

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)

MARIANA DOS PASSOS NUNES

Avaliação de dieta a base de Ágar para larvas e relação peso de massa de ovos e número de larvas estéreis de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) para emprego na terapia larval

Rio de Janeiro

2019

MARIANA DOS PASSOS NUNES

Avaliação de dieta a base de Ágar para larvas e relação peso de massa de ovos e número de larvas estéreis de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) para emprego na terapia larval

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Valéria Magalhães Aguiar

Coorientador: Prof.^a. Dr.^a. Cláudia Soares Santos Lessa

Rio de Janeiro

2019

MARIANA DOS PASSOS NUNES

Avaliação de dieta a base de Ágar para larvas e relação peso de massa de ovos e número de larvas estéreis de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) para emprego na terapia larval

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 15 de Julho de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Valéria Magalhães Aguiar – UNIRIO

Me. Adriana Leal de Figueiredo- UNIRIO

Me. Wellington Thadeu de Alcântara Azevedo- UNIRIO

Me. Raquel Fernandes Silva Chagas do Nascimento– UNIRIO (suplente)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita de Cássia dos Passos e Antonio Vieira Nunes, que nunca me faltaram com amor, sustento e apoio incondicional em todas as situações.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Valéria Magalhães Aguiar, por todo suporte, correções, incentivos, paciência e carinho ao longo dos anos; sem isso não teria conseguido.

A minha coorientadora, Prof. Dr. Cláudia Soares Santos Lessa, por ter me apoiado, ensinado e incentivado igualmente.

Aos demais profissionais da UNIRIO que auxiliaram para minha formação acadêmica.

Aos meus irmãos, Rafaela dos Passos Santos e Rodolfo dos Passos, por terem me ajudado nos momentos que precisei.

A Deus, por ter me presenteado com saúde e ânimo para continuar a jornada.

RESUMO

A terapia larval é uma técnica de uso medicinal que utiliza larvas de moscas necrobiontófagas para desbridar feridas com tecido necrosado, de difícil cicatrização e muitas vezes infestadas por microorganismos resistentes a antibióticos. No Brasil pesquisadores têm investido em pesquisas com *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) visando o uso de suas larvas na terapia larval e diferentes dietas alternativas podem ser realizadas para criar e manter em meio laboratorial os imaturos dessa espécie. O presente estudo propõe desenvolver uma dieta a base de Ágar, que com sua característica de substrato consistente, possibilitaria que as larvas que ali estivessem se alimentando, por até 48 horas não venham a penetrar na dieta, facilitando assim sua remoção para utilizações posteriores. Associado ao Ágar foi adicionado o homogenato pulmão bovino para suprir as necessidades nutricionais dos insetos. Objetivou-se avaliar dieta a base de homogenato Ágar pulmão bovino para o desenvolvimento larval de *C. megacephala* até o segundo instar em três diferentes tratamentos que representam as concentrações de 5%, 10% e 15%, além de determinar a relação entre peso de massa de ovos e número de larvas estéreis de primeiro instar (L1). Foram transferidas 40 larvas de primeiro instar para os tratamentos esterilizados, não esterilizados e Ágar sangue (controle). Após 48 horas foi verificada a viabilidade larval, crescimento e capacidade das larvas de penetrarem a dieta. Com este estudo verificou-se que de 0,050 gramas de massa de ovos, em média, 50 larvas de *C. megacephala* sobrevivem até o segundo instar larval. Os resultados mostraram que a viabilidade larval das larvas criadas nas diferentes concentrações de dieta artificial homogenato Ágar pulmão bovino foi elevada, acima de 70%, tanto para dietas esterilizadas quanto para dietas não esterilizadas, com exceção do T1 estéril (44,15%). Quanto ao nível de introdução das larvas na dieta, as dietas estéreis obtiveram menores índices do que as não estéreis. As dietas testadas demonstraram possuir nutrientes suficientes para larvas se desenvolverem até o segundo estágio larval em 48 horas, e não há diferença significativa entre a viabilidade das dietas de homogenato em base de Ágar e do controle Ágar sangue. Desse modo, o Ágar sangue pode ser substituído pela dieta alternativa de homogenato, que é mais econômica, prática, fácil de ser reproduzida e nutritiva para larvas até o segundo estágio larval.

Palavras chave: Bioterapia, desbridamento, dieta alternativa, mosca varejeira.

ABSTRACT

Maggot therapy is a medical technique that uses necrobiontophagous fly larvae to debride wounds with necrotic tissue, difficult to heal and often infested by antibiotic resistant microorganisms. In Brazil researchers have invested in research with *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) aimed at the use of their larvae in larval therapy and different alternative diets can be performed to create and maintain the immature of this species in the laboratory. The present study proposes to develop a diet based on Agar, which with its consistent substrate characteristic, would allow the larvae that were feeding there for up to 48 hours not to penetrate the diet, thus facilitating its removal for later uses. Associated with Agar was added bovine lung homogenate to meet the nutritional needs of insects. The objective of this study was to evaluate the diet of bovine lung Agar homogenate for the larval development of *C. megacephala* until the second instar in three different treatments that represent concentrations of 5%, 10% and 15%. And determine the relationship between egg mass weight and number of first instar larvae (L1). 40 first instar larvae were transferred to the sterilized, non-sterile treatments and blood agar (control). After 48 hours the viability, growth and ability of larvae to penetrate the diet were verified. With this study it was verified that, of 0.050 grams of mass of eggs, on average, 50 larvae of *C. megacephala* survive until the second instar larval. The results showed that the larval viability of larvae raised in the different concentrations of artificial diets homogenate bovine lung Agar was elevated, above 70%, for both sterile diets and non sterile diets, with the exception of sterile T1. As for the level of introduction of larvae in the diet, sterile diets obtained lower rates than non-sterile diets. The diets tested showed sufficient nutrients for larvae to develop until the second larval stage in 48 hours, and there was no significant difference between the viability of the Agar homogenate diets and the Agar blood control. In this way the blood agar can be replaced by the alternative homogenate diet, which is more economical, practical, easy to reproduce and nutritious for larvae up to the second larval stage.

Key Words: Alternative diet, blowfly, debridement, maggot therapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa mundi onde a terapia larval é comumente utilizada (fonte: DALLAVECCHIA <i>et al</i> , 2011)..... | 12 |
| Figura 2. (A) Preparo do homogenato pulmão bovino utilizando mixer; (B) Homogenato filtrado antes de ser acrescido ao Ágar..... | 19 |
| Figura 3. (A) Homogenato pulmão bovino em Ágar recém preparado não estéril a 15%; (B) Homogenato pulmão bovino em Ágar recém preparado não estéril a 10%; (C) Homogenato pulmão bovino em Ágar recém preparado não estéril a 5%..... | 20 |
| Figura 4. Média, mediana e desvio padrão da viabilidade de larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> até o segundo ínstar criadas em dieta a base de homogenato ágar pulmão bovino..... | 23 |
| Figura 5. (A) Dieta estéril após 48 horas a 5% com as larvas sobreviventes de <i>Chrysomya megacephala</i> ; (B) Dieta estéril após 48 horas a 10% com as larvas sobreviventes de <i>C. megacephala</i> ; (C) Dieta estéril após 48 horas a 15% com as larvas sobreviventes de <i>C. megacephala</i> | 25 |
| Figura 6. (A) Dieta não estéril após 48 horas a 5% com as larvas sobreviventes de <i>Chrysomya megacephala</i> ; (B) Dieta não estéril após 48 horas a 10% com as larvas sobreviventes de <i>C. megacephala</i> ; (C) Dieta não estéril após 48 horas a 15% com as larvas sobreviventes de <i>C. megacephala</i> | 26 |
| Figura 7. Ágar sangue (controle) após 48 horas com as larvas sobreviventes de <i>Chrysomya megacephala</i> | 26 |

Figura 8. Taxa de viabilidade larval (larvas que sobreviveram após o período de 48 horas) nas dietas artificiais estéreis, não estéreis e do grupo controle Ágar sangue.....27

Figura 9. Número de larvas emergidas de 0,050 gramas de massa de ovos de *C. megacephala* transferidas para a dieta de homogenato Ágar pulmão bovino a 10%.....29

Figura 10. Larvas eclodidas de 0,050 de massa de ovos de *Chrysomya megacephala* após alimentarem-se por 48 horas na dieta artificial de homogenato Ágar pulmão bovino a 10%.....29

