um nematicida alternativo. Devido à escassez de estudos investigando a atividade nematicida do DFB em nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos, observa-se a necessidade de realizar pesquisas para melhor averiguar sua eficácia para o controle desses parasitas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Animais de produção

A cerca de 12.000 anos atrás, no final da era glacial e durante a transição para o atual período interglacial, a domesticação de plantas e animais foi moldada pelo ser humano. À medida que os agricultores migravam para novas regiões, um número restrito de espécies domesticadas foram progressivamente introduzidas ao redor do mundo. (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002; TELETCHEA, 2019).

No Brasil vantagens são somadas, em termos de clima favorável, formação de pastagens e abundância de água, que são questões importantes em sistemas de pastejo. Assim, a pecuária tem um papel relevante para a economia do país, não apenas pela geração de empregos, mas soma-se ao fato, a cadeia produtiva e de exportação alimentar (GRANDO, 2020).

A ovinocultura é uma atividade pecuária de grande importância para o Brasil. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o Brasil é estabelecido como o 14º maior produtor mundial de ovinos, com um plantel de aproximadamente 20,6 milhões de cabeças e expectativa de uma taxa de crescimento médio de 2,9% ao ano (EMBRAPA, 2014).

Outra atividade que se mostrou bastante lucrativa no Brasil é a equinocultura. Apesar da incorporação de máquinas automotivas e outras ferramentas tecnológicas, o cavalo continua sendo o escolhido para o desenvolvimento de atividades pecuárias e agrícolas na maioria das propriedades rurais nacionais (MAPA, 2016). Além da sua utilização em meios de trabalho, os equídeos também são empregados em esportes e eventos desportivos, como hipismo, adestramento, polo, salto, vaquejada e rodeio. O Brasil ocupa a quarta posição de maior rebanho equino do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, China e México (COSTA et al., 2014).

A equinocultura movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões no Brasil, gerando 610 empregos diretos e 2.430 empregos indiretos, o que corresponde a uma proporção seis vezes maior de empregos gerados pela empresa automotiva (MAPA, 2016). Apesar do consumo de carne da espécie não possuir relevância no Brasil, o país se situa na 6ª colocação mundial em volume de abates equinos e 14º maior exportador do produto (FAOSTAT, 2014) com lucro de R\$41,72 milhões apenas em 2020 (OEC, 2020).

2.2. Nematoides gastrintestinais

Antes da domesticação e em condições naturais, o equilíbrio entre parasitas e hospedeiros permitia a tolerância entre hospedeiros e parasitos. Com a domesticação, reprodução seletiva enfatizando atributos comportamental e características produtivas (HUNT et al. 2013) e consequente aumento no número de animais por área, o equilíbrio foi alterado em favor dos parasitas (COSTA et al., 2009). O parasitismo bem-sucedido requer que o parasita sobreviva dentro de seu hospedeiro por tempo suficiente para se reproduzir.

Os nematoides gastrointestinais são organismos vivos que passam por diferentes estádios larvais ao longo de seu ciclo de vida e são influenciados por variações no ambiente físico em que se encontram, como clima e topografia (PORTUGAL, 2021). Esses organismos exploram o intestinos e estômago do hospedeiro e o escolhem como habitat, independentemente de seu sistema imunológico, conseguindo sobreviver, prosperar e viver em equilíbrio com a imunidade do hospedeiro (ELSE, 2005). O parasitismo por nematoides gastrintestinais é destacado em animais de produção e/ou companhia, na qual a infecção provoca diferentes sinais e sintomas que interferem no ganho de peso, ingestão de alimentos e utilização de matéria seca, retardo na idade reprodutiva e mortalidade em animais seriamente afetados (CHARLES, 1992).

A ocorrência e a distribuição de parasitoses dependem de fatores relacionados ao hospedeiro, ao ambiente e ao parasita. Características como estado fisiológico, nutrição, raça, idade e sexo do animal influenciam o hospedeiro, enquanto fatores físicos, bióticos e antrópicos, como clima, topografia, radiação solar, umidade e regime de chuvas, afetam o ambiente. Condições climáticas ideais proporcionam um ambiente favorável para que os ovos, eliminados no solo junto com as fezes de animais infectados, possam se desenvolver adequadamente (PORTUGAL, 2021). A pastagem, por sua vez, funciona como veículo de transmissão das infecções de um animal para outro, sendo que as massas fecais podem atuar como reservatório de parasitas por quase todo o tempo em que estes persistirem (BRAGA, 1980). Em climas tropicais úmidos, temperaturas entre 22-25°C e umidade de 60-70% criam condições ideais para o desenvolvimento de ovos e larvas no solo, permitindo sua evolução de L1 para L3 (BANKS et al., 1990; HABELA

et al., 2002; WANG et al., 2014). Tradicionalmente, acreditava-se que temperaturas fora desse intervalo impediam o acúmulo significativo de parasitas em pastagens, mas estudos recentes indicam o contrário. Uma exceção é *Nematodirus* spp., que permanece no solo durante o inverno e precisa de temperaturas frias para completar seu desenvolvimento. Diferentemente de outros trichostrongilídeos em ruminantes, suas larvas se desenvolvem ainda dentro do ovo, e a infecção ocorre quando os animais ingerem as larvas já eclodidas (VANHOY, 2023b).

2.2.1. Caracterização morfológica

O filo Nematoda engloba os parasitos redondos de importância veterinária (GARAUNDO, 2013; SOLORIO; NAVARRO, 1992). Esses helmintos têm formato cilíndrico, com um ou ambos os extremos frequentemente afilados (pontagudos ou afiados), sem separação clara entre as diferentes partes corporais. A superfície do corpo raramente é lisa, sendo, na maioria das vezes, anelada. (GARAUNDO, 2013). Os adultos variam de poucos milímetros a mais de um metro de comprimento e possuem um trato digestivo completo, além de uma cutícula resistente e elástica. A região bucal é adaptada para se fixar no hospedeiro e se alimentar dele (ROMERO, 1994; SOULSBY, 1987; UFRRJ, 2016).

A extremidade anterior abriga estruturas como boca, lábios, interlábios e papilas sensoriais, enquanto a extremidade posterior difere entre machos e fêmeas. Internamente, a parede do corpo é formada por cutícula, hipoderme e camada muscular (UFRRJ, 2016). A cutícula, resistente, é secretada pela hipoderme subjacente, a qual se projeta para a cavidade corporal formando dois cordões laterais, que contêm os canais excretores e um cordão dorsal e um ventral por onde passam os nervos (Figura 1). A maioria dos órgãos internos possui forma filamentar e está suspensa na cavidade corporal, preenchida por fluido perientérico, que auxilia na circulação de nutrientes e na manutenção da turgidez do corpo. (TAYLOR; COOP; WALL, 2017).

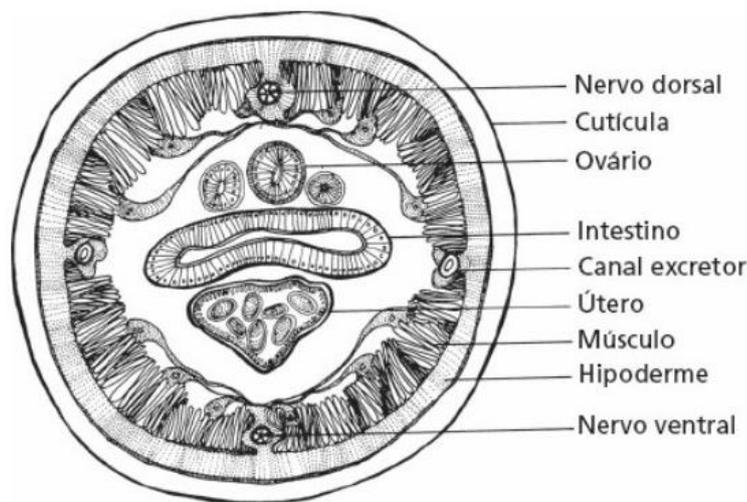


Figura 1. Corte transversal comum da fêmea de um nematódeo. Fonte: TAYLOR; COOP; WALL (2017).

Todos os nematoides possuem uma cutícula protetora, mas essa estrutura rígida limita o crescimento do organismo, exigindo que ela seja continuamente descartada e renovada. Durante o ciclo de vida, os nematoides passam por quatro mudas de cutícula, desde a fase de larva L1 até o estágio adulto maduro. Esse processo de muda substitui a cutícula antiga por uma nova, ocorrendo em três etapas principais: (1) estado de letargia, quando a atividade do verme diminui; (2) apólise, quando a cutícula antiga se descola da hipoderme; e (3) ecdise, quando a cutícula antiga é completamente eliminada e o verme emerge com uma nova cutícula. A muda é uma característica exclusiva do clado Ecdysozoa, que inclui, além dos nematoides, também os artrópodes (PAGE et al., 2014).

O sistema digestório dos nematoides é um tubo reto que inclui estruturas como boca, esôfago, intestino e ânus, além de glândulas digestivas que auxiliam na nutrição (Figura 2A). O sistema nervoso é composto por gânglios situados na região esofagiana e próximo ao ânus, conectados a cordões nervosos que inervam diferentes partes do corpo. Já o sistema excretor pode ser glandular ou tubular, desempenhando funções de excreção e osmorregulação por meio de canais excretores localizados na região esofagiana (UFRRJ, 2016).

O aparelho genital masculino é composto por testículo, canal deferente e estruturas acessórias relacionadas à cópula, como espículos e bolsa copuladora (Figura 2C). Já o aparelho genital feminino possui ovário, oviduto, útero e vagina,

podendo apresentar uma ou várias gônadas, com localização anterior, posterior ou mista em relação à vulva (Figura 2B) (TAYLOR; COOP; WALL, 2017; UFRRJ, 2016). Essa complexidade morfológica permite que os nematoides se adaptem a uma ampla gama de ambientes e estratégias de sobrevivência, tanto em vida livre quanto parasitária.

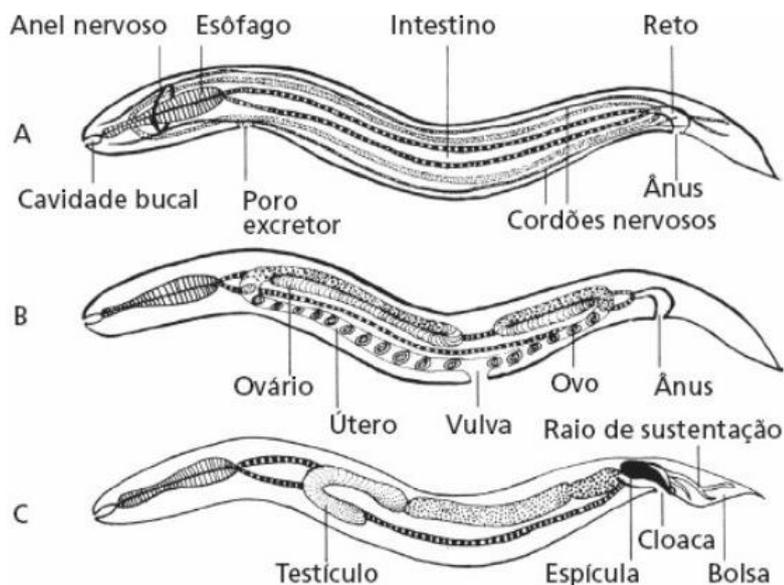


Figura 2. Corte longitudinal comum de um nematoide. A. Sistemas digestório, excretor e nervoso. B. Sistema reprodutor da fêmea de um nematódeo. C. Sistema reprodutor de um macho nematódeo. Fonte: TAYLOR; COOP; WALL (2017).

2.2.2. Principais nematodioses em equinos

As principais ordens que acometem os rebanhos equinos incluem *Ascaridida*, *Oxyurida* e *Strongylida*, podendo-se destacar as espécies *Parascaris equorum*, *Oxyuris equi*, *Strongylus* spp. (PROUDMAN; MATTHEWS, 2000) e os ciatostomíneos devido a sua maior importância em termos de diversidade de espécies e em número de espécimes por hospedeiro (BEZERRA et al., 2007; GAWOR, 1995; LOVE et al., 1999).

Ascarídeos de cavalos (*Parascaris equorum*) são vermes robustos e esbranquiçados que podem atingir até 30 cm (KLEI, 2019). A infecção afeta principalmente potros, pois imunidade protetora contra *P. equorum* começa a se desenvolver por volta dos seis meses de idade (LAUGIER, 2012). A infecção ocorre quando os potros ingerem ovos presentes no solo contaminado, que podem

permanecer viáveis por anos. Pastos, piquetes e baias usados por potros infectados são as principais fontes de contaminação. As larvas podem migrar pelo hospedeiro, causando sintomas respiratórios semelhantes a resfriados (BELAY; TESHOME; ABIYE, 2016). Potros infectados também podem apresentar desnutrição, apatia, cólicas e, em situações mais sérias, obstrução ou perfuração intestinal (CRIBB et al., 2006; TATZ et al., 2012; KLEI, 2019).

Os grandes estrôngilos causam infecções intestinais quando os cavalos ingerem larvas presentes em forragens contaminadas. Uma vez no organismo do hospedeiro, as larvas se tornam ativas no intestino e migram por diversos órgãos e vasos sanguíneos, até se desenvolverem completamente no intestino grosso (KHAN; ROOHI; RANA, 2015). No intestino, elas provocam anemia devido à perda de sangue, além de causar fraqueza, emagrecimento e, às vezes, diarreia. *Strongylus vulgaris*, pode afetar a artéria mesentérica craniana e seus ramos, o que dificulta o fluxo sanguíneo para os intestinos, resultando em cólicas, necrose de tecidos, problemas na motilidade intestinal, torção, intussuscepção (dobramento do intestino), sangramentos e até ruptura intestinal (SHITE; ADMASSU; ABERE, 2015; KLEI, 2019).

Mais de 50 espécies de pequenos estrôngilos, também denominados ciatostomíneos, são reconhecidas e infectam cavalos domésticos (CORNING, 2009). Esses parasitos são os mais comuns e patogênicos a afetar cavalos ao redor do mundo, com quase 100% dos animais infectados por pelo menos algumas espécies de ciatostomíneo (REINEMEYER et al., 1984). Os vermes adultos vivem no intestino grosso e, ao contrário dos grandes estrôngilos, não migram para fora da parede intestinal. Cavalos saudáveis podem hospedar muitos desses vermes sem apresentar sintomas, porém infecções mais graves podem levar a problemas digestivos, inflamação e diarreia (KLEI, 2019).

No ciclo de vida dos ciatostomíneos (Figura 3), os ovos são eliminados nas fezes do animal parasitado. No ambiente fecal, principalmente com a temperatura adequada e umidade, os ovos tornam-se embrionados e maturam larvas de primeiro estágio (L1), estas crescem sofrem muda e se diferenciam para o segundo estágio larval (L2) e posteriormente após nova diferenciação originam as larvas de terceiro estágio (L3). Estas abandonam o bolo fecal e migram para as pastagens, tornando-se assim, potencialmente infectantes.

O desenvolvimento do ovo até a fase infectante (L3) ocorre no ambiente após aproximadamente uma semana (MARCHIONDO et al., 2019), com a contaminação decorrendo da ingestão de pastagens contaminadas com L3. Após ingestão, as L3 invadem a parede do intestino grosso desencadeando um processo inflamatório ao redor das mesmas, neste local se desenvolvem em L4 até surgirem no lúmen intestinal e se transformarem em adultos. Podem permanecer dormentes na parede intestinal (forma hipobiótica) por períodos aproximadamente de quatro a 24 meses (CORNING, 2009). A emergência de um número massivo de larvas hipobióticas resulta em quadro conhecido como ciatostomíase larval que pode lesionar a parede intestinal gravemente, ocasionando diarreia, cólica grave e mortalidade de até 50 % (PAYNE; CARTER, 2007; PEREGRINE et al., 2006;). O período desde a ingestão da larva até o início da eliminação dos ovos pelas fezes decorre dentro de 5 a 6 semanas (ISHII, 2017). O termo pequenos estrôngilos é usado em contraposição ao grupo dos grandes estrôngilos (*Strongylus vulgaris*, *Strongylus edentatus* e *Strongylus equinus*).