Figura 11. Número de larvas emergidas de 0,150 gramas de massa de ovos de *Chrysomya megacephala* transferidas para placas de Petri com álcool 70%.....30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. VISÃO GERAL DAS BIOATIVIDADES DAS LARVAS DE CALLIPHORIDAE.....11

Quadro 2. CARACTERÍSTICA DO DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE *Chrysomya megacephala* ATÉ O SEGUNDO ÍNSTAR EM DIETA A BASE DE HOMOGENATO ÁGAR PULMÃO BOVINO.....28

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. | OBJETIVOS | 17 |
| 2.1 | Objetivos específicos..... | 17 |
| 3. | METODOLOGIA..... | 18 |
| 3.1 | Procedência e manutenção da colônia de <i>Chrysomya megacephala</i> | 18 |
| 3.2 | Preparo do homogenato Ágar Pulmão Bovino..... | 18 |
| 3.3 | Estudo da relação de larvas de primeiro ínstar (L1) estéril e o peso de massa de ovos..... | 21 |
| 3.3.1 | Esterilização dos ovos para obtenção de L1 estéril..... | 21 |
| 3.3.2 | Avaliação massa de ovos e número de larvas eclodidas..... | 21 |
| 3.4 | Análise estatística..... | 21 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 22 |
| 4.1 | Viabilidade das larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> | 22 |
| 4.2 | Resultado do crescimento e taxa de penetração larval..... | 27 |
| 4.3 | Resultados da relação massa de ovos e número de larvas..... | 28 |
| 5. | CONCLUSÃO..... | 31 |

1. INTRODUÇÃO

A Terapia Larval (TL) é uma técnica de uso medicinal que utiliza larvas de moscas necrobiontófagas para desbridar feridas com tecido necrosado. As larvas são previamente esterilizadas e usadas para curar e limpar feridas crônicas, de difícil cicatrização e muitas vezes infestadas por microorganismos resistentes a antibióticos. O biodesbridamento é feito através dos ganchos bucais das larvas, que ao romper o tecido necrosado, liberam enzimas proteolíticas, como a colagenase, que fragmenta o tecido e transforma-o numa forma parcialmente líquida, que é então absorvida e digerida (SHERMAN, 2009). Portanto, não há perigo de infestação ou desbridamento de tecido saudável uma vez que a alimentação é estritamente restrita a tecidos necrosados (SHERMAN *et al*, 2000).

Ao se alimentarem, as formas imaturas de dípteros muscóides secretam agentes naturais similares a antibióticos. Algumas de suas secreções e excreções, como a alantoína, possuem características antibacterianas que agem diretamente sobre as bactérias existentes nas feridas, reduzindo-as (ROBINSON, 1935). Estas larvas também secretam amônia e carbonato de cálcio, tornando o pH do leito da lesão mais alcalino, inibindo em boa parte o crescimento bacteriano (MESSER e MCCLELLAN, 1935). Portanto, durante o biodesbridamento as larvas combatem a infecção e o odor desagradável, pois em seus tratos digestores também ocorre a destruição das bactérias presentes na ferida (MUMCUOGLU e MILLER *et al*, 2001).

Dentre as substâncias secretadas pelas larvas foram detectados agentes promotores de crescimento nas feridas, o que induz a migração de fibroblastos, e conseqüentemente a regeneração e cicatrização dos tecidos e o movimento das larvas sobre o tecido sadio estimula a formação de um tecido de granulação (PRETE, 1996).

Yan *et al*, 2018 mostraram a correlação entre a bioatividade das substâncias secretadas pelas larvas, quais células ou componentes atuam, e seu respectivo mecanismo de atuação (Quadro 1).

Quadro 1. VISÃO GERAL DAS BIOATIVIDADES DAS LARVAS DE CALLIPHORIDAE.

| Bioatividade | Substância, Componente ou molécula | Alvo | Mecanismo |
|------------------|------------------------------------|---|---|
| Antibacteriana | Lucifensina | Espécies de <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> | Forma canais iônicos ou transmembrana |
| Antibiofilme | Quimiotripsina | <i>Staphylococcus aureus</i> | Interrompe a pela adesão mediada por proteínas |
| Antifúngica | Lucimicina | <i>Ascomycota</i> , <i>Basidiomycota</i> | Formação de complexos metálicos para receptores específicos |
| Antiinflamatória | Tipo de proteína termoestável | Sistema complemento | Quebra as proteínas do complemento C3 e C4 |
| Imunomoduladora | BLIP | Linfócito T | Regula para baixo IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-13 e CD25 e regula para cima TNF- α e TGF- β |
| Angiogênica | Ácidos graxos insaturados | Célula endotelial microvascular | Melhora a migração ativa do caminho de sinalização AKT1 |
| Anti tumor | ω -6PUFA | Células de leucemia humana A549 e células de câncer de pulmão | Ativa o caminho do sinal p38MAPK |
| Pró coagulante | Proteína semelhante a jonah. | Plasma humano | Reduz tempo de coagulação |

(Fonte:Modificada de YAN *et al*, 2018)

A prática da TL está aumentando em todo o mundo por causa de sua eficácia, rapidez, baixo custo e simplicidade (SHERMAN *et al*, 2002). Além disso, este procedimento beneficia os pacientes, pois pode prevenir amputações, internação

hospitalar, diminuir as visitas ambulatoriais e diminuir o uso geral de antibióticos (MARCONDES, 2006).

O uso desta biocirurgia remonta aos primórdios da civilização, e mesmo que repetidamente sofra pela rejeição de alguns profissionais da saúde e do público em geral, a prática da TL está crescendo em todo o mundo, em países como Estados Unidos, Canadá, México, Venezuela, entre outros (Figura 1).



Figura 1. Mapa mundi onde a terapia larval é comumente utilizada (Fonte: DALLAVECCHIA *et al*, 2011)

Feridas de difícil cicatrização são um obstáculo de saúde constante em todo o mundo (VALACHOVA, 2013). A TL beneficia demasiadamente os pacientes através de um desbridamento rápido da ferida, podendo salvar a vida do indivíduo em determinados casos (SHERMAN *et al*, 2002). É importante destacar que não há evidências de que as larvas sejam afetadas por qualquer antibiótico, quimioterapia ou radioterapia (WHITAKER *et al*, 2007). À medida que a resistência aos antibióticos por parte dos microorganismos se torna cada dia mais prevalente (SANTOS, 2004), essa antiga terapia voltou a ser um instrumento clínico, e conforme a aceitação pública e compreensão médica aumentaram, a TL vem sendo utilizada para tratar infecções e ferida superficiais em muitos países.

No Brasil pesquisadores têm investido em pesquisas com *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) visando o uso de suas larvas na TL. A esterilização dos ovos foi pesquisada por Dallavecchia *et al*, (2014) e Vianna *et al*, (2018) utilizando o agente esterilizante glutaraldeído a 2%.

Existem evidências na literatura sobre o uso bem sucedido da TL para feridas traumáticas que não conseguem cicatrizar, tais como úlceras por pressão, úlceras diabéticas, decubitárias, vasculares e neurovasculares, osteomielite, fascite florida de necrotização, infecções pós-cirúrgicas e queimaduras (TÉLLEZ *et al*, 2012). Yates *et al*, (2003) utilizaram a TL numa úlcera de pé diabético, onde a ferida persistia incurável por um período de dois anos. Antes da cirurgia de amputação e juntamente ao uso de antibiótico, a larvoterapia foi oferecida ao paciente e após duas aplicações da TL o tecido de granulação era evidente. Husain e Fallat (2003) também utilizaram com sucesso para uma lesão traumática em membro inferior.

Essa terapia é indicada, sobretudo para pacientes que não respondem a tratamentos convencionais e aqueles que possuem enfermidades que dificultam tratamentos cirúrgicos (WANG *et al*, 2010). As poucas contra-indicações ao uso da TL compreendem o uso restrito em torno de feridas com órgãos ou vasos sanguíneos expostos, embora possam ser usados em torno de vasos sanguíneos com observação cuidadosa da equipe de enfermagem (CAMBAL *et al*, 2006).

Segundo Dallavechia (2011) para realizar a bioterapia é necessário dominar a técnica de esterilização dos ovos, para que assim as larvas não sejam vetores de infecção ao paciente. Desse modo é de importância fundamental conhecer a quantidade de larvas que emergirá de um determinado peso de massa de ovos esterilizados, pois o número ideal de larvas empregadas varia de acordo com o tamanho e condição da ferida. Sherman (2009) e Téllez *et al*, (2012) recomendam a utilização de cinco a 10 larvas por cm² da ferida. Sherman (2009) recomendam que as larvas permaneçam no leito da lesão por 24 a 72 horas.