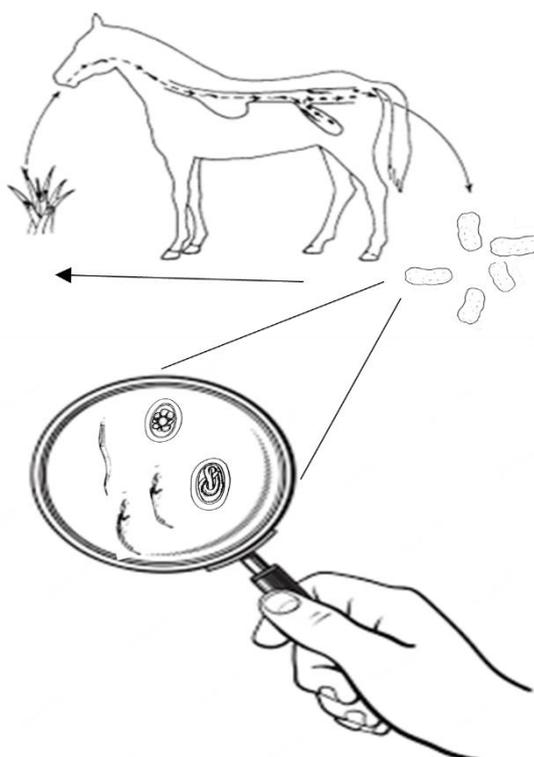


Figura 3. Ciclo de vida dos pequenos estrôngilídeos pertencentes a subfamília Cyathostominae. Adaptado de Foreyt e Foreyt (2001).

Além dos sintomas já mencionados, infecção por nematoides gastrointestinais também levam à espoliação do sistema digestório, menor desenvolvimento, queda de imunidade e maior predisposição a outras doenças e parasitas (COSTA, 2011), podendo também ocasionar episódios fulminantes de cólica e morte (KLEI; CHAPMAN, 1999). Em fêmeas a situação é mais preocupante, pois no periparto há um aumento considerável das infecções por verminoses devido à imunossupressão dos animais. Tal situação aumenta o número de L3 no pasto, sendo um perigo aos potros que são mais suscetíveis a infecções. Outra situação que pode ocorrer é a transmissão de larvas de *Strongyloides westeri* aos potros por via transplacentária (BOWMAN et al. 2006).

2.2.3. Principais nematodioses em ovinos

Os tricostrongilídeos (Superfamília Trichostrongyloidea) são responsáveis por grandes perdas econômicas na ovinocultura, sendo os gêneros de maior destaque *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp., e *Cooperia* spp. (FOREYT, 2005; URQUHART, et al., 1998). O rebanho geralmente é acometido por infecções mistas, sendo *Haemonchus* spp. aquele correspondendo a níveis superiores nas cargas parasitárias dos pequenos ruminantes.

Nematoides do abomaso, como *Haemonchus*, são prevalentes em regiões tropicais, subtropicais e em áreas com chuvas de verão (BESIER et al., 2016). Esses endoparasitos sugam o sangue do hospedeiro, provocando erosões e ulcerações na mucosa gástrica, resultando em gastrite.

A hemoncose pode ser dividida em aguda, hiperaguda e crônica (DUNN, 1978). Na hemoncose aguda, a anemia passa a ficar aparente dentro de 2 semanas após a infecção e caracteriza-se por queda progressiva no hematócrito. Nas semanas subsequentes, o hematócrito se estabiliza em nível baixo pela produção compensatória de eritrócitos. Contudo, devido à copiosa perda de ferro e proteína pelo trato gastrintestinal e de inapetência, a medula torna-se esgotada e a taxa de hematócrito despencar. A hemoncose hiperaguda decorre de altas infecções, de até 3.000 parasitos, ovinos aparentemente saudáveis podem ter morte súbita por gastrite hemorrágica severa. A hemoncose crônica se desenvolve durante estações prolongadas de seca quando a reinfecção é desprezível, mas o pasto fica deficiente em nutrientes. Neste período, a perda de sangue consequente de pequena carga

parasitária é suficiente para levar a sinais clínicos, como perda de peso, fraqueza e inapetência do rebanho (BESIER et al., 2016; OPPITZ, 2011; URQUHART et al., 1998).

Os vermes gástricos *Teladorsagia circumcincta* (anteriormente *Ostertagia*) e *Ostertagia trifurcata* são comuns em regiões frias e temperadas, causando sintomas como perda de peso, hipoproteinemia e diarreia (O'CONNOR; WALKDEN-BROWN; KAHN, 2006). Em infecções subclínicas reduzem o apetite, prejudicam a digestão e a absorção de nutrientes. Também causam aumento de periparto na contagem de ovos nas fezes de ovinos e caprinos, podendo levar à diarreia e redução na produção de leite das mães (VANHOY, 2023a). Pode ocorrer hipobiose, um mecanismo de inibição do desenvolvimento larval (EYSKER, 1993). Tal inibição larval em *Ostertagia* e outros nematoides tem sido interpretado como um mecanismo de sobrevivência para evitar condições ambientais adversas, como frio extremo ou alternância entre calor, seca e umidade (TARIQ; LATEEF, 2017). A ostertagiose tipo I resulta de infecções recentes e afeta principalmente bezerros de 7 a 15 meses, geralmente após o desmame. Ostertagiose tipo II é causada pela emergência de grandes números de larvas em hipobiose (L4), afetando principalmente bovinos de 12 a 20 meses (VANHOY, 2023a).

Trichostrongylus spp. são encontrados em praticamente todos os sistemas de produção de pequenos ruminantes (ABRÃO et al., 2010), sendo mais resistentes ao frio e dessecação em comparação ao gênero *Haemonchus* spp., dificultando o controle ambiental dos mesmos (ROBERTO et al., 2018). *Trichostrongylus axei* causa gastrite caracterizada por erosões superficiais e hiperemia da mucosa do abomaso, além de diarreia. A perda de proteínas pela mucosa lesionada, aliada à anorexia, resulta em hipoproteinemia e perda de peso no animal infectado. Embora possa ocorrer hipobiose, ela é menos pronunciada do que em *Ostertagia* (CAMPILLO, 1999; GARAUNDO, 2013). Os vermes adultos são pequenos e semelhantes a pelos, medindo cerca de 5 mm de comprimento, e apresentam baixa fecundidade (KHANNA, 2022). Os sinais clínicos geralmente só se manifestam em infecções intensas, associados à desnutrição ou estresse (VANHOY, 2023a). Já nematoides do intestino delgado, como *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus* e *Trichostrongylus rugatus*, causam enterite e diferentes graus de enteropatia com perda de proteínas em pequenos ruminantes, com a

gravidade da infecção dependendo da virulência dos parasitas e da intensidade da carga parasitária (VANHOY, 2023a). Assim como *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp.* são parasitas predominantes em regiões com invernos rigorosos e chuvas bem distribuídas ao longo do ano. Sua principal vantagem adaptativa é a maior resistência à dessecação, além da capacidade de se desenvolver em temperaturas mais baixas em comparação a *H. contortus* (O'CONNOR; WALKDEN-BROWN; KAHN, 2006).

Outros sintomas que podem acometer ovinos infectados incluem diminuição do apetite, emagrecimento, pelos arrepiados e sem brilho, anemia e edema submandibular, com a mortalidade do rebanho podendo aumentar em torno de 30% (TEIXEIRA; CAVALCANTE; VIEIRA, 2015). O edema submandibular, ou seja, acúmulo de fluido que ocorre no espaço intermandibular do maxilar inferior é causado pela interrupção do equilíbrio normal de pressão e/ou proteínas entre o sangue e os espaços entre as células localizadas fora dos vasos sanguíneos (ZAJAC, 2016).

Nematóides gastrintestinais de ovinos possuem ciclos de vida (Figura 4) bastante semelhantes entre si, com um período de desenvolvimento do parasito no ambiente (fase de vida livre) e outra no hospedeiro (fase parasitária) (MONTEIRO, 2011). Os ovos são eliminados pelas fezes do animal parasitado, eclodindo as larvas. As larvas passam por duas mudas até chegar no estágio infectante (L3) e a infecção é por meio da ingestão das larvas.

Em *Haemonchus spp.* o tempo de desenvolvimento do ovo até L3 ocorre dentre 4 a 6 dias em temperaturas ideais de 24 a 29°C, podendo as larvas sobreviver no pasto por até 12 meses (MARCHIONDO et al., 2019). Infecção ocorre pela ingestão de L3 presentes na pastagem. Após ingestão, L3 penetram na mucosa do abomaso ou intestino e realizam nova muda para L4. Após, a larva volta à luz do órgão onde se desenvolve em parasita adulto e inicia a postura dos ovos. O período desde a ingestão da larva até o início da eliminação dos ovos pelas fezes pode demorar de 18 a 28 dias (SOTOMAIOR et al., 2009; PADDOCK, 2011).

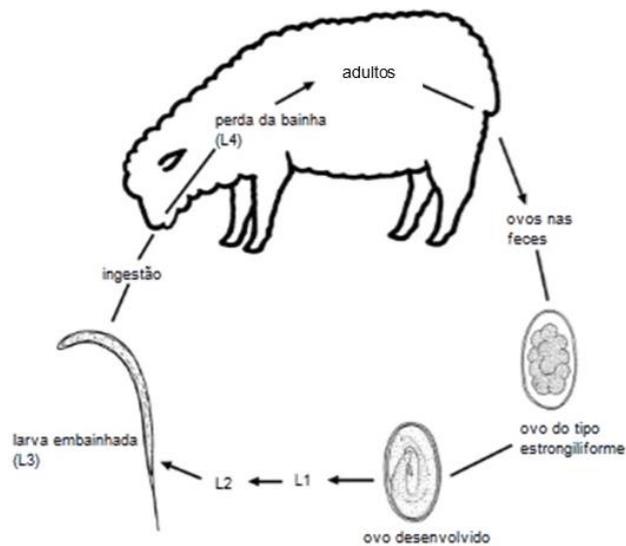


Figura 4. Ciclo de vida de Trichostrongyloidea. Adaptado de Demeler (2005).

2.3. Resistência antihelmíntica

A resistência anti-helmíntica é definida como a redução hereditária da sensibilidade de uma população de parasitos a um determinado anti-helmíntico que anteriormente era eficaz contra eles (FISSIHA; KINDE, 2021). Essa resistência é constatada quando uma proporção significativa de parasitos dentro de uma população consegue tolerar doses do medicamento que seriam letais para uma população padrão da mesma espécie, sendo essa característica transmitida de geração em geração (ABBOTT; TAYLOR; STUBBINGS, 2012; POTÂRNICHE et al., 2021).

Nas últimas cinco décadas, o uso de anti-helmínticos tem sido a principal estratégia no controle de infecções causadas por helmintos em animais. A introdução de anti-helmínticos de amplo espectro nas décadas de 1960 e 1970, mostrou-se extremamente eficiente no controle desses parasitos, com taxas de redução superiores a 95%, ampla margem de segurança, ação de amplo espectro e custos acessíveis (GILLEARD et al., 2021). Contudo, o uso intensivo e contínuo desses medicamentos resultou no desenvolvimento significativo de resistência anti-helmíntica, especialmente entre nematoides gastrintestinais que afetam bovinos, ovinos, caprinos e equinos (POTÂRNICHE et al., 2021). O avanço dessa resistência

representa uma ameaça global à saúde e à produtividade dos animais de criação (BASTIANETTO et al., 2012; CHARLIER et al., 2014). Atualmente, as três classes mais utilizadas de anti-helmínticos em pequenos ruminantes incluem os benzimidazóis (BZs), as lactonas macrocíclicas (MLs) e os agonistas colinérgicos, como o levamisol (LEV). Contudo, relatos confirmam a resistência em todas essas classes de anti-helmínticos (KAPLAN; VIDYASHANKAR, 2012; (PAPADOPOULOS; GALLIDIS; PTOCHOS, 2012; SANGSTER; COWLING; WOODGATE, 2018; WOLSTENHOLME et al., 2004). Notavelmente, a resistência aos medicamentos costuma surgir em menos de 10 anos após sua introdução no mercado (KAPLAN, 2004). De acordo com as diretrizes da Associação Mundial para o Avanço da Parasitologia Veterinária (em inglês *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* - WAAVP), a resistência anti-helmíntica é caracterizada pela redução da eficácia de um medicamento, quando este apresenta menos de 95% de sucesso no controle da carga parasitária-alvo (COLES et al., 1992).

Existem três categorias principais de resistência anti-helmíntica: resistência cruzada, resistência colateral e resistência múltipla. A resistência cruzada ocorre quando uma cepa de parasito se torna capaz de suportar doses terapêuticas de anti-helmínticos que não estão quimicamente relacionados ou que possuem mecanismos de ação distintos. A resistência colateral surge quando a resistência a um determinado anti-helmíntico é consequência da exposição a outro medicamento com mecanismo de ação semelhante, como no caso dos benzimidazóis. Também é relatado que parasitas resistentes ao levamisol apresentam resistência colateral ao morantel. Por fim, a resistência múltipla se refere ao desenvolvimento de resistência a dois ou mais anti-helmínticos, sejam eles de mecanismos de ação semelhantes ou diferentes, resultando da seleção independente de cada grupo ou de mecanismos colaterais (NIPANE; MISHRA; PANCHBUDDHE, 2008).

Atualmente, combinações de dois ou mais princípios ativos anti-helmintos são usadas para controlar a resistência e ampliar a eficácia em ruminantes (GEARY et al., 2012). A combinação de anti-helmintos com espectro semelhante de atividade nematodocida, mas mecanismos de ação diferentes, é uma estratégia alternativa quando há falhas documentadas nos tratamentos individuais (ANDERSON; MARTIN; JARRETT, 1988; BARNES; DOBSON; BARGER, 1995; LEATHWICK et al., 2009; LANUSSE et al., 2018).

2.4. Diflubenzuron

Diflubenzuron (DFB) é um inseticida benzoilureia. Sua composição química é derivado da ureia, na qual um hidrogênio ligado a um dos nitrogênios é substituído por um grupo 4-clorofenil, e um hidrogênio ligado ao outro nitrogênio é substituído por um grupo 2,6-difluorobenzoil. Sua fórmula empírica é $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$ (Figura 5). O DFB dissipa-se na água principalmente por meio de processos de hidrólise e fotólise. Em uma temperatura de 25 °C, a meia-vida do DFB, devido à hidrólise, foi superior a 180 dias em água com pH 5 e 7, enquanto em pH 9 foi de 32,5 dias, evidenciando sua dependência do pH. Quanto à fotólise, o composto é razoavelmente estável (WHO, 2006).

O DFB é amplamente empregado na agricultura para o manejo de pragas, com destaque para espécies pertencentes às ordens Coleoptera (MSCASLAND; COOPER; BARNUM, 1998), Orthoptera (DELGADO et al., 1999) e Lepidoptera (VILLANUEVA-JIMENEZ et al., 2000). DFB pertence a um grupo de inseticidas de nova geração denominados reguladores de crescimento ou IGR (*insect growth regulator*) (BORGES et al., 2012).

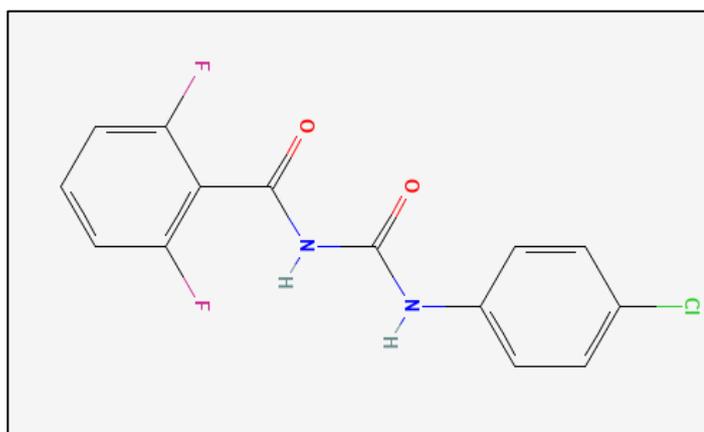


Figura 5. Estrutura molecular do diflubenzuron. Fonte: National Library of Medicine <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diflubenzuron>

Os IGRs apresentam um modo de ação distinto dos inseticidas convencionais, atuando de forma seletiva no desenvolvimento, metamorfose e reprodução dos insetos-alvo, em vez de provocar intoxicação direta (HOFFMANN; LORENZ, 1998; MARTINS; SILVA, 2004). Entre suas principais vantagens,

destacam-se a baixa toxicidade para mamíferos e a rápida degradação no ambiente (KOSTYUKPVSKY; TROSTANETSKY, 2006). No entanto, podem impactar artrópodes não-alvo e ocasionar desequilíbrios ecológicos. Apesar disso, diversos estudos apontam que o uso dos IGRs resulta em baixo impacto ambiental (ALI; KOK-YOKOMI, 1989; ARREDONDO-JIMENÉZ; MACHADO, 2012; VALDEZ-DELGADO, 2006).

A atuação do DFB está relacionada a inibição da síntese da quitina durante o desenvolvimento dos estádios imaturos, resultando na malformação da nova cutícula e outras alterações nos processos fisiológicos de várias espécies de artrópodes (MULDER; GIJSWIJT, 1973 ; XIN et al., 2021). A mortalidade ocorre pela interferência no processo de muda, reduzindo a emergência de adultos, a fecundidade e fertilidade dos mosquitos (MARTINS; DA SILVA, 2004).

DFB também pode atuar como ovicida pela administração em insetos adultos, impedindo a eclosão dos ovos (WRIGHT; HARRIS, 1976; MOORE; TAFT, 1975). Assim, DFB é amplamente utilizado para o controle de pragas e insetos nas mais variadas culturas tais como, algodão, citros, fumo, milho, soja e tomate. Em bovinos, este inseticida tem sido recomendado e comercializado para o controle e prevenção do desenvolvimento da infestação por mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*), mosca doméstica (*Musca domestica*), mosca-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*) e por carrapato (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*).

No Brasil, o diflubenzuron é fabricado pela Champion Saúde Animal na forma do produto veterinário Difly S3, amplamente utilizado no controle de parasitas em bovinos e aves. Sua fórmula contém 3% de diflubenzuron como princípio ativo e 97% de excipientes que facilitam a manipulação e administração do produto, geralmente misturado à ração ou sal mineral.

2.4.1. Inibição da síntese de quitina

Em nematoides, a quitina é encontrada nas cascas de ovos de diversas espécies de vida livre (WHARTON, 1980) e parasitas (BRYDON et al., 1987), e na casca do ovo ou bainha modificada que envolve larvas de primeiro estágio de nematoides filariais (FUHRMAN; PIESSENS, 1985).

A quitina na casca do ovo fornece suporte mecânico e impermeabilidade química essencial ao desenvolvimento de embriões, sendo também um componente

indispensável envolvido no desenvolvimento e funcionalidade da faringe das larvas (ZHANG et al., 2005).

Assim como nos insetos, os nematoides passam por processos de muda periódica para crescer e se desenvolver (NASCIMENTO, 2009). Durante a muda, ocorre a degradação da cutícula antiga e a síntese de uma nova, envolvendo a separação das células epidérmicas da cutícula antiga e a secreção de uma nova cutícula (NIELSEN, 2012; PURVES et al., 2004). A formação da nova cutícula inicia-se após a secreção de proteínas e fibras de quitina pelas células epidérmicas, resultando na pro-cutícula, que protege a epiderme contra enzimas digestivas. Por fim, ocorre a liberação da cutícula velha e a expansão da nova antes de seu enrijecimento (SANTOS, 2020).

Em insetos, qualquer interferência nos estádios relacionados ao processo de muda, seja por hormônios endógenos ou por análogos sintéticos desses hormônios, pode interromper seu desenvolvimento (HOFFMANN & LORENZ, 1998). Diferentemente dos análogos do hormônio juvenil, os inibidores de quitina atuam nas larvas especificamente durante a muda, impedindo a completa liberação da antiga cutícula. Esse efeito é atribuído à inibição da deposição de quitina, o que impossibilita a remoção adequada da cutícula velha (MACHADO, 2012; MULLA, 1995).

O estudo do metabolismo da quitina em nematoides é essencial para o desenvolvimento de estratégias de controle, pois a inibição de enzimas como a quitina sintase, responsável pela biossíntese da quitina, e a quitinase, que degrada a quitina durante a muda, pode impactar o desenvolvimento desses organismos. A aplicação de substâncias como a quitina e a quitosana tem sido estudada no manejo de nematoides fitoparasitas. Por exemplo, a aplicação de quitina no solo pode aumentar a população de micro-organismos quitinolíticos, que degradam a quitina, contribuindo para a redução de nematoides parasitas. Além disso, a quitosana pode induzir a atividade de enzimas como a quitinase nas plantas, fortalecendo suas defesas naturais contra infecções por nematoides (MOTA, 2015).

2.4.2. Eficácia em nematoides

Vide a importância da quitina em nematoides, a inibição de sua síntese pode impedir a formação do ovo ou da embriogênese, reduzindo a emergência das larvas

bem como prejudicando os processos alimentares. Assim, estudos iniciais foram realizados com fitonematoides (VEECH, 1977, 1978a), nematoides de vida livre (VEECH, 1978b) e nematoides parasitos de animais (FETTERER; URBAN; MILLER, 1989), demonstrando o potencial do DFB no controle desses parasitas.

Além disso, em estudo anterior realizado por Miranda (2022), o DFB foi testado em cultivos fecais de ovinos e equinos, demonstrando redução larval máxima de 92,5% e 58,8%, respectivamente, quando utilizada a concentração de 30 mg/mL de DFB em 2 g de amostra fecal (Figura 6). Também verificamos atividade ovicida do DFB em cultivos de ovos de *Ascaridia galli*, na qual o inibidor de quitina não impediu o desenvolvimento larval dentro dos ovos de *A. galli*, mas bloqueou sua eclosão no meio de cultura, enquanto algumas larvas eclodiram no grupo controle (Figura 7). Já ao avaliar a inibição da quitina em cultivos com *Panagrellus* spp. verificamos que as larvas cultivadas na ausência de DFB se tornam fluorescentes após a marcação para quitina (Figura 8A- D), enquanto aquelas cultivadas com DFB não apresentam fluorescência (Figura 8E - H).

Embora os resultados obtidos demonstrem a eficácia do DFB em inibir a síntese de quitina e impactar o ciclo de vida dos nematoides, pouco se sabe sobre as alterações estruturais específicas causadas por esse inibidor nos parasitos. Assim, estudos adicionais são necessários para avaliar, em detalhe, possíveis mudanças morfológicas e ultraestruturais em larvas tratadas com DFB. A análise dessas alterações, utilizando técnicas como microscopia eletrônica e fluorescência, pode elucidar os mecanismos de ação do DFB e fornecer esclarecimentos importantes para otimizar seu uso no controle de nematoides gastrintestinais.

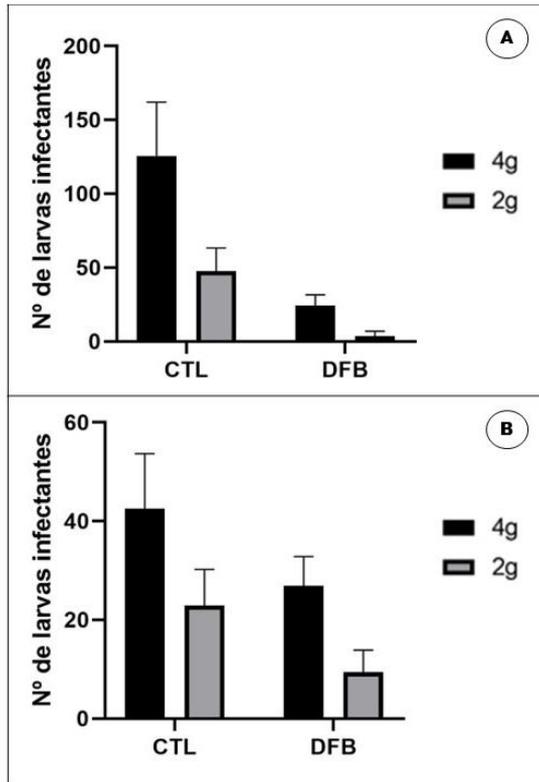


Figura 6. Número médio de L3 em cultivos fecais de ovinos (A) e equinos (B) contendo 2 e 4g e tratados ou não com DFB a 30mg/mL, incubados por sete dias. As barras representam o erro padrão da média (\pm EPM). Houve diferença significativa nos tratamentos pela aplicação do teste de Tukey ($p < 0,05$). Fonte: MIRANDA (2022).

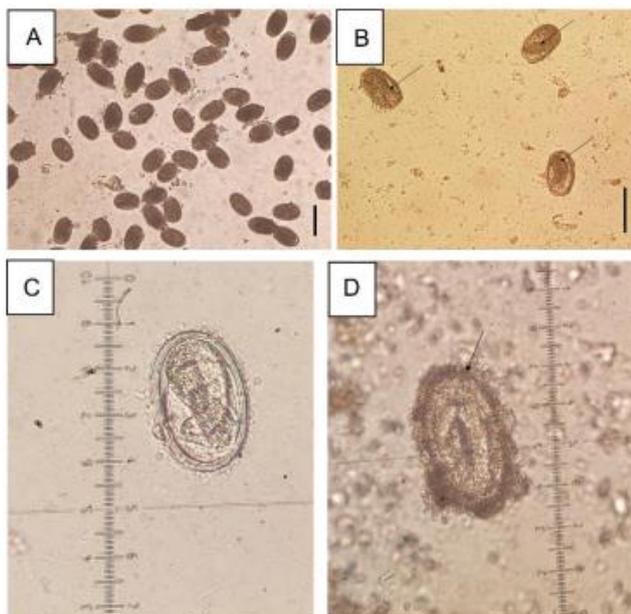


Figura 7. Ovos extraídos de fêmeas de *A. galli*. Dia 0 (A), dia 6 (B) e dia 21 (C, D). Seta em B indicando embrião em desenvolvimento. Ausência (C) e presença (D) do DFB. Seta em D indica presença de agregamento de particulados na casca do ovo. Possível visualizar a larva formada em ambos os ovos tratados e controle (C, D). Barras: 75 μ m. Fonte: MIRANDA (2022).

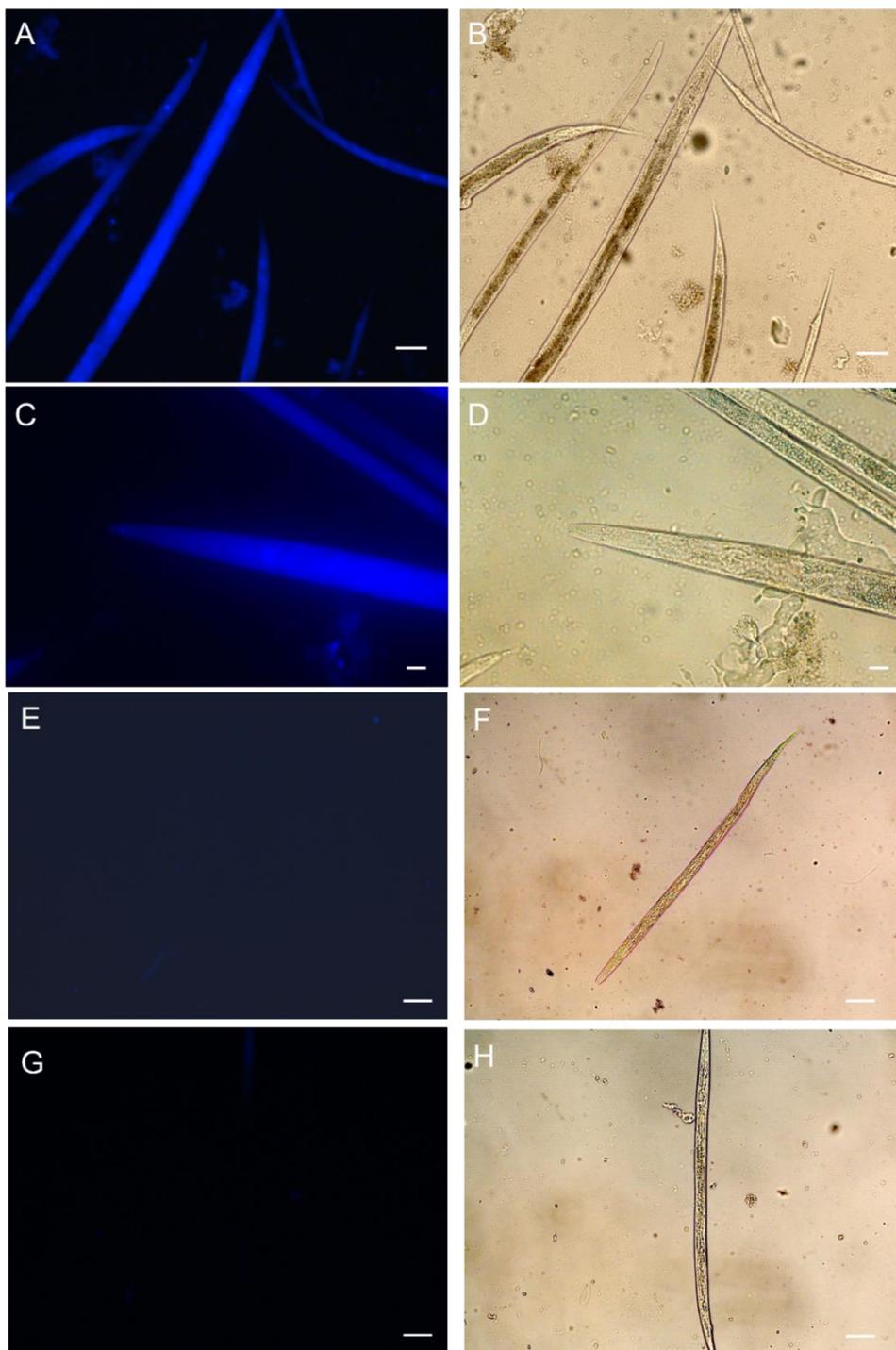


Figura 8. Fluorescência de *Panagrellus* spp. cultivados por sete dias em tratamento ou controle. *Panagrellus* spp. cultivados em placas de 24 poços. Ausência (A-D) e presença (E-H) de DFB. Amostras submetidas à coloração com Calcofluor White e hidróxido de potássio a 10%. Visualização dos nematoides em microscopia de fluorescência (A, C, E, G) na excitação de 360 nanômetros (ultravioleta) e emissão 435-445 nanômetros (azul). Visualização dos nematoides em microscopia de campo claro (B, D, F, H). Barra de escala: 100 μ m. Fonte: MIRANDA (2022).

3. OBJETIVO

Analisar o efeito nematicida *in vitro* do diflubenzuron sobre larvas de nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Padronizar nova técnica de cultivo *in vitro* de nematoides gastrintestinais em solução fecal de equinos e ovinos;
- Investigar o uso da fluorescência da *E. coli* como biomarcador para monitorar interações com nematoides e analisar possíveis alterações estruturais via microscopia confocal;
- Demonstrar alterações morfológicas e ultraestruturais em larvas de nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos expostos ao DFB via microscopia óptica e eletrônica.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção dos ovos

Para obtenção dos ovos e larvas, amostras fecais foram coletadas diretamente da ampola retal de equinos e ovinos naturalmente infectados, oriundos do curral da UENF. Os animais apresentavam histórico de criação extensiva e não foram submetidos a tratamentos anti-helmínticos nos 60 dias anteriores à coleta. As amostras foram armazenadas sob-refrigeração até análise posterior em laboratório. As amostras fecais foram homogeneizadas, pesadas e a contagem dos ovos por gramas de fezes (OPG) foi realizada para confirmar infecção parasitária, sendo utilizada a técnica de Gordon e Whitlock (1939).

As amostras fecais com contagem dos ovos por grama (OPG) com valores superiores à 300 foram processadas com base em Bizimenyera et al. (2006). As amostras foram passadas por um conjunto de 7 peneiras granulométricas com aberturas de 24, 48, 80, 100, 200, 270 e 400 mesh a fim de reter os ovos. Uma porção de solução fecal (SF) preparada da filtragem foi transferida para um tubo Falcon e usada posteriormente.

Os ovos retidos ao final da filtragem nas peneiras foram transferidos a tubos Falcon de 15 mL e levados para centrifugação a 1932 g. Este procedimento foi repetido adicionando água salina e o sobrenadante resultante, descartado em peneira com abertura de 400 mesh. O sobrenadante foi lavado com água destilada abundante a fim de retirar os resíduos de solução salina. Posteriormente, os ovos coletados foram transferidos para um tubo Falcon e utilizados em seguida.