No Hospital Universitário Onofre Lopes em Natal, RN, ocorre aplicação pioneira da terapia larval no Brasil através da enfermeira coordenadora da equipe de feridas do hospital, Julianny Barreto Ferraz desde 2012. Pinheiro (2014) utilizou larvas de segundo ínstar para aplicação da TL no Hospital Universitário Onofre Lopes, contudo, também pode ser feito o uso de larvas de primeiro ínstar, pois quanto menor for o ínstar larval aplicado, maior pode ser o tempo de permanência das larvas nas feridas (SHERMAN, 2009).

Nos países que utilizam essa bioterapia as larvas são produzidas por hospitais, centros de saúde ou são comercializadas por empresas. Existem duas formas de aplicação da terapia larval. No primeiro são aplicadas larvas livres no leito

da lesão. Os curativos costumam utilizar hidrocolóide (HUSAIN e FALLAT, 2003) e malha de nylon estéril (TÉLLEZ *et al*, 2012). O hidrocolóide protege a pele do paciente e forma uma base, permitindo que outros componentes do curativo sejam aderidos a ele. Em seguida, é inserido no tecido necrosado o número de larvas estéreis suficientes para realizar o desbridamento da ferida. As larvas são cobertas por um pedaço de tecido de nylon estéril, geralmente maior que a ferida e menor que o hidrocolóide, este tecido é fixado ao hidrocolóide por uma fita adesiva. O curativo é finalmente coberto com uma almofada absorvente, ou gaze, mantido no lugar com fita adesiva ou um curativo (WHITAKER, 2007).

O segundo método consiste na aplicação de larvas contidas em embalagens comumente chamadas de “biobags”. Estes possuem uma fina membrana porosa, que permite a passagem de fluidos e componentes dos tecidos necróticos liquefeitos e das secreções e excreções larvais, que possam atravessá-la para que as enzimas degradem o tecido necrótico, e controlem processos infecciosos da ferida. GRASSBERGER e FLEISHMANN (2002) desenvolveram o “biobag” com intuito de aumentar a aceitação da TL, facilitando a sua aplicação e evitando desconforto do paciente. A aceitação parece ser melhor nessa forma de tratamento pelos pacientes e profissionais da saúde, do que com as larvas livres (GRASSBERGER e FLEISHMANN, 2002).

A maior parte das larvas de moscas que causam miíases pertence à família Calliphoridae, e os califorídeos também são utilizados na terapia larval, sendo a espécie *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) a mais empregada. No Brasil, existe interesse em utilizar a espécie *C. megacephala* por ter características biológicas semelhantes com *L. sericata* e apresentar maior distribuição em território nacional (GOMES; SANTOS, 2015).

Chrysomya megacephala é uma espécie de mosca varejeira de ampla importância médica-ecológica, além de ser um importante agente polinizador (GOMES, 2012), esse díptero muscóide desempenha um papel de destaque para a entomologia forense por auxiliar na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) em cadáveres (FERRAZ *et al*, 2012) e na terapia larval pois é comprovadamente benéfica no tratamento de feridas necróticas (PINHEIRO, 2014). A região de origem de *C. megacephala* é o Sudeste Asiático (ESSER, 1990) e lá são conhecidas como

“a peste do peixe seco”, por suas larvas se desenvolverem principalmente nesse tipo de substrato.

Este díptero, bem como outras moscas varejeiras utiliza para alimentação e oviposição substratos orgânicos em decomposição, como vísceras, carcaças, fezes e lixo (KAMAL *et al*, 1958 e PUTMAN *et al*, 1977). Como esses dípteros têm por hábito pousar em resíduos em decomposição, como fezes e lixos, estes acabam atuando como vetores mecânicos de organismos patogênicos como as bactérias entéricas, ovos e cistos de protozoários, esporos de fungos e larvas de helmintos (GREENBERG, 1968; FURLANETO *et al*, 1984; QUEIROZ *et al*, 1999).

Segundo GUIMARÃES (1984), os hábitos alimentares generalistas de *C. megacephala* possibilitam sua adaptação em diferentes ambientes. Toda criação em laboratório visa, portanto, reproduzir o ambiente natural desses dípteros, assim também são utilizados substratos como carne *in natura*.

A oviposição das massas de ovos ocorre de forma agregada, pois as fêmeas são estimuladas a depositarem seus ovos em locais próximos de outras fêmeas que estão ovipondo (NORRIS, 1965). Durante os estágios larvais ocorre o período mais crucial para a obtenção de recursos alimentares, uma vez que os mesmos tornam-se limitados dependendo da quantidade de larvas existentes sobre o substrato, então as larvas ingerem o máximo de nutrientes possível, a fim de acumularem mais reservas para a fase de pupariação e terem mais chances de sobreviver, até que se esgotem os recursos alimentares (ULLYETT, 1950). As larvas mais pesadas tendem a se desenvolver em adultos com maior capacidade reprodutiva (MILWARD DE AZEVEDO, 1991).

A dieta natural para a criação de larvas de *C. megacephala* é a carne bovina (ULLYETT, 1950), e é comumente utilizada uma quantidade de dieta de aproximadamente de 1g por larva, pois esta foi verificada por AGUIAR e MILWARD DE AZEVEDO (1996) como a densidade ideal relativa na utilização de carne para diferentes califorídeos. Contudo, diferentes dietas alternativas podem ser realizadas para criar e manter em meio laboratorial os imaturos de *C. megacephala*. De acordo com PARRA (1996) uma dieta alternativa só é efetiva em comparação a carne *in natura* se possuir os aspectos nutricionais que supram as necessidades do inseto e as características físicas, químicas e microbiológicas que capacitem o processo alimentício das larvas.

Um bom exemplo de dieta alternativa, cujo desempenho apresenta índices satisfatórios é a moela de frango. Por possuir uma consistência similar à da carne e apresentar as condições necessárias ao desenvolvimento dos imaturos de califorídeos, esta poderia facilmente substituir outros substratos. A moela de frango não precisa ser cortada, uma vez que devido ao seu formato, já está em tamanho ideal para o uso imediato (FERRAZ, 2012).

A base em Ágar pode ser utilizada como princípio básico da dieta artificial pela sua característica de gel firme em diferentes temperaturas (INSUMOS, 2008), de forma análoga à consistência da carne *in natura*. Além disso, o Ágar não apresenta substâncias tóxicas que poderiam ser incorporadas pelas larvas, e conseqüentemente passada para humanos. Sua composição é essencialmente de fibras, sais minerais, anidrogactose, celulose e em menor quantidade de proteínas. (INSUMOS, 2008). Estudos anteriores mostraram que a dieta alternativa a base de homogenato de moela se assemelha a dieta natural de carne *in natura* (FERRAZ, 2012) sobre os aspectos de viabilidade larval, duração média dos estágios larval e pupal, média de massa individual de larvas e fertilidade das fêmeas maduras.

O presente estudo propõe desenvolver uma dieta a base de Ágar considerando que com sua característica de substrato consistente, possibilitaria que as larvas que ali estivessem se alimentando, por até 48 horas não venham a penetrar na dieta, assim como normalmente ocorre em substratos naturais facilitando assim sua remoção para utilizações posteriores. Associado ao Ágar será adicionado o homogenato pulmão bovino, substrato suficiente para suprir as necessidades nutricionais dos insetos como demonstrado por SOUZA (2017).

Este substrato alimentar a base de homogenato de pulmão bovino em Ágar seria uma alternativa ao Ágar sangue, que é comumente utilizado para manter e criar larvas estéreis de califorídeos do primeiro ao segundo estágio para serem usados na TL (MARCONDES *et al*, 2006). Visando desenvolver uma dieta mais econômica, prática, fácil de ser reproduzida e nutritiva para esta espécie.

2. OBJETIVO

Objetivou-se desenvolver e avaliar o desempenho de uma dieta alternativa para criação de larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) para utilização na terapia larval.

2.1 Objetivos específicos

(a) Desenvolver uma dieta estéril de pulmão bovino a base de Ágar nas concentrações de 5, 10 e 15% de conteúdo protéico;

(b) Relacionar e comparar as diferentes concentrações da dieta alternativa com o tempo de desenvolvimento e a viabilidade larval de *C. megacephala*;

(c) Relacionar o peso de massa de ovos com o número de larvas estéreis de primeiro instar (L1).