4.2. Teste de eclosão

4.2.1. Meio nutritivo

Em uma placa de 24 poços, um grupo teste foi preparado pela adição de 200 µL de solução contendo \pm 100 ovos mais 200µL de SF em cada poço. Um grupo controle foi preparado, utilizando uma solução de água destilada e ovos em igual volume. A placa foi incubada durante 7 dias em condições ideais para o desenvolvimento de larvas, sendo analisada a cada 24 horas em microscópio óptico.

4.2.2. Químicos

As soluções de DFB e Difly S3 foram preparadas da seguinte maneira: 10mg de DFB foi solubilizado em 1mL de DMSO e posteriormente 100 microlitros diluídos em 9ml de água para adequar o solubilizante a concentração de 1%. Ao final a solução de DMSO 1% continha 100 µg de DFB. Para Difly S3 30 mg foram solubilizados em 10ml de água destilada.

Para os testes, em uma placa de 24 poços, foram adicionadas 20 µL de solução contendo ± 100 ovos, mais 200µL de SF em cada poço. Após, dois grupos tratados foram preparados com 200 µL de DFB ou Difly S3. Dois controles foram utilizados, um contendo 200µL de água destilada e outro 200µL de DMSO 1%. O teste foi feito em triplicatas.

As placas foram incubadas por um período de 7 dias em temperatura ambiente para o desenvolvimento dos estádios larvares (L1, L2 e L3). As larvas eclodidas foram analisadas em microscópio óptico e eletrônico.

Uma segunda placa de 24 poços foi preparada substituindo o SF por 200 µL de *Escherichia coli* tratada com isotiocianato de fluoresceína. As condições de incubação e os tratamentos foram mantidos, e as larvas eclodidas foram analisadas em microscópio confocal. O objetivo dessa abordagem foi utilizar a fluorescência da *E. coli* como biomarcador.

4.3. Coprocultura

O teste foi feito de acordo com a metodologia proposta por Cruz (2005), basicamente: amostras fecais com OPG acima de ≥ 300 ovos foram homogeneizadas e pesadas 4 gramas em copos descartáveis de 50mL. Os copos foram acondicionados em caixas plásticas contendo 100mL de água destilada que foram vedadas com um filme plástico e incubadas por 7 dias em temperatura ambiente (Figura 9).

Após esse período, os copos foram preenchidos com água destilada e invertidos sobre placas de Petri, sendo adicionada 10mL de água destilada no bordo das placas (Figura 10).

Após 4 horas, a água em repouso contendo as larvas infectantes (L3) foi coletada e transferida para garrafas de cultura de 30mL. As larvas recuperadas das

culturas de fezes ovinas foram identificadas ao nível de gênero, utilizando a chave de identificação proposta por Keith (1953) e van Wyk et al. (2004) enquanto para as fezes equinas fez uso dos trabalhos de Madeira de Carvalho et al. (2007, 2008).



Figura9. Coproculturas incubadas em copos descartáveis de 50mL. Fonte: Cruz (2005).



Figura10. Coproculturas invertidas sobre placas de Petri. Fonte: Cruz (2005).

4.4. Identificação das larvas

As larvas foram identificadas morfológicamente conforme as chaves de identificação propostas por Keith (1953) e van Wyk et al. (2004) para parasitos ovinos, e Madeira de Carvalho et al. (2007, 2008) para equinos, permitindo a caracterização dos gêneros predominantes. Os isolados de ovinos apresentaram predominância de *Haemonchus* (91%), *Trichostrongylus* (8%) e *Oesophagostomum*

(1%). Já nos isolados de equinos houve predominância do grupo Cyatostomineos (97%) e *Strongyloides westeri* (3%).

4.5. Preparação do material para microscopia

As larvas dos nematoides parasitos previamente descritos em interação com DFB, Difly S3 ou controles foram transferidos para eppendorfs e processadas com base em De Souza et al. (1989, 2007). Assim, foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, formaldeído a 4%, CaCl₂ a 5mM em tampão cacodilato de sódio (t. CaCO) a 0,1M, pH 7,2, por 2 horas em temperatura ambiente. Após, o material foi lavado 3 vezes em t. CaCO, durante 20 minutos cada lavagem. Parte das larvas foram reservadas para observação em microscopia optica diretamente sem fixação.

4.5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão – MET

O material foi pos fixado em Tetróxido de Ósmio 1% à 1h no escuro, e novamente lavado 3x em tampão t. CaCO. E, seguida, o material foi desidratado em séries crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90%) durante 40 minutos cada, seguido de três tratamentos em acetona 100% durante 30 minutos cada. Após, foi realizada infiltração em acetona/Spurr em diferentes proporções (3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, Spurr puro) sendo a troca de cada proporção realizada a cada 12h. Após a infiltração, as amostras foram incluídas em resina Spurr em eppendorfs devidamente identificados. Tal material foi levado para estufa 60° durante 48h.

Foram obtidos cortes semi-finos de 0,5µm para Microscopia óptica (M.O.) e ultrafinos de 70nm para Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.). Os cortes foram coletados em grades de Cobre 8 de 300 mesh. Para observação em M.E.T., os cortes foram contrastados em acetato de uranila 1% e Citrato de chumbo 5%, durante 20 e 4 minutos respectivamente e lavados em água destilada em seguida. Para observação em M.O. os cortes foram corados em azul de Toluidina 1%. O material foi observado em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL® JEM-2100Plus).

4.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A desidratação do material foi feita em séries crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), sendo para cada serie deixado por 40 minutos e a última

série 3x de 30 minutos cada. Seguindo-se, as amostras foram acondicionadas em gaiolas individuais, devidamente identificadas para secagem ao Ponto Crítico (Critical Point Dryer) em CO₂. Após, o material foi montado sobre stubs com fita dupla face de carbono e em seguida metalizado com ouro. O material foi observado em microscópio eletrônico de varredura (JEOL® JSM-IT210).

4.5.3. Microscopia Óptica

Após o período de cultivo, as amostras tratadas com DFB ou controle foram depositadas em uma lâmina de microscopia, e sobre esta lâmina foi acrescentado o fixador formaldeído a 4%, sendo a amostra deixada em repouso por 1 minuto. Por fim, cobriu-se a solução com uma lamínula. Os nematoides foram visualizados em microscopia de campo ótica com auxílio do microscópio ZEISS Axioplan acoplado com o sistema de captura de imagem AxioCam MRc 5.

4.5.4. Microscopia Confocal

Os cultivos com *E. coli* recombinante foram examinados com um microscópio confocal a laser (ZEISS® LSM 710). As amostras foram fixadas com formaldeído a 4% e visualizadas por epifluorescência, utilizando um filtro de excitação na faixa de 490-494 nm para emissão de fluorescência verde (520-525 nm) proveniente da proteína GFP. Além disso, cultivos *sem E. coli* também foram analisados sob as mesmas condições experimentais.

5. RESULTADOS

5.1. Análise do meio nutritivo

Após 24 horas de cultivos, ambos os ovos cultivados em meio SF e água destilada eclodiram. Após três dias de cultivo, foi possível observar estádios L2 nos cultivos em SF, ao passo que no controle as larvas estavam menos ativas, com uma porção da população já morta. Após cinco dias, já era possível observar larvas L3 nos cultivos em SF, enquanto que no controle a população larval já se encontrava quase morta. Com sete dias, as larvas cultivadas em SF ainda continuavam vivas e ativas, enquanto que a população larval controle já estava toda morta.

5.2. Análise de eclosão de larvas

Não foi observada inibição da eclosão de larvas oriundas de equinos e ovinos submetidas aos tratamentos com DFB e Difly S3, uma vez que, após 24 horas de incubação, já era possível verificar a eclosão dos ovos.

5.3. Análise de microscopia optica

Larvas infectantes (L3) de ovinos e equinos analisadas no controle mantiveram sua integridade corporal, sendo possível observar a dupla cutícula e os órgãos internos filamentosos (Figura 11 A e Figura 12 A, D). Por outro lado, larvas tratadas com DFB (Figura 11 B e Figura 12 B, E) e Difly S3 (Figura 11 C e Figura 12 C, F) demonstraram degeneração interna, resultando na morte larval antes de chegar ao estágio L3.



Figura11. Larvas de amostras fecais ovinas após 7 dias de cultivo em Solução Fecal. L3 na ausência de tratamento (A). Larvas na presença de DFB (B) e Difly S3 (C). Visualização dos nematoides em microscopia de campo claro. Barra de escala: 20 μ m.

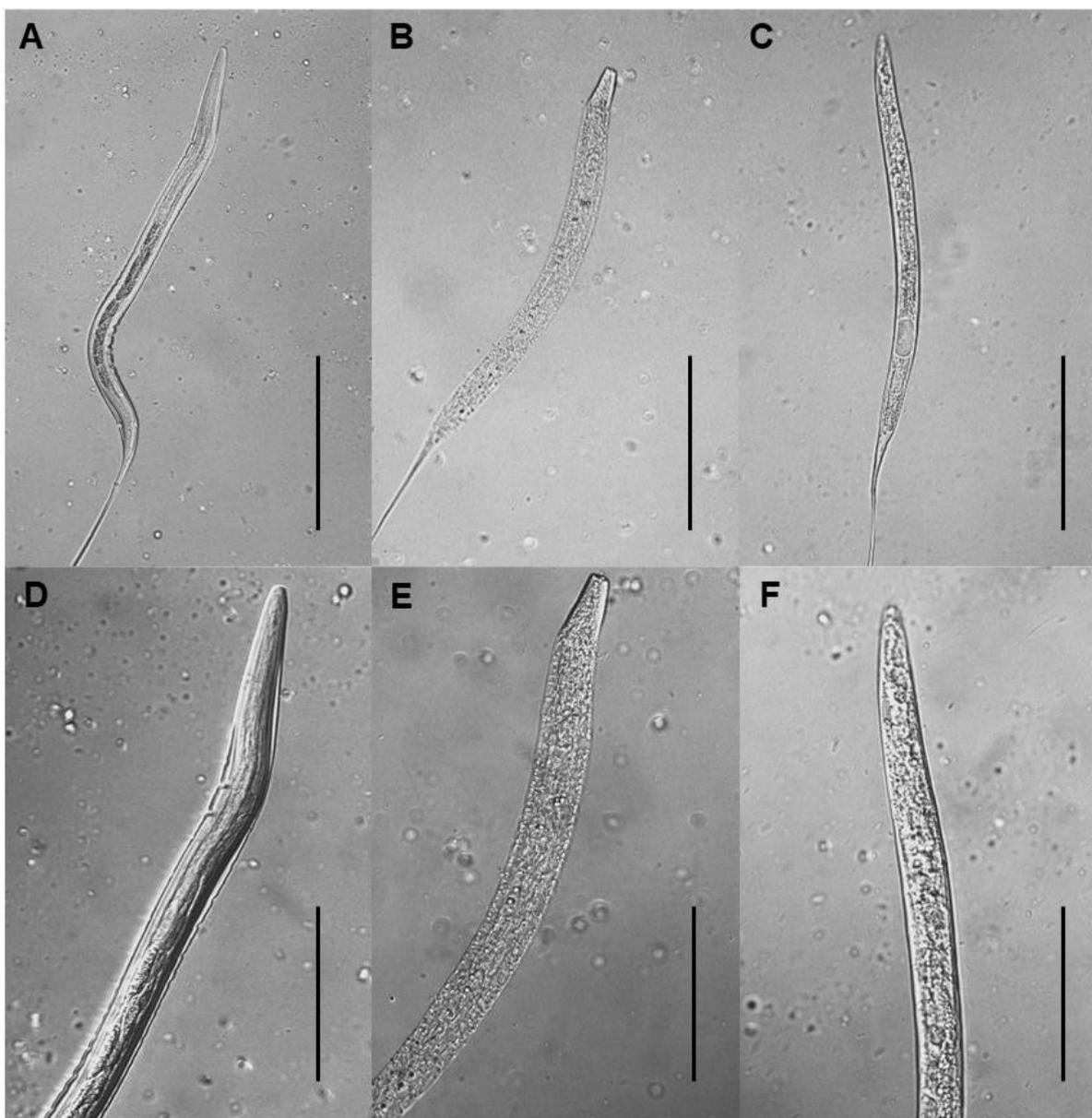


Figura12. Larvas de amostras fecais equinas após 7 dias de cultivo em SF. L3 na ausência de tratamento (A, D). Larvas na presença de DFB (B, E) e Difly S3 (C, F). Visualização dos nematoides em microscopia de campo claro. Barra de escala: 20 μ m.

Nos ensaios com *E. coli* com biomarcador, observou-se fluorescência em todo comprimento do corpo das larvas do grupo controle (Figura 13 A). Já larvas incubadas com DFB apresentaram falhas de fluorescência em todo seu comprimento corporal, evidenciando a degeneração de seu conteúdo interno (Figura 13 C). Além disso, verificou-se que nematoides cultivados na ausência do biomarcador também exibiram fluorescência (dados não mostrados).

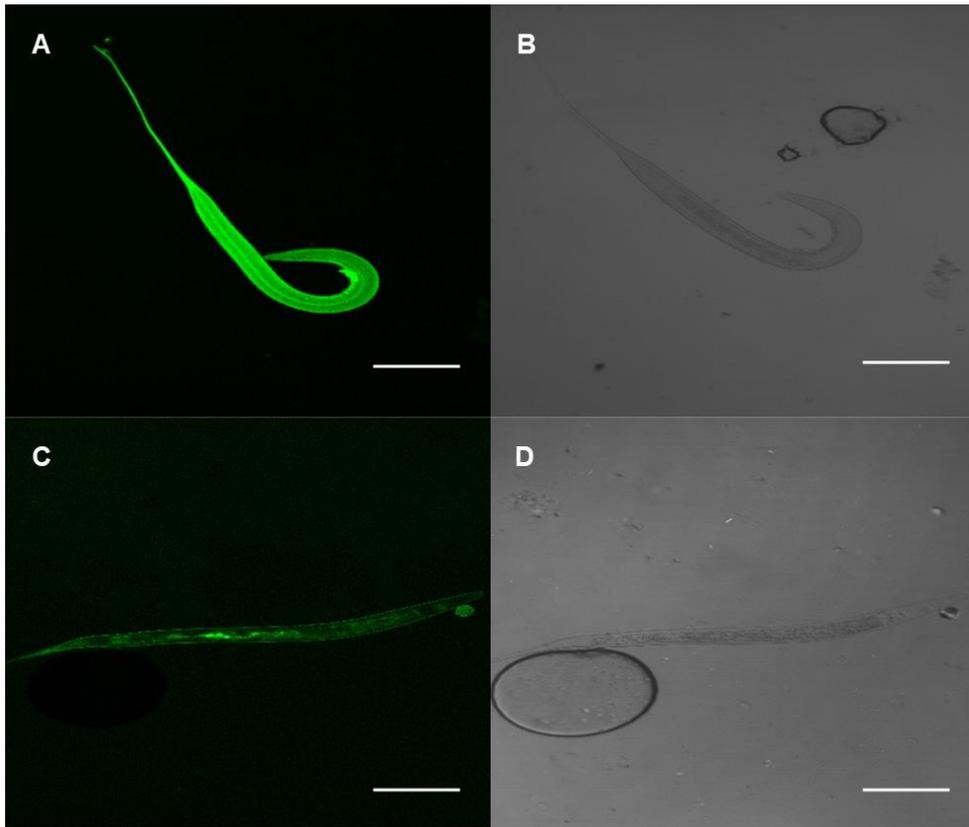


Figura13. Microscopia confocal de nematoides gastrintestinais de equinos cultivado por 7 dias em DFBou controle. Larvas cultivadas com *E. coli* tratada com isotiocianato de fluoresceína. . L3 incubada em 200 μ L de água destilada (A, B); larva incubada com 10mg/ml de DFB (C, D). Visualização dos nematoides por epifluorescência (A, C) com comprimento de onda na faixa de 490-494 nm. Visualização dos nematoides em campo claro (B, D). Barra de escala: 20 μ m.

5.4. Análise de Microscopia Eletrônica

5.4.1 Transmissão

Secções ultrafinas de larvas L3 do grupo controle revelam uma morfologia interna típica (Figura 14 A, B). Em contraste, larvas que atingiram o estágio L3 nos grupos tratados com DFB apresentaram um padrão irregular das estrias da cutícula em várias regiões do corpo no entanto, suas células internas permaneceram íntegras (Figura 14 C, D). Já as larvas que não completaram a transição para L3 exibiram ruptura da hipoderme, com extravasamento do material intracelular para o espaço entre a hipoderme e a cutícula, o que levou à deformação do corpo larval (Figura 14 E). Além disso, uma alta concentração de vesículas eletrodensas pôde ser observada, a cutícula se mostrou degenerada, com perda total de seu padrão de estriagem, e as células internas mostraram-se distorcidas e eletrodensas (Figura 14

E, F).

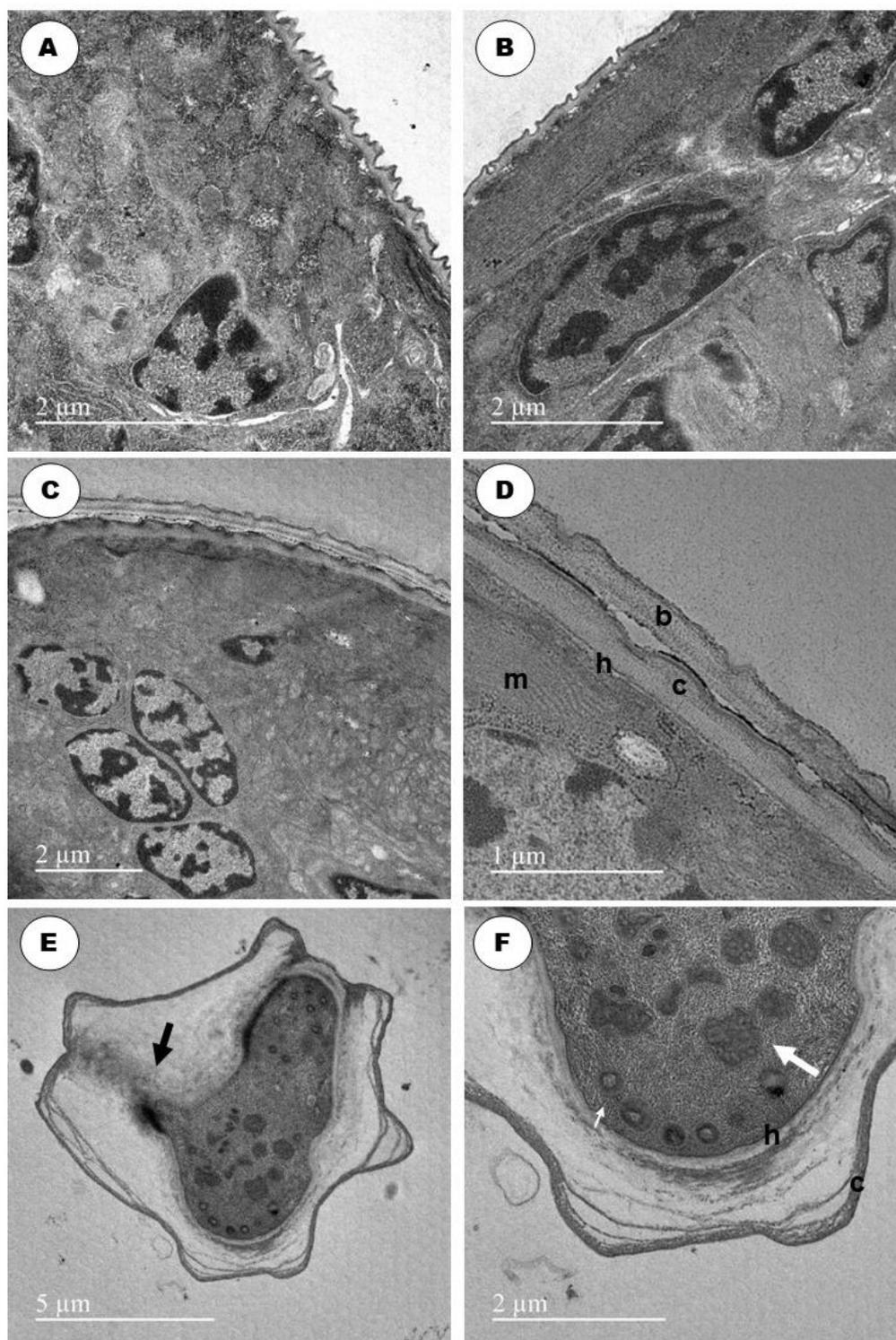


Figura14. Microscopia eletrônica de transmissão de nematoides gastrintestinais de ovinos tratados com diflubenzuron e não tratados. L3 incubada em condição controle (A, B)* ; L3 incubada com 10mg/ml de DFB (C, D); larva de estágio anterior ao L3 incubada em 10mg/ml de DFB (E, F). b – bainha, c – cutícula, h– hipoderme, m – células musculares somáticas. Seta preta

indicando extravasamento do material intracelular. Seta branca pequena indicando vesículas eletrodensas. Seta branca grande indicando células eletrodensas.

5.4.2 Varredura

As larvas analisadas do grupo controle (H_2O e DMSO 1%) mantiveram a integridade estrutural da bainha com um padrão normal de cristas transversais e a forma cilíndrica do corpo foi preservada (Figura 15). Por outro lado, larvas expostas ao DFB e Difly S3 evidenciaram uma perda de integridade estrutural da bainha (Figura 16), perdendo sua forma cilíndrica e apresentando uma superfície irregular. As larvas em tratamento apresentaram perda de turgor corporal (tc) e depressões (d) ao longo da bainha, além de perda do padrão de cristas transversais (pct), em comparação ao grupo controle.

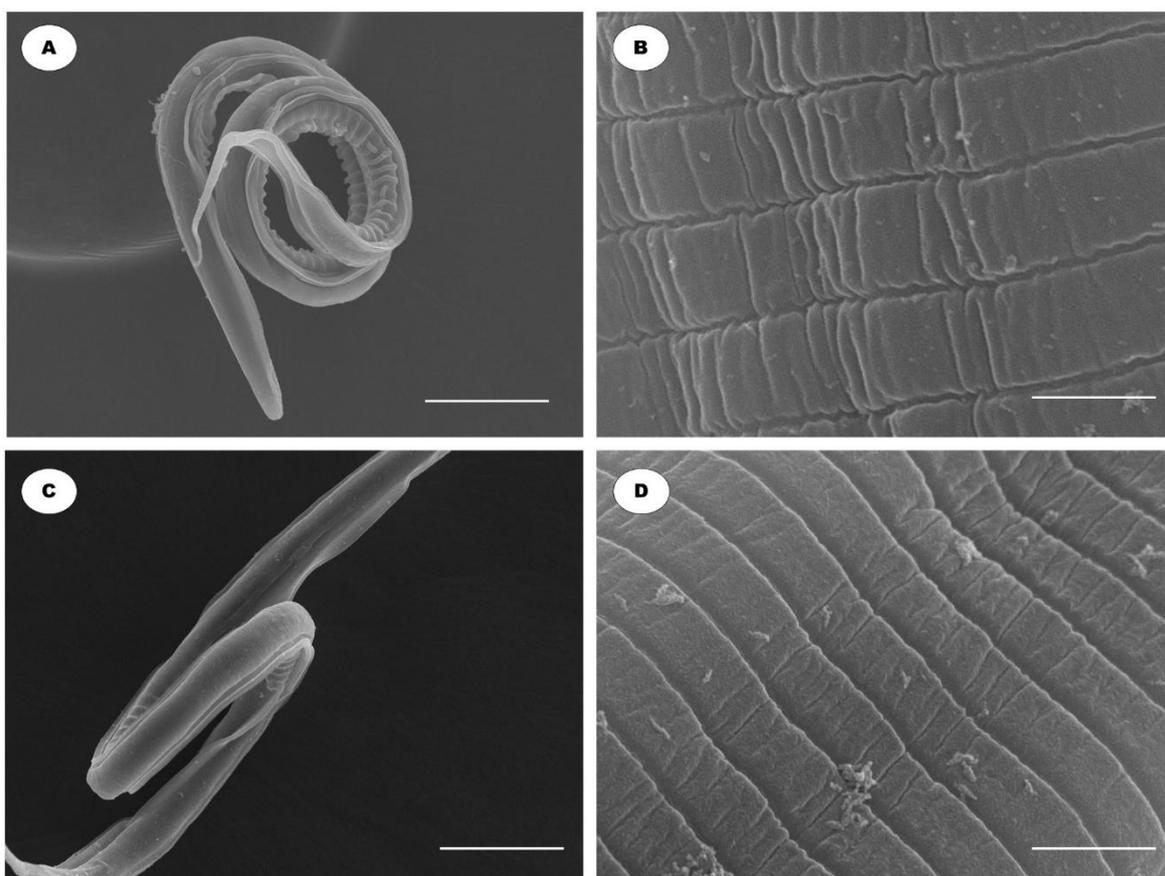


Figura15. Microscopia eletrônica de varredura de nematoides gastrointestinais de ovinos cultivados em condições controle. Larva incubada em 200 μ L de água destilada (A, B); larva incubada em 200 μ L de DMSO 1% (C, D). Padrão de cristas transversais em B e D. Barra de escala: 20 μ m e 1 μ m.

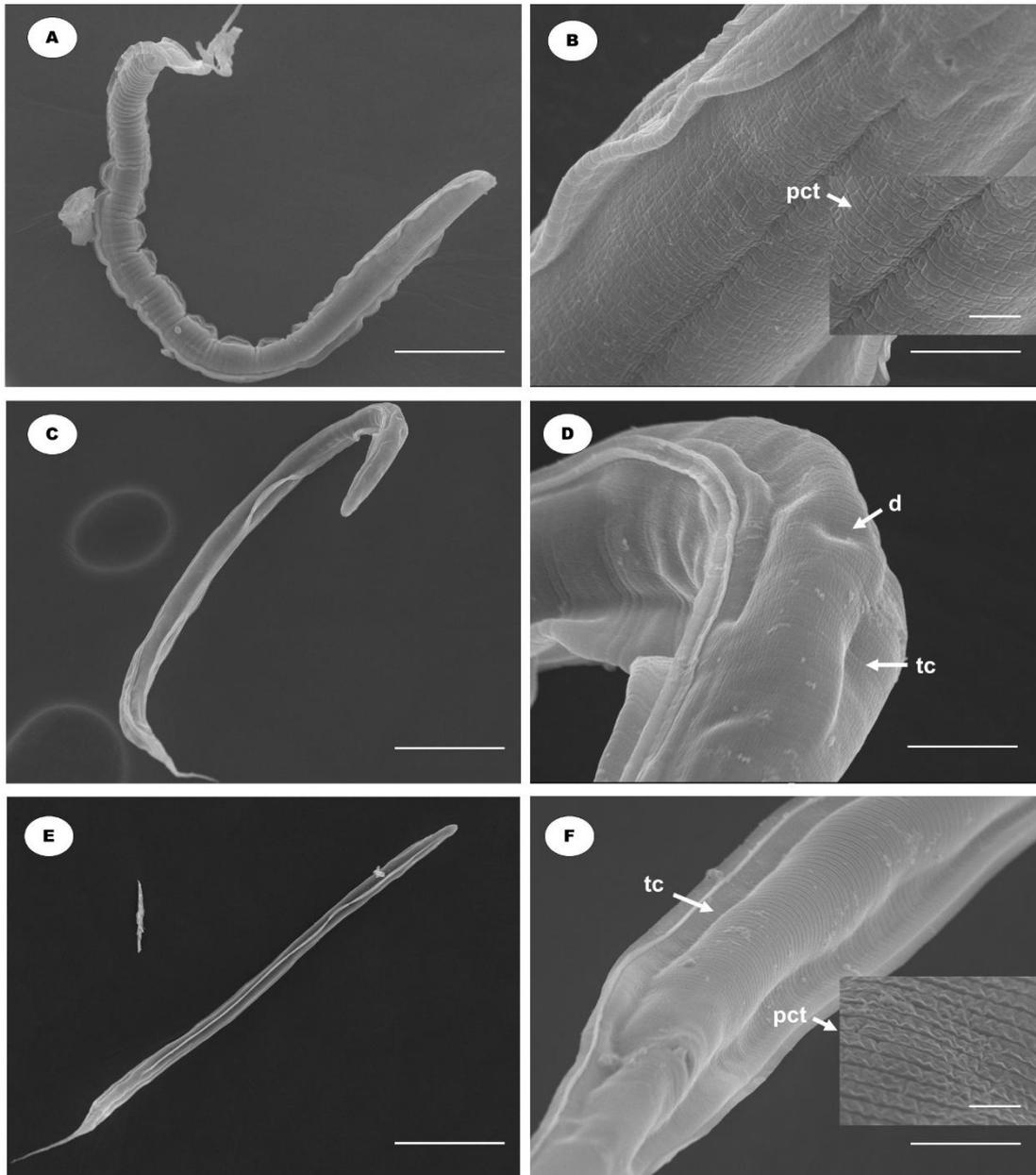


Figura16. Microscopia eletrônica de varredura de nematoides gastrointestinais de ovinos tratados com diflubenzuron. Larva incubada com 10mg/ml de DFB (A, B); larva incubada em 10mg/ml de Difly S3 (C – F). Perda de turgor corporal (tc); depressões (d); perda do padrão de cristas transversais (pct), evidentes em B, D e F. Barra de escala: 20 µm, 5 µm e 1 µm.

6. DISCUSSÃO

6.1. Aproveitamento de Fezes como Meio para Cultivo *In Vitro* de Nematoides Gastrointestinais

A fim de averiguar a possibilidade de cultivo *in vitro* de nematoides gastrintestinais que simule o ambiente no pasto, ensaios foram executados utilizando como meio nutritivo uma solução fecal (SF) proveniente das fezes dos animais infectados. Os resultados demonstraram que os cultivos em SF permitiram a evolução das larvas até o estágio L3, ao passo que no controle as larvas não alcançaram esse estágio e não sobreviveram. Nesse contexto, o cultivo efetuado no presente trabalho se assemelha ao cultivo padrão de nematoides com *E. coli*, apresentando-se como uma alternativa mais econômica e que promove o reaproveitamento das amostras fecais obtidas dos animais infectados.

De fato, o cultivo de nematoides com *Escherichia coli* é uma prática comum, especialmente em estudos com *Caenorhabditis elegans*, pois essa bactéria é de fácil cultivo e fornece uma boa base nutritiva (LEWIS; FLEMING, 1995). Fora do ambiente laboratorial, os parasitos são eliminados como ovos nas fezes e passam por três estádios larvais até serem ingeridos novamente pelo hospedeiro. Durante a fase de vida livre, as larvas utilizam nutrientes presentes no pasto, que contém matéria orgânica, inorgânica e diversos microrganismos (SALLES et al., 2019). Amaradasa et al. (2010) ressaltam que características do solo, como umidade, textura e biologia, também influenciam a sobrevivência e migração das L3 de *H. Contortus*.

6.2. Atividade Ovicida do DFB em Nematoides e Insetos

DFB atua na inibição da síntese da quitina e aqui confirmamos dados prévios de Miranda (2022) que o mesmo não inibe a eclosão de larvas oriundas de equinos e ovinos uma vez que, após 24 horas de incubação com DFB e Difly S3 foi possível verificar a eclosão dos ovos nos cultivos com meio nutritivo SF.

O modo de atuação do DFB como inseticida está relacionado à inibição da síntese da quitina e conseqüente interferência na deposição da cutícula (MULDER; GIJSWIJT, 1973). Por conta da sua atividade, duas observações são geradas: o tratamento de insetos adultos não resulta em morte e insetos imaturos não perecem até a próxima muda. No primeiro caso, a cutícula final já foi depositada, não havendo

meio pela qual o DFB possa bloquear a síntese quitina. Já no segundo caso, a nova muda infere na deposição de nova cutícula, podendo o inseticida bloquear seu desenvolvimento através da quitina (VEECH, 1978a).