3. METODOLOGIA

3.1 Procedência e manutenção da colônia de *Chrysomya megacephala*

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Estudo de Dípteros (LED) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP), no Instituto Biomédico (IB), da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

A colônia de *C. megacephala* foi estabelecida a partir de adultos coletados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro, RioZoo, localizado no bairro de São Cristóvão, no período de março a maio de 2018, foram utilizadas armadilhas produzidas através de tubos de PVC, descritas segundo MELLO *et al*, (2007). As armadilhas ficaram suspensas a 1,7m do solo por correntes de ferro e apoiadas em galhos de árvores, expostas por aproximadamente 24 horas. Em seu interior foram inseridas como isca peixe (sardinha) não refrigeradas para exalar odor a fim de atrair os dípteros.

As moscas adultas capturadas foram identificadas segundo a chave de identificação taxonômica de Mello *et al*, (2003). Apenas a espécie *C. megacephala* foi transferida para gaiolas de polietileno (40x30x20cm), com superfície superior e abertura posterior revestida de tecido de náilon, permitindo ventilação e acesso ao interior da gaiola, respectivamente. Para alimentação dos adultos foram oferecidos em recipientes de polietileno diariamente mel a 50%, água e como substrato nutritivo para maturação dos folículos ovarianos e oviposição a moela de frango, seguindo a descrição de BARBOSA *et al*, (2004) e FERRAZ *et al*, (2011).

3.2 Preparo e avaliação do homogenato Ágar pulmão bovino

Para preparação do homogenato de pulmão bovino, o pulmão foi batido em mixer (Figura 2) utilizando três concentrações diferentes. No Tratamento 1 (T1) utilizou-se uma parte de pulmão para nove partes de água (1:9). No Tratamento 2 (T2) duas partes de pulmão para oito de água (1:4). No Tratamento 3 (T3) três partes de pulmão para sete de água (3:7). Depois de batidas e para assumir aspecto homogêneo, as porções fibrosas do pulmão que não se homogenizaram na solução e ficaram presas às hélices do mixer em coágulos foram filtradas em peneira

doméstica, até que fossem retiradas todas as partes fibrosas da solução. A seguir transferiu-se 100 mL de cada tratamento para Béqueres de 400 mL.

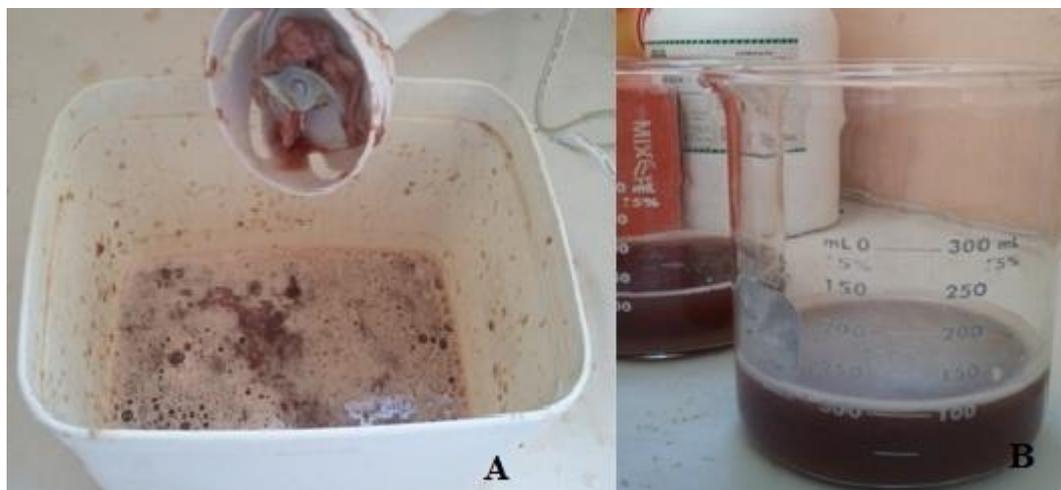


Figura 2. (A) Preparo do homogenato pulmão bovino utilizando mixer; (B) Homogenato filtrado antes de ser acrescido ao Ágar.

(Fonte: Acervo pessoal)

A solução de Ágar foi preparada conforme as recomendações do fabricante a 2% em água, aquecido a 100°C até a sua dissolução total, e então se adicionou 100 mL da solução de Ágar aos 100 mL de homogenato. Dessa forma, no T1 o homogenato Ágar pulmão bovino apresenta-se na concentração de 5%, no T2 a 10% e no T3 a 15%. As dietas que foram esterilizadas (E) passaram pela autoclave, por 15min / 121°C. Preparou-se, da mesma forma, três tratamentos que não passariam pelo procedimento de esterilização (NE).

Cada tratamento foi dividido em três repetições transferidas para placas de Petri (Figura 3), formando-se assim nove placas de Petri com 200 mL de cada dieta. Após a dieta se solidificar estando à temperatura ambiente, transferiu-se para cada repetição 40 larvas de *C. megacephala* de 12^o geração em laboratório manualmente com auxílio de um pincel número 0. Vedou-se cada placa com filme de PVC a fim de evitar a saída das larvas. Como controle foi utilizado Ágar sangue onde se realizou o mesmo procedimento em três repetições para transferência de larvas como descrito para a dieta homogenato de pulmão em Ágar.

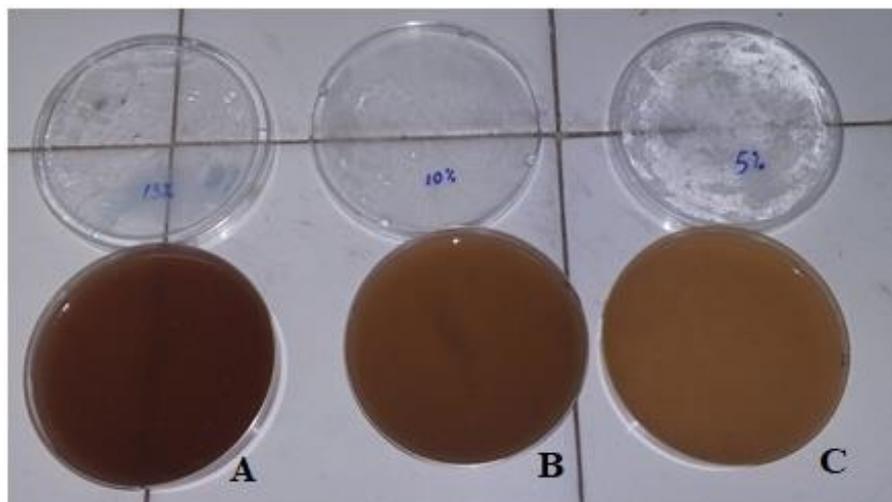


Figura 3. (A) Homogenato pulmão bovino em Ágar recém preparado não estéril a 15%; (B) Homogenato pulmão bovino em Ágar recém preparado não estéril a 10%; (C) Homogenato pulmão bovino em Ágar recém preparado não estéril a 5%.

(Fonte: Acervo pessoal)

Foi avaliada a capacidade das larvas de penetrarem na dieta durante todo o processo alimentar. Considerou-se “baixa penetração” quando quatro larvas ou menos (\leq a 10% do total) penetraram na dieta; “média penetração” quando de cinco a dez larvas penetraram na dieta (de 12,5 a 25% do total) e para “alta penetração” quando mais de dez larvas penetraram na dieta ($>$ 25% do total).

Também foi avaliado o crescimento das larvas ao se alimentarem das dietas por 48 horas. Considerou-se “baixo crescimento” quando as larvas de primeiro instar não passaram para o segundo instar larval, atingindo aproximadamente de 1,0 a 3,0 mm de comprimento; larvas com “médio crescimento” aquelas que chegaram até o segundo instar atingindo comprimento acima de 3,0 até 6,0 mm; larvas com “elevado crescimento” aquelas que se alimentaram e cresceram até o segundo ou terceiro instar larval, atingindo comprimento aproximadamente superior a 6,0 até 12,0 mm.

Os três tratamentos, esterilizados e os três não estéreis, bem como o tratamento controle foram transferidos para capela de criação de larvas, e ali permaneceram por 48 horas. O registro médio da temperatura durante a fase experimental foi de 26,3°C dia; 17°C noite e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa do ar.