Contudo, o tratamento de insetos adultos não chega a ser em vão, sendo possível o controle das pragas a partir da próxima geração. Isso se dá por meio da atividade ovicida do DFB. Elings e Dieperink (1974) foram os primeiros a demonstrar a não eclosão de ovos após ingestão de DFB por insetos adultos. O mesmo efeito foi posteriormente observado em bicudo-do-algodoeiro (MOORE e TAFT, 1975), mosca-dos-estábulo e mosca-dos-chifres (WRIGHT e HARRIS, 1976), na qual os ovos embrionados não eclodiram as larvas imaturas.

Estudos com fitonematoides já demonstraram atividade ovicida do DFB (VEECH, 1977, 1978b). Sobre seu efeito em nematoides gastrintestinais, o estudo de Fetterer et al. (1989) verificou inibição da síntese de quitina de ovos isolados de *Ascaris suum*, demonstrando que a síntese de quitina pode ser bioquimicamente semelhante em nematoides e insetos. Adicionalmente, em ensaios *in vitro* com *Ascaridia galli* a adição do DFB impediu a eclosão de ovos, embora não tenha interrompido seu desenvolvimento larval (MIRANDA, 2022).

Porém, a atividade ovicida do DFB em ovos de nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos não foi observada, sendo que após 24 horas do cultivo já era possível verificar a eclosão de larvas imaturas dos nematoides (MIRANDA, 2020). No estudo de Fetterer et al. (1989) em ovos do nematoide parasita de ovinos *H. contortus*, resultados semelhantes foram verificados pela administração de 10µg/mL em cultura contendo aproximadamente 100-200 ovos.

Pode ser argumentado que as diferenças encontradas em ovos de *A. galli* e nematoides gastrintestinais de ovinos e equinos se deram pelos diferentes ciclos de vida encontrados entre as espécies. No caso de *A. galli*, as larvas desenvolvem até o estágio infectante dentro do ovo num período de até 21 dias, sendo tempo suficiente para penetração do DFB na casca do ovo e inibição da eclosão de larvas. No entanto, o que se encontra em muitas espécies nematoides de ovinos e equinos é o desenvolvimento das larvas até fase infectante ocorrendo no ambiente. Esse desenvolvimento também pode se mostrar mais rápido em comparação com *A. galli*, como em *H. contortus*, na qual ocorre em apenas 4 – 6 dias em condições ideais de temperatura (MARCHIONDO et al., 2019). Tal fato poderia indicar que o DFB não

teve tempo suficiente para atuar como ovicida em espécies com desenvolvimento do estágio infectante fora do ovo.

Veech (1977, 1978a, 1978b) argumentou que a atividade ovicida do DFB é expressa de modo diferente aos insetos, já que observou redução em massa de ovos de fitonematoides tratados com o inseticida. O estudo demonstrou ainda que o tratamento com DFB impede a embriogênese ou a formação do ovo, ao invés de incapacitar a eclosão de ovos embrionados como observado em insetos. Contradizendo-o, o estudo de Miranda (2022) demonstrou que a atividade ovicida do DFB em *A. galli* foi similar ao encontrado em insetos. Entretanto, DFB demonstrou ineficiência de ação ovicida em nematoides equinos e ovinos. Pode-se afirmar que a atividade ovicida do DFB não é semelhantemente expressa entre os diferentes grupos do filo Nematoda.

6.3. Eficácia do DFB na Redução Larval e Combinação Terapêutica

Apesar do DFB não impedir a eclosão de ovos de nematoides gastrintestinais equinos e ovinos, este se mostra eficaz nos testes de coprocultura. Fetterer, Urban e Miller (1989), verificaram redução do número de L3 em coproculturas de ovinos infectados com *H. contortus*. Além disso, no estudo anterior realizado por Miranda (2022) foi observada redução larval máxima de 92,5% e 58,8% nas coproculturas de ovinos e equinos respectivamente, fazendo-se uso de 30mg/mL do DFB em 2g de amostra fecal.

Embora ambas as reduções estejam abaixo do limite de 95% estabelecido pela WAAVP (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) para caracterizar resistência anti-helmíntica, isso não implica em ineficácia total do composto. A resistência é mais provável quando se utiliza um único princípio ativo de forma contínua. Nesse contexto, a combinação de diflubenzuron com outros anti-helmínticos pode ser uma estratégia eficaz para ampliar o controle parasitário e reduzir a pressão seletiva sobre os parasitos. A terapia combinada pode agir sinergicamente, atacando diferentes estágios do ciclo de vida dos parasitos e minimizando o risco de resistência, existindo diversos estudos demonstrando sua eficiência em comparação com o uso de um único anti-helmíntico (LEATHWICK et al., 2016; PUSPITASARI et al., 2016; LUQUE et al., 2021). Aliado a práticas de manejo adequadas, como a rotação de fármacos, o diflubenzuron continua sendo

uma opção viável para o controle de nematoides gastrintestinais.

É argumentado por Fetterer et al. (1989) que a ação do DFB possa estar restrita aos estádios de vida livre de *H. Contortus*, pois foi verificado que o inseticida não impediu a eclosão de ovos *in vitro*, interrompeu o desenvolvimento das larvas em coproculturas e não alterou o desenvolvimento normal de uma infecção patente em cordeiros em testes *in vivo*. É possível que o mesmo fenômeno possa ocorrer nas análises com os nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos, porém testes *in vivo* não foram efetuados pelo nosso grupo para melhor averiguar a situação.

6.4. Alterações Estruturais em Nematoides Via Microscopia Óptica

Uma análise da consequência no parasita a um medicamento anti-helmíntico pode fornecer informações sobre a ação de tais compostos. A fim de melhor elucidar o efeito do DFB na estrutura corporal das larvas, ensaios *in vitro* foram realizados e analisados inicialmente em microscópio óptico. O tratamento de nematoides com DFB e Difly S3 demonstraram resultados similares – degeneração do conteúdo interno das larvas, levando à morte antes que elas atinjam o estágio L3 – indicando que a formulação de 97% de excipientes do inseticida comercial não interfere na sua atuação como anti-helmíntico. O efeito encontrado é similar ao observado com o tratamento de nematoides com benzimidazois, que também resultam em alterações degenerativas nas células intestinais, causadas pela inibição da polimerização de tubulina (MARTIN; ROBERTSON; BJORN, 1997).

Embora os mecanismos de ação do diflubenzuron e dos benzimidazois sejam diferentes, ambos comprometem funções essenciais nos nematoides. Em ambos os casos, a degeneração celular nos tecidos intestinais dos parasitas é um fenômeno comum, resultando em imobilização e falha na progressão dos estádios larvais, o que culmina na morte precoce dos nematoides. Tal achado reforça a ideia do diflubenzuron como uma estratégia de controle parasitário, com resultados comparáveis a outros agentes anti-helmínticos bem estabelecidos.

Ensaio conduzido com *E. coli* com biomarcador, analisado por microscopia confocal, revelou resultados semelhantes. Larvas tratadas com DFB apresentaram falhas de fluorescência em todo seu comprimento corporal, evidenciando a degeneração de seu conteúdo interno, que emitiu alguma fluorescência residual. Por outro lado, larvas incubadas na condição controle

exibiram fluorescência ao longo de todo o comprimento do corpo larval.

Embora o uso de *E. coli* com biomarcador tenha sido uma abordagem planejada para induzir fluorescência nos nematoides, nossos resultados mostram que as larvas de nematoides cultivadas sem o biomarcador ainda emitem fluorescência. Esse achado é consistente com a literatura, que sugere que muitos organismos, incluindo nematoides, podem apresentar autofluorescência natural. Qazi et al. (2020) observaram que diferentes helmintos exibem fluorescência característica quando iluminados em diferentes comprimentos de onda, mesmo sem a necessidade de coloração fluorescente. Qazi et al. (2020) ainda argumentam que as características espectroscópicas e a autofluorescência natural dos nematoides podem ser ferramentas promissoras para estudos taxonômicos e diagnósticos.

6.5. MET Revelou Efeitos na Morfologia e Ultraestrutura

A fim de elucidar o efeito do DFB na morfologia e ultraestrutura de nematoides gastrintestinais, foram realizadas análises por microscopia eletrônica. As secções ultrafinas de L3 controle analisadas via microscopia eletrônica de transmissão (MET), revelaram uma organização geral e uma estrutura da cutícula compatíveis com as descritas em estudos anteriores (BEUGNET et al., 1996; PAGE, 2001).

Assim como observado com extratos de *Cymbopogon citratus* (ROCHA et al., 2020), a exposição das larvas ao DFB provocou alterações estruturais, incluindo um padrão irregular das estrias cuticulares em várias regiões do corpo, modificações na hipoderme e a presença de vesículas eletrodensas. No entanto, enquanto no presente estudo as células internas das larvas tratadas que atingiram o estágio L3 permaneceram íntegras, no estudo de Rocha et al. (2020), células intestinais foram afetadas, apresentando vacuolização e distorção. Além disso, mitocôndrias danificadas, sem matriz e cristas, foram relatadas nesse estudo comparativo, um achado que não foi observado na presente análise.

Embora não tenham sido identificados danos significativos nas larvas L3, larvas que não alcançaram esse estágio apresentaram maior sensibilidade ao DFB, exibindo ruptura da hipoderme, extravasamento celular, deformação corporal, degeneração da cutícula, células internas distorcidas e eletrodensas, além de uma alta concentração de vesículas eletrodensas. As alterações celulares e cuticulares

mais significativas observadas em estádios anteriores ao L3 sugerem que a suscetibilidade ao DFB varia conforme o estágio de desenvolvimento do parasito, sugerindo uma maior eficácia do composto em larvas mais jovens.

A presença de células eletrodensas sugere alterações morfológicas e bioquímicas induzidas pelo DFB, possivelmente associadas ao acúmulo de substâncias intracelulares ou danos às organelas, indicando um intenso estresse celular que pode comprometer funções essenciais e a viabilidade das células. Já a presença de vesículas eletrodensas pode representar uma resposta ao estresse causado pelo tratamento. No estudo de Brunet, Fourquaux e Hoste (2011), vesículas eletrodensas semelhantes foram observadas em nematoides tratados com extrato de *Onobrychis viciifolia*, sendo interpretadas como possíveis lisossomos.

No estudo de Borges et al. (2012), o tratamento de larvas L3 de *Aedes aegypti* com 1µg/mL de DFB resultou em danos celulares significativos no mesêntero, incluindo vacuolização e desorganização estrutural, sugerindo que o DFB compromete a homeostase celular e a função digestiva das larvas do mosquito. Tais achados não foram observados nas larvas L3 de nematoides gastrintestinais analisados, mesmo sendo utilizada uma concentração maior (100 µg/ml), indicando menor eficácia do composto em larvas desse estágio.

6.6. MEV Revelou Efeitos do DFB na Bainha de Nematoides

No presente estudo, observou-se via MEV que as larvas do grupo controle mantiveram a integridade estrutural da bainha, preservando a forma cilíndrica característica e o padrão normal de cristas transversais. Em contrapartida, as larvas tratadas com DFB e Difly S3 apresentaram alterações morfológicas significativas, incluindo perda de integridade da bainha, superfície irregular, perda de turgor corporal e depressões ao longo da bainha, além de alterações no padrão de cristas transversais. Por outro lado, análises de MEV em larvas de *Aedes aegypti* tratadas com DFB, conforme relatado por Borges et al. (2012), revelaram alterações específicas na cutícula e nas cerdas. O tratamento promoveu um aumento no número, comprimento e enrolamento das cerdas, provocando constrições nas regiões intersegmentares e dificultando o processo de ecdise. Larvas expostas a concentrações tão baixas quanto 0,1 µg/mL de DFB que tentaram realizar a muda formaram múltiplas cutículas sobrepostas. Esse efeito, combinado com as alterações

nas cerdas, conferiu às larvas um aspecto "mumificado" e anormal.

A literatura destaca que as cutículas dos estádios parasitários dos nematoides tendem a ser mais vulneráveis a compostos anti-helmínticos, impactando diretamente a motilidade dos vermes adultos (PAGE et al., 2014). Em contraste, os estádios de vida livre possuem estruturas especializadas que oferecem maior resistência a adversidades ambientais. As alterações observadas no complexo bainha–cutícula das L3 no presente estudo sugerem que a bainha exerce um papel protetor contra agentes químicos, conforme apontado por Neuhaus et al. (1996). Achados prévios de Escareño-Díaz et al. (2019), relatam a capacidade da bainha de inibir o desprendimento da bainha. Esse efeito impede que o parasita libere a bainha de forma prematura, preservando sua integridade durante a exposição ao tratamento anti-helmíntico. Dessa forma, o DFB pode reduzir a viabilidade do parasita, impedindo sua transição para estádios posteriores do ciclo de vida, o que compromete seu potencial parasitário.

Como comparação, Buchanan et al. (2002) investigaram os efeitos do metabólito sulfóxido do albendazol (ABZ-SO) em vermes adultos de *Fasciola hepatica* e observaram a formação de bolhas localizadas (blebbing) no tegumento após 24 horas de exposição, especialmente nas regiões posteriores. Esses danos incluíram exposição da lâmina basal nas áreas mais afetadas e perda de espículas, deformações que não foram encontradas no presente estudo. Embora os mecanismos de ação do DFB e do ABZ-SO sejam diferentes, ambos os tratamentos revelaram alterações estruturais consistentes com uma resposta severa ao tratamento químico, culminando na perda da funcionalidade da estrutura externa do parasita.

7. CONCLUSÃO

Diflubenzuron (DFB) apresenta atividade contra estádios larvais de nematoides gastrintestinais de equinos e ovinos. Alterações estruturais na morfologia interna e externa foram determinadas por microscopia óptica, eletrônica e confocal. Os achados aqui complementam estudos prévios do grupo.

Por fim, este estudo também destaca a relevância do uso de metodologias complementares, como a microscopia eletrônica e a fluorescência induzida por *E. coli* recombinante, para avaliar a ação de compostos anti-helmínticos. A continuidade das pesquisas, incluindo ensaios *in vivo* e estudos sobre a interação do DFB com diferentes condições ambientais e parasitárias, será fundamental para um melhor entendimento de sua eficácia e seu potencial no manejo integrado de parasitos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, A.; TAYLOR, L.; STUBBINGS, A. Technical manual for veterinary surgeons and advisers. 4. ed. **Context Publishing**, 2012. ISBN 0-9547447-4-8.

ALI, A.; KOK-YOKOMI, M. L. Field studies on the impact of a new benzoylphenylurea insect growth regulator (UC-84572) on selected aquatic nontarget invertebrates. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 42, n. 1, p. 134-141, 1989.

AMARADASA, Bimal S.; LANE, Robert A.; MANAGE, Ananda. Vertical migration of *Haemonchus contortus* infective larvae on *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum* pastures in response to climatic conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1-2, p. 78-87, 28 maio 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.026>. Acesso em: 23 dez. 2024.

AMARANTE, A. F. T.; BARBOSA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. G. de; CARMELLO, M. J.; PADOVANI, C. R. Efeito da administração de oxfendazol, ivermectina e levamisol sobre os exames coproparasitológicos de ovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 31-38, 1992.

ANDERSON, N.; MARTIN, P. J.; JARRETT, R. G. Mixtures of anthelmintics: A strategy against resistance. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 2, p. 47-49, fev. 1988.

ARREDONDO-JIMÉNEZ, J. I.; VALDEZ-DELGADO, K. M. Effect of Novaluron (Rimon® 10 EC) on the mosquitoes *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis*, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Chiapas, Mexico. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, p. 377-387, 2006.

BANKS, D. J.; SINGH, R.; BARGER, I. A.; PRATAP, B.; LE JAMBRE, L. F. Development and survival of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* on pasture in a tropical environment. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 2, p. 155-160, abr. 1990. DOI: 10.1016/0020-7519(90)90095-5.

BARNES, E. H.; DOBSON, R. J.; BARGER, I. A. Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. **Parasitology Today**, v. 11, n. 2, p.

56–63, fev. 1995.

BASTIANETTO, E.; COSTA, J. O.; GUIMARÃES, M. P.; FREITAS, C. M. V.; LANA, A. M. Q.; LEITE, R. C. Population Dynamic, Anthelmintic Treatments and the Influence of Helminth Infections on Weight Gain in Water Buffalo Calves (*Bubalus Bubalis*). **Journal of Buffalo Science**, v. 1, n. 1, p. 5–12, 1 mar. 2012.

BELAY, W.; TESHOME, D.; ABIYE, A. Study on the prevalence of gastrointestinal helminthes infection in equines in and around Kombolcha. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 1-9, 2016. DOI: 10.4172/2157-7579.1000372.

BESIER, R. B.; KAHN, L. P.; SARGISON, N. D.; VAN WYK, J. A. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, p. 95-143, 2016. DOI: [10.1016/bs.apar.2016.02.022](https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.022).

BEUGNET, F., KERBOEUF, D., NICOLLE, J. C., & SOUBIEUX, D. (1996). Use of free living stages to study the effects of thiabendazole, levamisole, pyrantel and ivermectin on the fine structure of *Haemonchus contortus* and *Heligmosomoides polygyrus*. *Veterinary Parasitology*. v. 63, n. 1-2, p. 83–94, 1996. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(95\)01023-7](https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)01023-7).

BEZERRA, S. Q.; MACHADO DO COUTO, M. C.; DE SOUZA, T. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; ANJOS, D. H. S.; SAMPAIO, I. B. M.; RODRIGUES, M. L. A. Ciatostomíneos (Strongylidae-Cyathostominae) parasitas de cávalos: Ecología experimental dos estágios pré-parasíticos em gramínea tifton 85 (*Cynodon spp. cv. Tifton 85*) na baixada Fluminense, RJ, Brasil. **Parasitología latinoamericana**, v. 62, n. 1–2, p. 27–34, jun. 2007.

BIZIMENYERA, E. S. et al. In vitro activity of *Peltophorum africanum* Sond. (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. **Veterinary parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 336–343, 20 dez. 2006.

BORGES, R. A.; ARRUDA, W.; OLIVEIRA, E. S. F. de; CAVASIN, G. M.; SILVA, H. H. G. da; SILVA, I. G. da. MECANISMOS DA AÇÃO LARVICIDA DO DIFLUBENZURON SOBRE *Aedes aegypti* EVIDENCIADOS PELAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIIS. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 2, 2012.

BOWMAN, D. D.; LYNN, R. C.; EBERHARD, M. L., ALCARAZ, A.

Parasitologia Veterinária Georgis, 8a ed. Tamboré: **Editora Malone**. p.422, 2006.

BRAGA, Ramayana Menezes. Desenvolvimento e sobrevivência de ovos e larvas de nematódeos gastrointestinais de bovinos, sob condições naturais. 1980. 98 f. Tese (Mestrado em Ciências em Parasitologia Veterinária) - **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 1980. Disponível em: <https://tede.ufrj.br/jspui/handle/jspui/3983>. Acesso em: 20 dez. 2024.

BRUNET, S., FOURQUAUX, I., & HOSTE, H. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. **Parasitology International**. v. 60, n. 4, p. 419-424, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.05.002>.

BRYDON, L. J., GOODAY, G. W., CHAPPELL, L. H., KING, T. P., Chitin in egg shells of *Onchocerca gibsoni* and *Onchocerca volvulus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 25, p. 267 – 272, 1987.

BUCHANAN, J. F.; FAIRWEATHER, I.; BRENNAN, G. P.; TRUDGETT, A.; HOEY, E. M. *Fasciola hepatica*: surface and internal tegumental changes induced by treatment in vitro with the sulphoxide metabolite of albendazole ('Valbazen'). **Parasitology**, [s.l.], v. 126, p. 141–153, 2003.

CAMPILLO, Cordero. *Parasitologia Veterinária*. 1999. **Editora McGraw-Hill Interamericana de España**. Disponível em: <https://www.scribd.com/document/371185532/Campillo-Cordero-Parasitologia-Veterinaria-1999>. Acesso em: 21 dez. 2024.

CHARLES, T. P. Verminoses dos bovinos de leite. In: CHARLES, T.P., FURLONG, J. Doenças parasitárias dos bovinos de leite. **Embrapa-CNPGL**, p. 55-110, 1992.

CHARLIER, J.; VAN DER VOORT, M.; KENYON, F.; SKUCE, P.; VERCRUYSSSE, J. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 7, p. 361–367, 2014.

COELHO, A. C; W. et al. RESISTÊNCIA ANTI-HELMÍNTICA EM CAPRINOS NO MUNICÍPIO DE MOSSORÓ, RN. **Ciência Animal Brasileira / Brazilian Animal Science**, v. 11, n. 3, p. 589–599, 2 out. 2010.

COLES, G. C.; BAUER, C.; BORGSTEEDE, F. H.; GEERTS, S.; KLEI, T. R.; TAYLOR, M. A.; et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in

nematodes of veterinary importance. **Veterinary Parasitology**, v. 44, n. 1-2, p. 35-44, 1992

CORNING, Susan. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. **Parasites & Vectors**, v. 2, Suppl. 2, p. S1, 2009. DOI: 10.1186/1756-3305-2-S2-S1. Disponível em:

<http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S2/S1>. Acesso em: 20 dez. 2024.

COSTA, E.; DIEHL, G. N.; DOS SANTOS, D. V.; SILVA, A. P. S. P. Panorama da Equinocultura no Rio Grande do Sul. **Informativo Técnico**, v. Nº5, n. Ano 05, maio 2014.

COSTA, P. T.; MACIEL, M. A. P.; BRUM, L. P.; DE MENDONÇA, G. Utilização Comparativa De Levamisol Com à Moxidectina Em Relação A Contagem De Números De Ovos Por Gramas De Fezes Em Ovinos. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 1, n. 1, 2009.

COSTA, R. B. Caracterização do parasitismo gastrintestinal em cavalos de desporto e lazer no distrito de Coimbra. 108 f. Mestrado em Medicina Veterinária. **Universidade Técnica de Lisboa**. Faculdade de Medicina Veterinária. 2011.

CRIBB, N. C.; COTE, N. M.; BOURÉ, L. P.; PEREGRINE, A. S. Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985–2004). **New Zealand Veterinary Journal**, v. 54, n. 6, p. 338-343, 2006. DOI: 10.1080/00480169.2006.36721.

CRUZ, D. G. Sobrevivência e eficácia nematófaga de cepas de *Duddingtonia flagrans* após passagem pelo trato digestivo de ovinos. Campos dos Goytacazes, 2005. 45p. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas). Centro de Biociências e Biotecnologias, **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**.

DELGADO, F. X.; BRITTON, J. H.; ANSAGER, J. A.; SWEARINGEN, W. Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of savanna grasshopper complex (Orthoptera) in Mali. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, p. 34-39, 1999.

DEMELEER, J. The physiological site of action and the site of resistance to the macrocyclic lactone anthelmintics in sheep parasitic trichostrongyloid nematodes. Hamburg, 2005. 212p. Doctoral thesis (Doktorin der Veterinärmedizin), Aus dem Institut für Parasitologie, **Tierärztliche Hochschule Hannover**.

DUNN, A. M. *Veterinary Helminthology*. 2. ed. London: **William Heinemann Medical Books Ltd**, 1978. p. 184-185.

EGITO, A. A. DO; MARIANTE, A. DA S.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M. PROGRAMA BRASILEIRO DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS THE BRAZILIAN GENETIC RESOURCES CONSERVATION PROGRAMM. *Archivos de zootecnia*, v. 51, p. 39–52, 2002.

EIINGS, H., AND J. G. DIEPERINK. Practical experiences with the experimental insecticide TH-6040. **26th International Symposium on Crop Protection**, *Landbouwwet. Rijksuniv. Gent* 31: 833- 46. 1974.

ELSE, K. J. Have gastrointestinal nematodes outwitted the immune system? **Parasite Immunology**, v. 27, p. 407–415, 2005.

TEIXEIRA, M.; CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. da S. Controle de verminose em caprinos e ovinos. **Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2015. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1019989/controle-de-verminose-em-caprinos-e-ovinos>. Acesso em: 8 nov. 2022.

EMBRAPA. **Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos - Portal Embrapa**, 2014. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos>>. Acesso em: 8 nov. 2022.

ESCAREÑO-DÍAZ, S.; ALONSO-DÍAZ, M. A.; MENDOZA DE GIVES, P.; CASTILLO-GALLEGOS, E.; VON SON-DE FERNEX, E. Anthelmintic-like activity of polyphenolic compounds and their interactions against the cattle nematode *Cooperia punctata*. **Veterinary Parasitology**, v. 274, p. 108909, out. 2019. DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.08.003.

EYSKER, M. The role of inhibited development in the epidemiology of *Ostertagia* infections. **Veterinary Parasitology**, v. 46, n. 1–4, p. 259-269, fev. 1993. DOI: [10.1016/0304-4017\(93\)90063-S](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90063-S).

FAOSTAT. **Crops and livestock products**. 2014. Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>>. Acesso em: 16 dez. 2022.

FETTERER, R. H.; URBAN, J. F.; MILLER, R. W. Effects of the chitin synthesis inhibitor diflubenzuron on development of *Ascaris suum* and *Haemonchus contortus*. **Veterinary Parasitology**, v. 32, n. 2–3, p. 181–192, 15 jul. 1989.

FISSIHA, W.; KINDE, M. Z. *Anthelmintic resistance and its mechanism: a review*. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 5403–5410, 15 dez. 2021. DOI:

10.2147/IDR.S332378. PMID: 34938088; PMCID: PMC8687516.

FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Resistência anti-helmíntica em nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes: avanços e limitações para seu diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1391–1402, dez. 2013.

FOREYT, W. J. **Parasitologia veterinária: manual de referência**, 5.ed. São Paulo: Roca, 2005.

FOREYT, W. J., FOREYT, B. Veterinary parasitology reference manual, **Wiley-Blackwell**. 5th edition. p. 256, 2001.

FUHRMAN, J. A., PIESENS, W. F. Chitin synthesis and sheath morphogenesis in *Brugia malayi* microfilariae. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 17, 93 – 104. 1985.

GARAUNDO, Ronald Ramos. Parámetros hematológicos y el nivel de infestación por parasitosis gastrointestinal en terneros Brown Swiss en pastoreo: UPS Allpachaka, Ayacucho - 2013. 2013. Tese (Médico Veterinário) – **Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga**, Ayacucho, Peru.

GAWOR, J. J. The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. **Veterinary parasitology**, v. 58, n. 1–2, p. 99–108, 1995.

GEARY T. Comunicação pessoal. Institute of Parasitology, **McGill University**, Canada. 2013.

GEARY, Timothy G.; HOSKING, Barry C.; SKUCE, Philip J.; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg; MAEDER, Steven; HOLDSWORTH, Peter; POMROY, William; VERCRUYSSE, Jozef. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 1-2, p. 306-316, 2012. DOI: [10.1016/j.vetpar.2012.09.004](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.004).

GILLEARD, John S.; KOTZE, Andrew C.; LEATHWICK, Dave; NISBET, Alasdair J.; McNEILLY, Tom N.; BESIERS, Brown. *A journey through 50 years of research relevant to the control of gastrointestinal nematodes in ruminant livestock and thoughts on future directions*. **International Journal for Parasitology**, [S. l.], v. 51, n. 13–14, p. 1133–1151, 2021. ISSN 0020-7519. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2021.10.007>.

GORDON, H. MCL.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting

nematode eggs in sheep faeces. **Journal of the Council for Scientific and Industrial Research**. v.12, n.1, p. 50-52, 1939. Disponível em: <https://publications.csiro.au/rpr/pub?list=BRO&pid=procite:21259a33-8a8e-4add-9315-f8338091a3e6>. Acesso em: 14 out. 2022.

GRANDO, N. A potência da pecuária para a economia brasileira. **Boehringer Ingelheim**, 2020. Disponível em: <<https://www.boehringer-ingelheim.com.br/quem-somos/conexao-com-executivos/potencia-da-pecuaria-para-economia-brasileira>>. Acesso em: 10 nov. 2022.

GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; DE BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; DE LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

HABELA, M.; SEVILLA, R. G.; CORCHERO, E.; FRUTO, J. M.; PEÑA, J. Nematodosis gastrointestinales en ovinos. **Mundo Ganadero**, p. 1–6, 2002.

HOFFMANN, K. H.; LORENZ, M. W. Recent advances in hormones in insect pest control. **Phytoparasitica**, v. 26, p. 1-8, 1998.

Horse Meat in Brazil | OEC - The Observatory of Economic Complexity. 2020. Disponível em: <<https://oec.world/en/profile/bilateral-product/horse-meat/reporter/bra>>. Acesso em: 16 dez. 2022.

ISHII, J. B. Distribuição do códon 167 da isoforma 1 do gene da beta-tubulina em ciatostomíneos de equinos. Curitiba, 2017. Dissertação (Mestrado) – **Universidade do Paraná**, Setor de Ciências Agrárias.

KAPLAN, R. M. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 477-481, 2004. DOI: 10.1016/j.pt.2004.08.001.

KAPLAN, Ray M.; VIDYASHANKAR, Anand N. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. **Veterinary Parasitology**, v. 186, n. 1-2, p. 70-78, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.11.048.

KEITH, R. K. The differentiation of the infective larvae of some common nematode parasites of cattle. **Australian Journal of Zoology**, v. 1, n. 2, p. 223–235, 1953.

KHAN, M. A.; ROOHI, Nabila; RANA, M. A. A. Strongylosis in equines: A review. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 25, n. 1, p. 1-9, 2015. ISSN 1018-7081.

KHANNA, V. Trichostrongyliasis. In: PARIJA, S. C.; CHAUDHURY, A. (eds). Textbook of Parasitic Zoonoses. Microbial Zoonoses. **Singapore: Springer**, 2022. DOI: [10.1007/978-981-16-7204-0_48](https://doi.org/10.1007/978-981-16-7204-0_48).

KLEI, T. R. Gastrointestinal parasites of horses. **MSD Veterinary Manual**, 2019. Disponível em: <https://www.msdsvetmanual.com/horse-owners/digestive-disorders-of-horses/gastrointestinal-parasites-of-horses>. Acesso em: 20 dez. 2024.

KLEI, T. R.; CHAPMAN, M. R. Immunity in equine cyathostome infections. **Veterinary parasitology**, v. 85, n. 2–3, p. 123–136, 31 ago. 1999.

KORNAŚ, S.; CABARET, J.; SKALSKA, M.; NOWOSAD, B. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 3-4, p. 285-291, 15 dez. 2010. DOI: [10.1016/j.vetpar.2010.09.007](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.007).

KOSTYUKOVSKY, M.; TROSTANETSKY, A. The effect of a new chitin synthesis inhibitor, novaluron, on various developmental stages of *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v. 42, p. 136-148, 2006.

LANUSSE, C.; CANTON, C.; VIRKEL, G.; ALVAREZ, L.; COSTA-JUNIOR, L.; LIFSCHITZ, A. Strategies to optimize the efficacy of anthelmintic drugs in ruminants. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 8, p. 664-682, ago. 2018.

LAUGIER, C.; SEVIN, C.; MÉNARD, S.; MAILLARD, K. Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France. **Veterinary Parasitology**, v. 188, n. 1-2, p. 185-189, 2012. DOI: [10.1016/j.vetpar.2012.02.022](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.022).

LEATHWICK, D. M.; HOSKING, B. C.; BISSET, S. A.; MCKAY, C. H. Managing anthelmintic resistance: Is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 57, n. 4, p. 173-179, 2009.

LEATHWICK, D. M.; MILLER, C. M.; SAUERMAN, C. W.; CANDY, P. M.; GANESH, S.; FRASER, K.; WAGHORN, T. S. The efficacy and plasma profiles of abamectin plus levamisole combination anthelmintics administered as oral and

pour-on formulations to cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p. 85-92, 30 ago. 2016.

LEWIS, James A.; FLEMING, John T. Basic culture methods. **Methods in Cell Biology**, v. 48, p. 3-29, 1995. DOI: 10.1016/S0091-679X(08)61381-3. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)61381-3](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)61381-3). Acesso em: 23 dez. 2024.

LOVE, S.; MURPHY, D.; MELLOR, D. Pathogenicity of cyathostome infection. **Veterinary parasitology**, v. 85, n. 2–3, p. 113–122, 31 ago. 1999.

LUQUE, S.; LLOBERAS, M.; CARDOZO, P.; VIRKEL, G.; FARIAS, C.; VIVIANI, P.; LANUSSE, C.; ALVAREZ, L.; LIFSCHITZ, A. Combined moxidectin-levamisole treatment against multidrug-resistant gastrointestinal nematodes: A four-year efficacy monitoring in lambs. **Veterinary Parasitology**, v. 290, p. 109362, fev. 2021.