3.3 Estudo da relação de larvas de primeiro instar (L1) estéril e o peso das massas de ovos

3.3.1 Esterilização dos ovos para obtenção de L1 estéril

Para o procedimento de esterilização dos ovos de *C. megacephala* foi utilizado glutaraldeído a 2%. A massa de ovos de 0,15g foi imersa em solução salina estéril (20 mL), por 15 minutos, e dissociados com pincel número 0. Em seguida, o conteúdo foi filtrado através de papel filtro em suporte plástico estéril conectado a bomba de vácuo 1 atm, tendo um kitasato para reter o filtrado. Por fim, a massa de ovos foi imersa por 15 minutos em Glutaraldeído (Glutacin 28®), ativada com solução saturada de bicarbonato, atingindo pH de 8,3-8,5. Após filtração, o material foi rinsado com 30 mL de Caldo Soja Trypticaseína (TSB), e filtrado utilizando bomba de vácuo. Foi utilizada cabine de segurança biológica tipo Classe I.

3.3.2 Avaliação massa de ovos e número de larvas eclodidas

Cinco massas de ovos estéreis de *C. megacephala* de 0,050 gramas oriundas de fêmeas da 12^o geração criadas no Laboratório de Estudo de Dípteros foram transferidas para capela de criação de larvas na dieta alternativa não estéril de homogenato Ágar pulmão bovino a 10% por 48 horas na dieta. Após esse período as larvas foram retiradas das dietas com auxílio de um pincel número 0 e contadas manualmente. A média de temperatura durante os dias foi de 26°C dia; 20°C noite e 70±10% de umidade relativa do ar.

Um procedimento semelhante foi realizado utilizando cinco repetições de 0,150 gramas de massa de ovos estéril. As massas foram transferidas para capela de criação de larvas por 24 horas, nas mesmas placas de Petri onde foram mantidas após a esterilização. Contudo as larvas recém eclodidas (L1) não foram transferidas para uma dieta, e sim para cinco placas de Petri com álcool 70, de modo que apenas foram contadas as larvas que haviam eclodido dos ovos com o auxílio de uma lupa NIKON. A média de temperatura durante o dia foi de 25,5°; 18,5°C noite e 70±10% de umidade relativa do ar.

3.4 Análise estatística

Esta foi realizada empregando o software Bioestat versão 5.3. A análise de variância (ANOVA) e pós teste de Tukey foram realizados para verificar diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos realizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade das larvas de *Chrysomya megacephala*

A viabilidade de larvas de *Chrysomya megacephala* criadas na dieta a base de homogenato Ágar pulmão está representado na Tabela 1, a menor taxa de viabilidade foi obtida no primeiro tratamento estéril (T1 E) indicando que esta concentração de homogenato não supriu as necessidades alimentares das larvas, e um percentual grande de larvas não sobreviveu até o segundo estágio larval.

Houve diferença significativa entre as taxas de viabilidade deste tratamento em relação a T2 E, T2 NE, T3 NE e o AS (controle). Os tratamentos T2E, T3E, T1NE, T2NE, T3NE e AS não obtiveram diferença significativa entre eles e todos apresentaram uma viabilidade maior que 70%.

As maiores taxas de viabilidades foram obtidas no T2E e T3NE, indicando que não há diferença significativa entre tratamento estéril e não estéril, bem como, não há diferença significativa entre o T2 e T3. Comparando apenas as dietas estéreis o T2 apresentou maior índice de viabilidade, enquanto nas dietas não estéreis o T3 apresentou melhores taxas.

TABELA 1. VIABILIDADE DE LARVAS DE *Chrysomya megacephala* ATÉ O SEGUNDO ÍNSTAR CRIADAS EM DIETA A BASE DE HOMOGENATO ÁGAR PULMÃO BOVINO.

| TRAT. | X (%) | IR (%) | p valor de significância | | | | | |
|-------|-------|------------|--------------------------|-----|------|-------|-------|-------|
| | | | T2E | T3E | T1NE | T2NE | T3NE | AS |
| T1E | 44,15 | 27,50– 55 | <0,01 | ns | ns | <0,05 | <0,01 | <0,05 |
| T2E | 86,67 | 77,50– 100 | | ns | ns | ns | ns | ns |
| T3E | 74,17 | 67,50– 85 | | | ns | ns | ns | ns |
| T1NE | 73,32 | 65 – 80 | | | | ns | ns | ns |
| T2NE | 78,32 | 72,50– 85 | | | | | ns | ns |
| T3NE | 89,17 | 82,50– 95 | | | | | | ns |
| AS | 78,33 | 60 – 97,50 | | | | | | |

T1E= Dieta estéril 5% homogenato de pulmão bovino; T2E= Dieta estéril 10% homogenato de pulmão bovino; T3E=Dieta estéril 15% homogenato de pulmão bovino; T1NE= Dietanão estéril 5% homogenato de pulmão bovino; T2NE= Dietanão estéril 10% homogenato de pulmão bovino; T3NE= Dietanão estéril 15% homogenato de pulmão bovino; AS= Ágar sangue (Controle); ns= não significativo, *Teste ANOVA seguido de pós teste Tukey. X= média. IR= intervalo relativo de variação da média.

A Figura 4 evidencia que os níveis de média, mediana e desvio padrão da viabilidade larval em todas as dietas de homogenato Ágar pulmão bovino se apresentam em níveis bem próximos, não apresentando diferença significativa entre eles, exceto o primeiro tratamento que apresentou diferença com a maior parte dos demais tratamentos. Este só não apresentou diferença significativa com o terceiro tratamento estéril e o primeiro tratamento não estéril, pois o número mínimo de larvas de T2E e T1NE e o número máximo de larvas de T1E se mantiveram próximos.

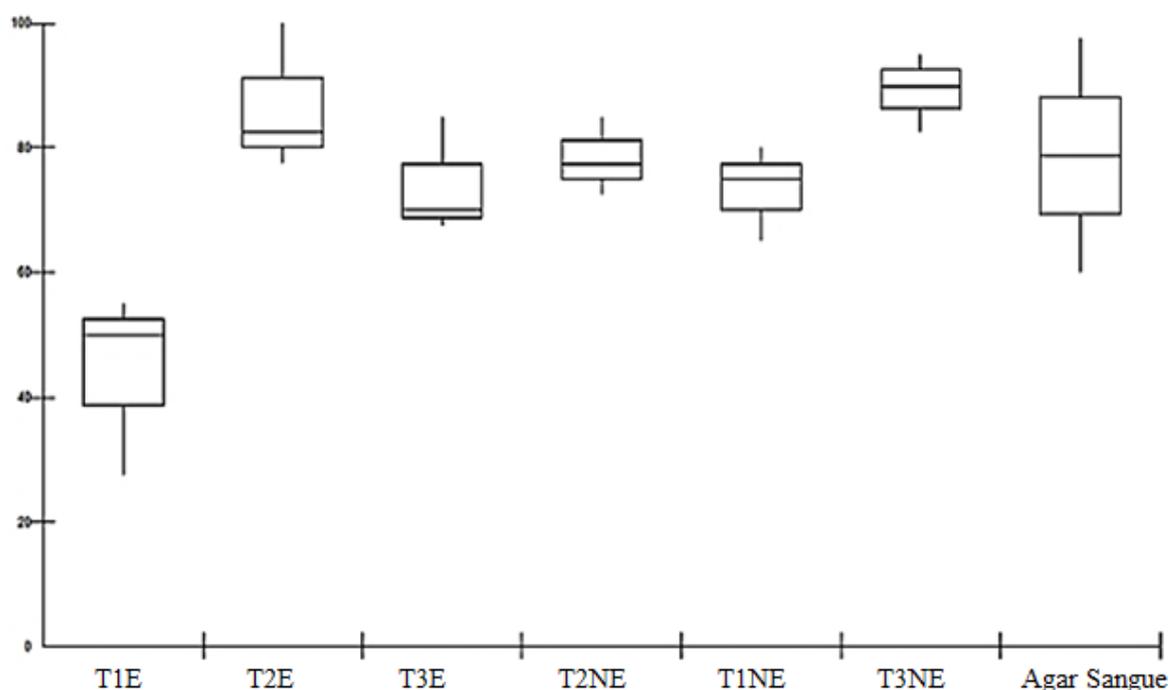


Figura 4. Média, mediana e desvio padrão da viabilidade de larvas de *Chrysomya megacephala* até o segundo ínstar criadas em dieta a base de homogenato ágar pulmão bovino.

Para criar larvas visando a utilização na TL é requerida uma dieta estéril, ao invés de uma não estéril. Verificou-se que a dieta estéril testada permitiria que ovos dissociados estéreis pudessem ser transferidos para esta dieta não havendo

redução de sua taxa de viabilidade em função de ter passado pelo procedimento de esterilização, desse modo, permitiria a produção de insetos viáveis para serem aplicados na TL com segurança para o paciente.

Os resultados também mostraram que as dietas artificiais testadas possuem nutrientes suficientes para as larvas se desenvolverem até o segundo estágio larval em 48 horas, e que não há diferença significativa entre a viabilidade das dietas de homogenato em base de Ágar e do controle Ágar sangue.

AGUIAR-COELHO *et al*, (1995) consideraram a densidade relativa ideal para criação de diferentes califórdeos de uma larva por um grama de tecido. Contudo no presente estudo foram utilizadas placas de Petri descartáveis de dimensões 90x15 mm que comportam aproximadamente 25 mL de solução a base de Ágar, segundo a ANVISA. Em cada placa foram transferidas 40 larvas, assim obtendo uma razão menor de dieta do que o ideal para as larvas. Isto se explica pelo fato de que no presente estudo não se objetivou manter esses indivíduos na dieta até seu completo desenvolvimento.

SOUZA (2017) observou que a viabilidade larval de *Chrysomya albiceps* (Wiedmam, 1819) (Diptera: Calliphoridae) foi elevada (acima de 86%), em larvas desenvolvidas na dieta de pulmão bovino, mostrando ser um substrato de adequado valor nutricional. Na dieta pulmão as larvas se desenvolveram passando por todos os estágios larvais em uma duração de 3,5 a 4,5 dias. Enquanto que no presente estudo uma parcela significativa de larvas em 48 (2dias) horas se desenvolveram até o segundo ínstar larval.

A Figura 5 mostra o resultado final do desenvolvimento larval após 48 horas de desenvolvimento de 40 larvas de primeiro instar serem transferidas para a dieta esterilizada de homogenato Ágar pulmão bovino nas três concentrações. Podem ser visualizadas larvas mais desenvolvidas no segundo (Figura 5B) e terceiro tratamento (Figura 5C), 10% e 15% respectivamente. A dieta a 15% não apresentou homogeneidade na textura após o procedimento de esterilização, pois provavelmente devido a seu maior valor protéico, as proteínas da dieta se agregaram, formaram coágulos e porções separadas do Ágar.

Apesar de seu caráter heterogêneo, a dieta se apresentou consistente o suficiente para impedir um alto nível de penetração larval. Nesse terceiro tratamento as larvas se reuniram apenas na região onde havia os coágulos de homogenato, se

alimentaram e sobreviveram 48 horas. Na dieta a 5% uma grande quantidade de larvas não sobreviveu 48 horas e as que sobreviveram pouco se alimentaram, demonstrando o baixo valor nutricional desse tratamento.

No segundo tratamento, onde a concentração de homogenato estava a 10% obteve-se um dos melhores resultados para viabilidade larval, mais de 85%, e um baixo índice de penetração larval na dieta. Isto indica que a dieta mesmo após o procedimento de esterilização se mostrou perfeitamente viável para permitir nela o desenvolvimento larval.



Figura 5. (A) Dieta estéril após 48 horas a 5% com as larvas sobreviventes de *C. megacephala*; (B) Dieta estéril após 48 horas a 10% com as larvas sobreviventes de *C. megacephala*; (C) Dieta estéril após 48 horas a 15% com as larvas sobreviventes de *C. megacephala*.

(Fonte: Acervo pessoal)

A Figura 6 mostra o resultado final do desenvolvimento larval 48 horas após 40 larvas de primeiro instar serem transferidas para a dieta não esterilizada de homogenato Ágar pulmão bovino nas três concentrações. Assim como no primeiro tratamento estéril, a concentração de 5% de homogenato Ágar pulmão bovino não estéril não foi suficientemente nutritiva para permitir maior robustez larval, e em sua maior parte, as larvas estavam bem menores do que nos outros tratamentos de maior concentração, contudo a viabilidade larval se apresentou alta, maior que 70%.

No segundo e terceiro tratamento as larvas se desenvolveram adequadamente, apresentaram altos níveis de viabilidade larval, sendo o terceiro tratamento aquele que obteve o maior índice de viabilidade, 89,17% inclusive com maior taxa de viabilidade do que a obtida na dieta controle que atingiu 78,33%. As

dietas estéreis se apresentaram tão viáveis quanto às não estéreis (exceto o primeiro tratamento estéril) para a viabilidade e desenvolvimento larval.

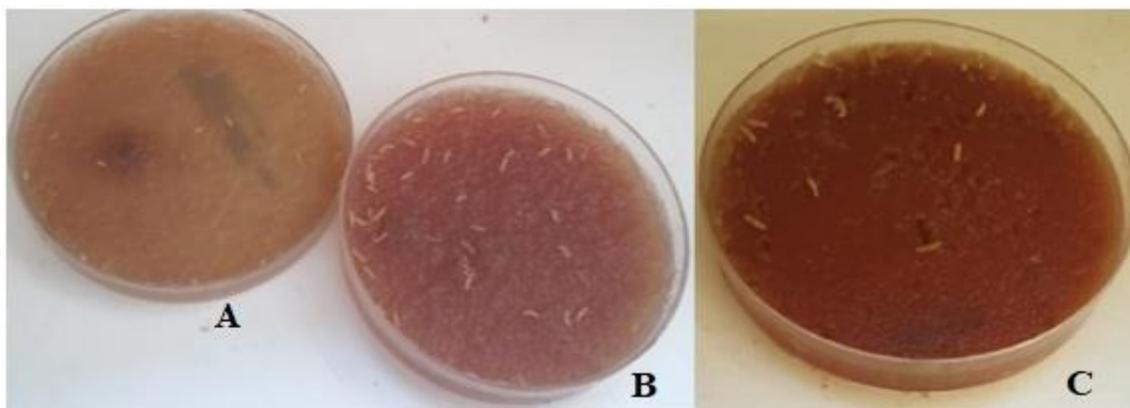


Figura 6. (A) Dieta não estéril após 48 horas a 5% com as larvas sobreviventes de *C. megacephala*; (B) Dieta não estéril após 48 horas a 10% com as larvas sobreviventes de *C. megacephala*; (C) Dieta não estéril após 48 horas a 15% com as larvas sobreviventes de *C. megacephala*.

(Fonte: Acervo pessoal)

A Figura 7 mostra o resultado final do desenvolvimento larval 48 horas após 40 larvas de primeiro instar serem transferidas para a dieta controle Ágar sangue. O controle não apresentou diferença significativa de viabilidade larval com nenhum tratamento das dietas de homogenato Ágar pulmão bovino, salvo o primeiro tratamento estéril, com concentração de 5%. Esses dados indicam que o Ágar sangue pode ser substituído pelas dietas alternativas de homogenato Ágar pulmão bovino.

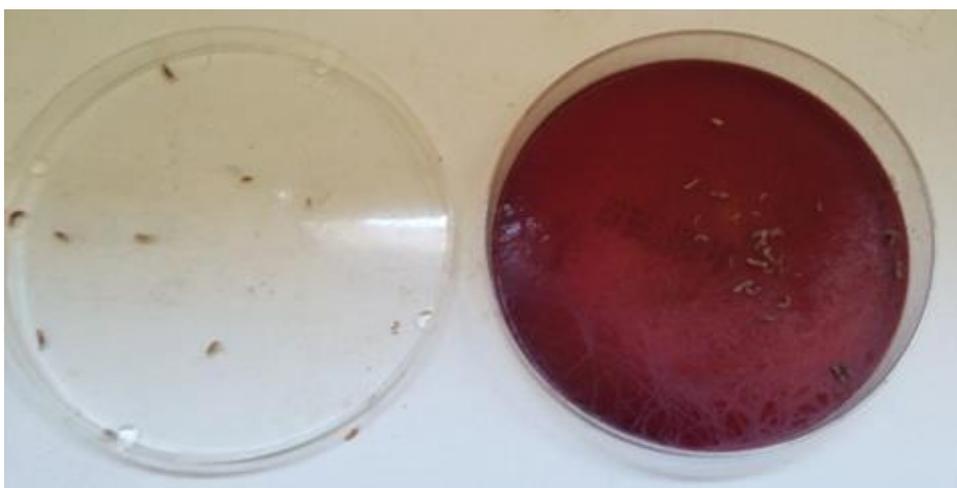


Figura 7. Ágar sangue (controle) após 48 horas com as larvas sobreviventes de *C. megacephala*.

(Fonte: Acervo pessoal)

A Figura 8 evidencia os altos índices de viabilidade larval das dietas de homogenato Ágar pulmão bovino tanto nos tratamentos estéreis quanto nos não estéreis. O grupo controle da mesma forma obteve um alto índice de viabilidade larval, contudo este índice foi menor em comparação com o segundo tratamento estéril e o terceiro tratamento não estéril.