MACHADO, Angela Aparecida. Eficácia e período residual do diflubenzuron para o controle de larvas de *Aedes aegypti* resistentes ao temefós. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Entomologia Agrícola) – **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2012.

MADEIRA, de Carvalho, L.M.; Fazendeiro, M.I.; Afonso –Roque, M.M. Estudo morfológico das larvas infectantes (L3) dos estrongídeos dos equídeos – Gêneros, *Gyalocephalus*, *Poteriostomum*, *Craterostomum*, *Oesophagodontus*, *Triodontophorus*, *Strongylus* e *Trichostrongylus*. **Acta Parasitol. Port.** 14, 2007, p. 23-34.

MADEIRA, de Carvalho, L.M.; Fazendeiro, M.I.; Afonso –Roque, M.M. Morphometric study of the infective larval stages (L3) of horses strongyles (Nematoda: Strongylidae) - 3. Conclusions, future prospects and proposal of an identification key for some common horse gastrointestinal nematodes in Portugal. **Acta Parasitol. Port.** 15, 2008 , p. 59-65. MAPA. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Caval**. Ministério da Agricultura e Pecuária, 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo/view>. Acesso em: 8 nov. 2022.

MARCHIONDO, A. A. et al. Nematoda. **Parasiticide Screening: Volume 2:**

In Vitro and In Vivo Tests with Relevant Parasite Rearing and Host Infection/Infestation Methods, p. 135–335, 1 jan. 2019.

MARTIN, R. J.; ROBERTSON, A. P.; BJORN, H. Target sites of anthelmintics. **Parasitology**, v. 114, supl. S1, p. S111-S124, 1997.

MARTINS, F.; DA SILVA, I. G. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdise das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 2, p. 135–138, 2004.

MATTHEWS, J. B. Anthelmintic resistance in equine nematodes. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 310–315, 1 dez. 2014.

MIRANDA, C. B. *AVALIAÇÃO in vitro DO DIFLUBENZURON SOBRE Panagrellus spp. E NEMATOIDES GASTROINTESTINAIS DE EQUINOS, OVINOS E AVES*. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Monografia em Biociências e Biotecnologia) – **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro**, Centro de Biociências e Biotecnologia, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Campos dos Goytacazes, 2022.

MONTEIRO, S. G. Parasitologia na medicina veterinária. 1. ed. São Paulo: Roca, 2011. ISBN 978-8572418829.

MOORE, R. F., TAFT, H. M. Boll weevils: Chemosterilization of both sexes with bisulfan plus Thompson-Hayward TH-6040. **Journal of Economic Entomology**. 68, 96-98. 1975.

MOTA, L. C. B. M. Micro-organismos, quitina e quitosana no manejo de nematoides das galhas no tomateiro. 2015. 128 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – área de concentração em Fitopatologia) – **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2015.

MOTA, M. DE A.; CAMPOS, A. K.; DE 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.

MSCASLAND, C. S.; COOPER, R. J.; BARNUM, D. A. Implications for the use of diflubenzuron to reduce arthropod populations inhabiting evaporation ponds of the San Joaquin Valley, California. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, p. 702-708, 1998.

MULLA, M. S. The future of insect growth regulators in vector control. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 11, p. 269-273, 1995.

MULDER, R.; GIJSWIJT, M. J. The laboratory evaluation of two promising new insecticides which interfere with cuticle deposition. **Journal of Peptide Science**, 4, 737-7, 1973.

NASCIMENTO, Fábio Santos do. *Biologia dos Invertebrados II*. São Cristóvão: **Universidade Federal de Sergipe**, CESAD, 2009. Disponível em: https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/17300324022014Invertebrados_I_A_ula_1.pdf. Acesso em: 10 jan. 2025.

NEUHAUS, B.; BRESCIANI, J.; CHRISTENSEN, C. M.; FRANDSEN, F. Ultrastructure and development of the body cuticle of *Oesophagostomum dentatum* (Strongylida, Nematoda). **Journal of Parasitology**, v. 82, n. 5, p. 820-828, out. 1996. PMID: 8885894.

NIELSEN, C. *Animal evolution: interrelationships of the living phyla*. 3. ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2012. p. 238-310.

NIPANE, S. F.; MISHRA, B.; PANCHBUDDHE, A. N. Anthelmintic resistance—clinician's present concern. **Veterinary World**, v. 1, n. 9, p. 281, 2008.

O'CONNOR, Lauren J.; WALKDEN-BROWN, Stephen W.; KAHN, Lewis P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 1–15, 2006. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.08.035.

OPPITZ, F. F. TRATAMENTO COM CLOSANTEL EM OVINOS PARASITADOS COM NEMATÓDEOS GASTRINTESTINAIS: PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS. Porto Alegre, 2011. 42p. Monografia (Especialização em Análises Clínicas Veterinárias). Faculdade de Veterinária, **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**.

PADDOCK, R. *Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory*. **Purdue University**, 2011. Disponível em: <https://www.addl.purdue.edu/Newsletters/2011/Fall/Haemonchus.aspx>. Acesso em: 11 nov. 2022.

PAGE, A. P. The nematode cuticle: synthesis, modification and mutants. In: KENNEDY, M. W.; HARNETT, W. (Eds.). *Parasitic nematodes: molecular biology, biochemistry and immunology*. London: **CABI Publishing**, p. 167-193, 2001.

PAGE, Antony P.; STEPEK, Gillian; WINTER, Alan D.; PERTAB, David.

Enzymology of the nematode cuticle: A potential drug target? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 133–141, 6 jun. 2014. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2014.05.003.

PAPADOPOULOS, E.; GALLIDIS, E.; PTOCHOS, S. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 1, p. 85-88, 2012. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.036.

PAYNE, P. A.; CARTER, G. R. **Helminths, In: A Concise Guide to the Microbial and Parasitic Diseases of Horses**. Disponível em: <<https://www.ivis.org/library/concise-guide-to-microbial-and-parasitic-diseases-of-horses/helminths>>. Acesso em: 11 nov. 2022.

POLITI, F. A. S. et al. Chemical Composition and In vitro Anthelmintic Activity of Extracts of *Tagetes patula* Against a Multidrug-Resistant Isolate of *Haemonchus contortus*. **Chemistry & biodiversity**, v. 15, n. 2, 1 fev. 2018.

PORTUGAL, Miguel Angel Guillen. Dinâmica e distribuição de nematoides gastrointestinais em pastagem com e sem sombra para ovinos durante o verão. 2021. 68 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – **Universidade Tecnológica Federal do Paraná**, Dois Vizinhos, 2021.

POTÂRNICHE, A. V.; MICKIEWICZ, M.; OLAH, D.; et al. First report of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats in Romania. **Animals**, v. 11, p. 2761, 2021. DOI: 10.3390/ani11102761.

PROUDMAN, C.; MATTHEWS, J. Control of intestinal parasites in horses. **In Practice**, v. 22, n. 2, p. 90–97, 2000.

PURVES, W. K.; SADAVA, D.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C. Life: the science of biology. 7. ed. Sunderland, **MA: Sinauer Associates**, 2004. p. 641-654.

PUSPITASARI, S.; FARAJALLAH, A.; SULISTIAWATI, E.; MULADNO. Effectiveness of Ivermectin and Albendazole against *Haemonchus contortus* in Sheep in West Java, Indonesia. **Tropical Life Science Research**, v. 27, n. 1, p. 135-144, fev. 2016.

QAZI, Farah; KHALID, Asma; PODDAR, Arpita; TETIENNE, Jean-Philippe; Nadarajah, Athavan; ABURTO-MEDINA, Arturo; SHAHSAVARI, Esmaeil; SHUKLA, Ravi; PRAWER, Steven; BALL, Andrew S.; TOMLJENOVIC-HANIC, Snjezana. Real-time detection and identification of nematode eggs genus and species through optical imaging. **Scientific Reports**, v. 10, p. 7219, 29 abr. 2020.

REINEMEYER, C. R.; SMITH, S. A.; GABEL, A. A.; HERD, R. P. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the U.S.A. **Veterinary Parasitology**, v. 15, n. 1, p. 75-83, jul. 1984. DOI: 10.1016/0304-4017(84)90112-2. PMID: 6237483.

ROBERTO, F. F. DA S. et al. Nematoides gastrintestinais na ovinocultura de corte sob regime de pastejo. **Pubvet**, v. 12, n. 4, p. 1–12, abr. 2018.

ROCHA, L. O. da; LEMOS, G. C. da S.; VIEIRA, I. J. C.; FILHO, R. B.; FREITAS, S. P.; GLÓRIA, L. S.; SANTOS, C. P. Chemical characterization and in vitro biological activity of *Cymbopogon citratus* extracts against *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp. nematodes from sheep. **Parasitology, Cambridge**, v. 147, n. 13, p. 1559-1568, 2020. DOI: 10.1017/S0031182020001432.

ROMERO, Q. H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México: **Editorial Limusa**, 1994. 876 p.

SALLES, Hévila Oliveira; BRAGA, Ana Carolina Linhares; NASCIMENTO, Danisvânia Ripardo; PRADO, Mayara Stephanny Melo; SOUZA, Henrique Antunes de; OLIVEIRA, Eduardo Luiz de; VIEIRA, Luiz da Silva; CAVALCANTE, Antônio César Rocha; LIMA, Adriano Rodrigues; TELES NETO, Cláudio Santos; SOUSA, Ana Márjory Paiva; RIBEIRO, Regislane Pinto; POMPEU, Roberto Cláudio Fernandes Franco. Crop residues activity against the free-living stages of small ruminant nematodes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 3, p. 524-528, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/fwXg5KXfGk4d6hnsVY5nC9N/?lang=en>. Acesso em: 23 dez. 2024.

SALGADO, J. A.; SANTOS, C. DE P. Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 3–17, 11 mar. 2016.

SANGSTER, Nicholas C.; COWLING, Ann; WOODGATE, Robert G. Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research. **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 7, p. 553-563, 2018. DOI: 10.1016/j.pt.2018.05.001.

SANTOS, Vanessa Sardinha dos. Muda ou ecdise em artrópodes. **Mundo Educação**, 10 nov. 2020. Disponível em: <https://mundoeducacao.uol.com.br/biologia/muda-ou-ecdise-em-artropodes.htm>. Acesso em: 22 dez. 2024.

SHITE, Anmaw; ADMASSU, Bemrew; ABERE, Alimaw. Large strongyle parasites in equine: A review. *Advances in Biological Research*, v. 9, n. 4, p. 247-252, 2015. ISSN 1992-0067. DOI: 10.5829/idosi.abr.2015.9.9559. Corresponding author: Anmaw Shite, **University of Gondar**, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacy and Biomedical Sciences, P.O. Box: 196, Gondar, Ethiopia.

SOLORIO, R. J. L.; NAVARRO, R. A. Helmintos más comunes en rumiantes: nematodos gastroentéricos. In: **Principios de Helminología Veterinaria - Rumiantes**. Morelia, 1992.

SOTOMAIOR, C. S.; MORAES, F. P. S.; SOUZA, F. P.; MILCZEWSKI, V.; PASQUALIN, C. A. Parasitoses gastrintestinais dos ovinos e caprinos: alternativas de controle. Curitiba: **Instituto Emater**, 2009. 36p.

SOULSBY, E. J. L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7. ed. **México: Nueva Editorial Interamericana**, 1987. 823 p.

SUBRAMANIAN, S.; SHANKARGANESH, K. Insect Hormones (as Pesticides). **Ecofriendly Pest Management for Food Security**, p. 613–650, 1 jan. 2016.

SUTHERLAND, I. A.; LEATHWICK, D. M. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? **Trends in parasitology**, v. 27, n. 4, p. 176–181, abr. 2011.

TARIQ, Khurshid Ahmad; LATEEF, Mohammad. Studies on abomasal nematodes of sheep in relation to temperate climatic factors. **The Journal of Zoology Studies**, v. 4, n. 5, p. 1-5, 2017. ISSN 2348-5914.

TATZ, A. J.; SEGEV, G.; STEINMAN, A.; BERLIN, D.; MILGRAM, J.; KELMER, G. Surgical treatment for acute small intestinal obstruction caused by *Parascaris equorum* infection in 15 horses (2002–2011). **Equine Veterinary Journal**, v. 44, supl. 43, p. 111-114, 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00607.x.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasitologia veterinária. Tradução da 3ª edição. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2017.

TELETCHEA, F. Animal Domestication: A Brief Overview. **Animal Domestication**, IntechOpen. p. 170, 17 jul, 2019. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/6053> doi: 10.5772/67910>. Acesso em: 17 dez. 2022.

UFRRJ. Classificação e Morfologia de Nematóides em Medicina Veterinária. Seropédica, 2016. Material produzido no âmbito do projeto “Desenvolvimento e produção de material didático para o ensino de Parasitologia Animal na **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**: atualização e modernização”, financiado pela FAPERJ (Processo 2010.6030/2014-28).

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

VAN WYK JA, CABARET J, MICHAEL LM. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. **Veterinary Parasitology**. 119(4): p.277-306.. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.11.012. PMID: 15154594. 6 fev, 2004.

VANHOY, Grace. Common Gastrointestinal Parasites of Small Ruminants. **MSD Veterinary Manual**, jun. 2023a. Disponível em: <https://www.msdsvetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-ruminants/common-gastrointestinal-parasites-of-small-ruminants>. Acesso em: 20 dez. 2024.

VANHOY, Grace. Overview of gastrointestinal parasites of ruminants. **MSD Veterinary Manual**, 2023b. Disponível em: <https://www.msdsvetmanual.com/digestive-system/gastrointestinal-parasites-of-ruminants/overview-of-gastrointestinal-parasites-of-ruminants>. Acesso em: 20 dez. 2024.

VÁRADY, M.; ČUDEKOVÁ, P.; ČORBA, J. In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 1–2, p. 104–110, 5 dez. 2007.

VEECH, J. A. A Possible New Approach to the Chemical Control of Nematodes. **Journal of Nematology**, p. 184–186, 15 abr. 1977.

VEECH, J. A. The Effect of Diflubenzuron On the Reproduction of Free-Living Nematodes. **Nematologica**, v. 24, n. 3, p. 312–320, 1 jan. 1978a.

VEECH, J. A. The Effect of Diflubenzuron on Egg Formation by the Root-Knot Nematode. **Journal of Nematology**, v. 10, n. 2, p. 208, abr. 1978b.

VILLANUEVA-JIMENEZ, J. Á.; HOY, M. A.; DAVIES, F. S. Field evaluation of integrated pest management-compatible pesticides for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae) and its parasitoid *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p.

357-367, 2000.

XIN, T. et al. Molecular characterization of chitin synthase gene in tetranychus cinnabarinus (Boisduval) and its response to sublethal concentrations of an insecticide. **Insects**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2021.

WANG, Tong; VAN WYK, J. A.; MORRISON, A.; MORGAN, E. R. Moisture requirements for the migration of Haemonchus contortus third stage larvae out of faeces. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3-4, p. 258-264, 29 ago. 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.05.014.

WHARTON, D., Nematode egg-shells. **Parasitology**. 81(2), p.447 – 463. doi: 10.1017/s003118200005616x. Out. 1980.

WOLSTENHOLME, Adrian J.; FAIRWEATHER, Ian; PRICHARD, Roger; VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, Georg; SANGSTER, Nicholas C. Drug resistance in veterinary helminths. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 10, p. 469-476, 2004. DOI: [10.1016/j.pt.2004.07.010](https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of the ninth WHOPES working group meeting, WHO/HQ, Geneva, 5-9 December 2005. **Geneva: WHO**, 2006. (WHO/CDS/NTD/WHOPES/2006.2).

WRIGHT, J. F., HARRIS, R. L. Ovicidal activity of Thompson-Hayward TH 6040 in the stablefly and hornfly after surface contact by adults. **Journal of Economic Entomology**. 69, p.728-730. 1976.

ZAJAC, Anne. White eyes and bottle jaw: are there zebras? **American Consortium for Small Ruminant Parasite Control**. 2016. Disponível em: <https://www.wormx.info/zebras>. Acesso em: 14 abr. 2025.

ZHANG Y., FOSTER J. M., NELSON L. S., MA D., CARLOW C. K. The chitin synthase genes chs-1 and chs-2 are essential for C. elegans development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively. **Developmental Biology**. 285(2):330–339. 2005.