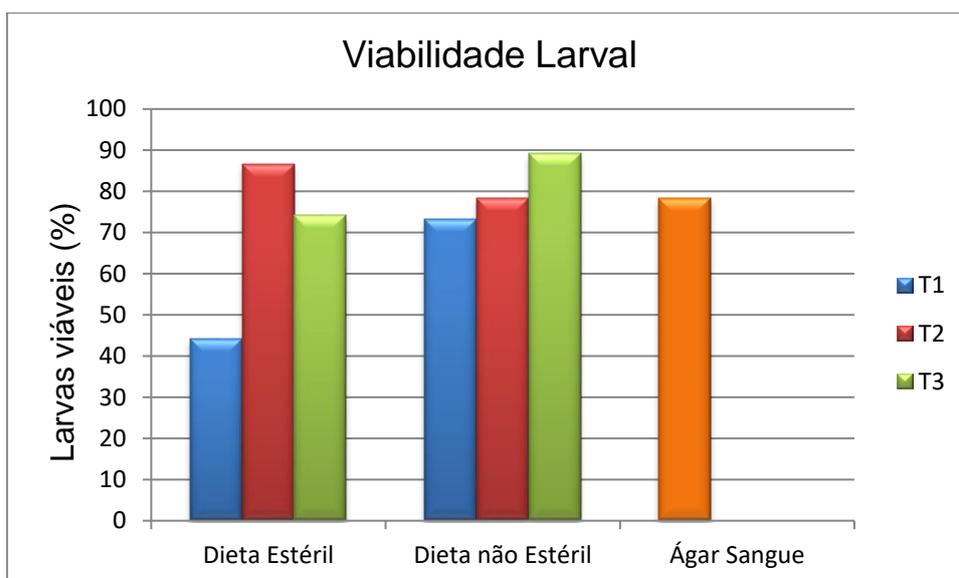


Figura 8. Taxa de viabilidade larval (larvas que sobreviveram após o período de 48 horas) nas dietas artificiais estéreis, não estéreis e do grupo controle Ágar Sangue.

4.2 Resultado do crescimento e taxa de penetração larval

Os resultados presentes no Quadro 2 mostraram que o primeiro tratamento (homogenato Ágar pulmão bovino a 5%) é o que contém menor valor nutricional para as larvas, pois as larvas apresentaram "baixo crescimento" e visivelmente não passaram para o segundo instar larval tanto na dieta estéril quanto na não estéril.

As larvas do terceiro tratamento (homogenato Ágar pulmão bovino a 15%) foram as que mais se desenvolveram dentre todos os tratamentos, demonstrando que essa concentração possui ótimo nível de unidade nutricional para as larvas se desenvolverem. As larvas do segundo tratamento (homogenato Ágar pulmão bovino a 15%) também se desenvolveram adequadamente e em sua maioria estavam visivelmente no segundo estágio larval.

Quadro 2. CARACTERÍSTICA DO DESENVOLVIMENTO DAS LARVAS DE *Chrysomya megacephala* ATÉ O SEGUNDO ÍNSTAR EM DIETA A BASE DE HOMOGENATO ÁGAR PULMÃO BOVINO.

| Tratamentos | Dieta Estéril | Dieta Não Estéril | Ágar sangue |
|-------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| T1 | Baixo crescimento Sem Introdução | Baixo crescimento Baixa Introdução | Médio crescimento Baixa Introdução |
| T2 | Alto crescimento Baixa Introdução | Médio crescimento Baixa Introdução | |
| T3 | Alto crescimento Baixa Introdução | Alto crescimento Média Introdução | |

Baixa introdução: quatro ou menos penetraram a dieta. Média introdução: cinco a dez larvas introduzidas na dieta. Baixo crescimento: possuem de 1,0 a 3,0 mm. Médio crescimento: possuem de 3,0 a 6,0 mm. Alto crescimento: possuem de 6,0 a 12,0 mm.

De forma geral, a dieta estéril leva vantagem quanto ao índice de penetração na dieta, pois devido ao processo de esterilização apresentou-se mais consistente. As larvas do segundo tratamento da dieta estéril se alimentaram muito e poucas penetraram a dieta, mostrando que a dieta estéril consegue servir de ótimo substrato nutricional e reduz os índices de penetração na dieta.

Quanto ao tamanho das larvas, tanto a estéril quanto a não estéril se equiparam, sendo perceptível que quanto maior o desenvolvimento larval na dieta, maior a chance das larvas conseguirem penetrar a dieta a fim de procurar mais nutriente. Os segundo e terceiro tratamentos apresentaram os maiores índices de crescimento larval.

4.3 Resultado da relação massa de ovos e número de larvas

Com o intuito de observar se as larvas eclodidas de massas de ovos estéreis seriam capazes de se desenvolver numa dieta feita a base Ágar pulmão bovino, transferiu-se os ovos recém esterilizados para a dieta de Ágar pulmão bovino não estéril a 10%, pois esta concentração demonstrou alto nível de viabilidade larval neste mesmo estudo. Por esse motivo permitiu-se que as larvas permanecessem na dieta por 48 horas, dando-lhes tempo suficiente para alcançarem o segundo ínstar larval.

Neste experimento o número médio de larvas emergidas a partir de cinco repetições de 0,050 gramas de massas de ovos estéreis foi de 50,6 larvas com intervalo de variação de 36 a 74 larvas, como demonstrado na Figura 9. Na Figura 10 observa-se o desenvolvimento final das larvas em cada repetição.

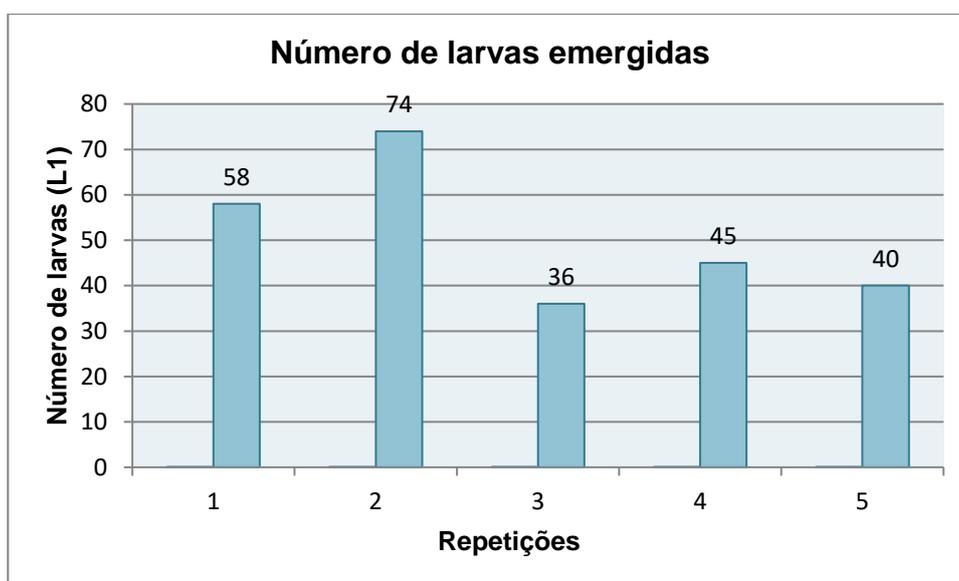


Figura 9. Número de larvas emergidas de 0,050 gramas de massa de ovos de *C. megacephala* transferidas para a dieta de homogenato Ágar pulmão bovino a 10%.

(Fonte: Acervo pessoal)

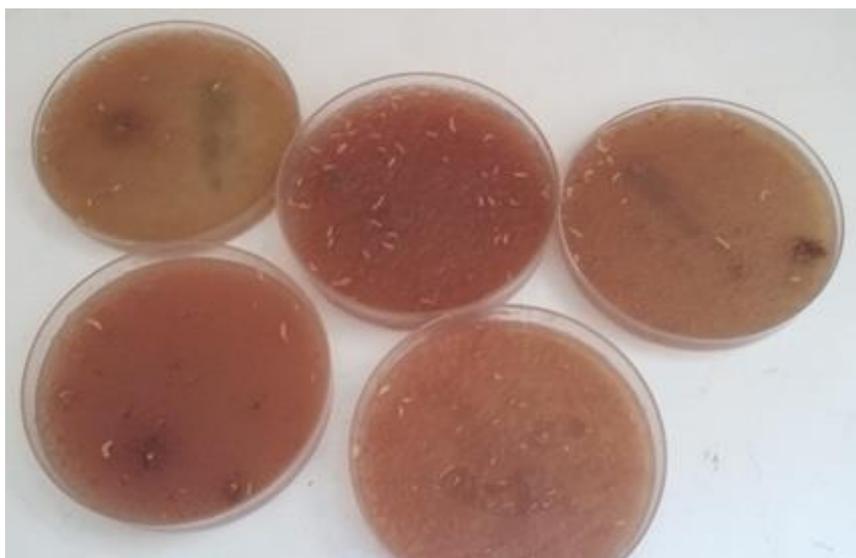


Figura 10. Larvas eclodidas de 0,050g de massa de ovos de *C. megacephala* após alimentarem-se por 48 horas na dieta artificial de homogenato Ágar pulmão bovino a 10%.

(Fonte: Acervo pessoal)

A fim de observar apenas a eclosão larval de massas de ovos recém esterilizadas, estas larvas foram mantidas em placas de Petri por 24 horas sem fonte protéica, e após este período de tempo foram transferidas para placas de Petri contendo Álcool 70. Desse modo apenas larvas de primeiro ínstar foram contadas.

Neste experimento onde se utilizou cinco repetições de 0, 150 gramas de massa de ovos estéril de *C. megacephala* obteve-se uma média de 213,8 larvas, com intervalo de variação de 161 a 295 larvas, como demonstrado na Figura 11.

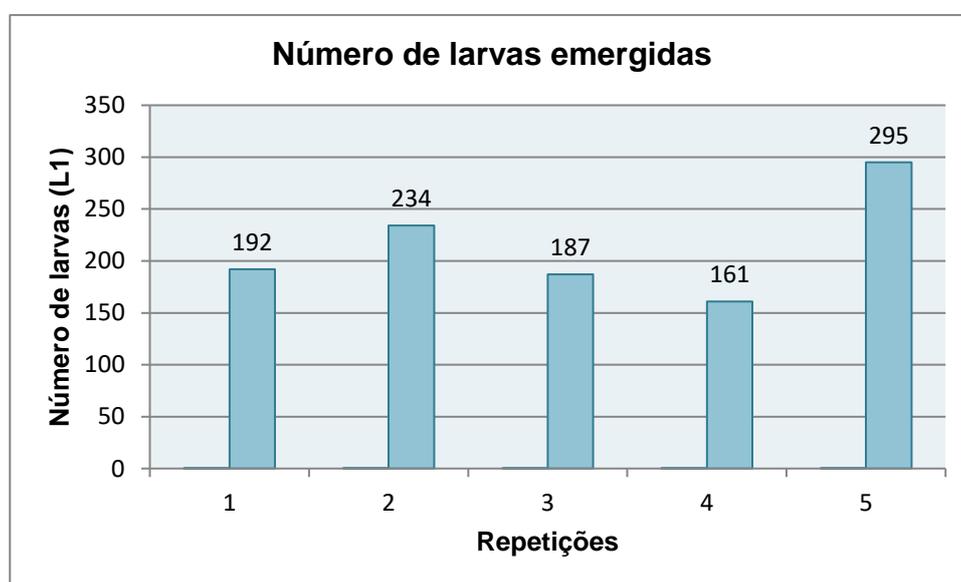


Figura 11. Número de larvas emergidas de 0, 150 gramas de massa de ovos de *C. megacephala* transferidas para placas de Petri com álcool 70.

(Fonte: Acervo pessoal)

Constatou-se que em 0, 150 gramas de massas de ovos de *C. megacephala* emergiram em média 210 larvas L1. No entanto, uma quantidade três vezes menor, uma média de 50 larvas por grama de dieta se desenvolveu no homogenato pulmão bovino até o segundo ínstar larval.

Seguindo a lógica proporcional, se em 0, 150 gramas de massa de ovos emergem 210 larvas em média, esperava-se que em 0, 050 gramas emergissem em média 70 larvas, contudo o resultado foi menor, pois as larvas transferidas para placas de Petri em álcool 70% não tiveram que desbridar a dieta, e conseqüentemente não cresceram e competiram por substrato entre si. Von Zuben

et al, (2000) verificou que há competição larval e que pode depender tanto da densidade larval como pela quantidade de alimento, não permitindo o mesmo acesso ao alimento a todas as larvas. No entanto mais experimentos são necessários para se obter maior precisão de dados.

5. CONCLUSÃO

Tanto as dietas estéreis e não estéreis de homogenato Ágar pulmão bovino podem ser usadas para substituir o Ágar sangue para uso na terapia larval, pois não há diferença significativa entre seus índices de viabilidade, que em sua maior parte se encontrou entre 70% e 90%. As concentrações de 10% e 15% de homogenato Ágar pulmão bovino foram as que apresentaram maiores índices de viabilidade e desenvolvimento larval, pois a maior parte das larvas sobreviveu e se alimentou por 48 horas.

Quanto ao nível de introdução das larvas, as dietas estéreis obtiveram menores índices do que as não estéreis. Isso é de grande benefício para terapia larval, pois quanto menor for a introdução das larvas na dieta, mais facilmente são retiradas para aplicações da terapia larval. Com este estudo verificou-se que, de 0,050 gramas de massa de ovos, em média, 50 larvas de *C. megacephala* sobrevivem até o segundo instar larval.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agar ou Agar-agar: o mais antigo ficocolóide. Aditivos & Ingredientes 56: 31-39. Insumos, Editora, 2008. Disponível em: http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf. Acesso em: 15 jun. 2019.

AGUIAR- COELHO, VM; MILWARD-DE-AZEVEDO, EMV (1996). Relações intra-específicas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Díptera) sob condições de laboratório. Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 35-40.

AGUIAR-COELHO, VM; QUEIROZ, MM; MILWARD-DE-AZEVEDO, EMV (1995). Associações entre larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, v. 12, n. 4, p. 983–990.

CAMBAL M; LABAS P; KOZANEK M; TAKAC P; KRUMPALOVA Z (2006). Maggot Debridement Therapy, Bratisl Les Listy, Eslováquia, v. 107, n.11/12, p.442-444.

Controle de qualidade em microbiologia clínica (2008). Módulo 6, Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), Pontos críticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo6/tsa.htm> Acesso em: 6 jul.2019.

DALLAVECCHIA, DL; FERRAZ, ACP; MIRANDA, GS; SILVA, AS; AGUIAR, VM (2015). Comparative Study Between Chicken Gizzards and Beef as Diets and its Influences on the Post Embryonic Development and Longevity of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). EntomoBrasilis v. 8, n. 1, p. 17-23.

DALLAVECCHIA, DL; FERRAZ, ACP; SILVA, DC; FILHO, RGS; AGUIAR, VM (2018). Post-embryonic development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae)

on a diet containing ampicillin in different concentrations. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 88, n. 1, p. 105-116.

FERRAZ, ACP (2012). Avaliação de novas dietas e o efeito da adição de antibióticos no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819) e *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). Programa de pós-graduação em biologia animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

FERRAZ, ACP; DALLAVECCHIA, D L; SILVA, DC; CARVALHO, RP; FILHO, RGS; COELHO, VMA (2012). Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. Journal of Insect Science, Rio de Janeiro, v. 12, n. 43, p. 1-11.

FERRAZ, JB (2019). Pesquisadores do HUOL e IMD buscam aprimorar técnica para melhorar tratamento com Terapia Larval. Disponível em: <<https://ufrn.br/imprensa/materias-especiais/22600/pesquisadores-do-huol-e-imd-buscam-aprimorar-tecnica-para-melhorar-tratamento-com-terapia-larval>>. Acesso em: 28 jun. 2019.

GOMES, G (2012). Aspectos fisiológicos de *Chrysomya megacephala* (f.) (Diptera:Calliphoridae): metabolismo energético, termorregulação e neurofisiologia. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Área de Concentração - Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

GOMES, L; VON ZUBEN, CJ; GOVONE, JS (2002). Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. Entomologia y Vectores, Rio de Janeiro, v. 9, n.1, p.115-132.

GOMES, PM; SANTOS, AMM (2015). Moscas sinantrópicas nocivas, um desafio atual: *Musca domestica* L. (MUSCIDAE) E *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS) (CALLIPHORIDAE). Revista SUSTINERE, Rio de Janeiro, v. 3, n. 2, p. 89-106.

GRASSBERGER, M; FLEISCHMANN, W (2002). The Biobag – A New Device for the Application of Medicinal Maggots. Dermatology, Germany, v. 204, n.4, p. 306.

GREENBERG, B (1968). Model for destruction of bacteria in the midgut of blow fly maggots. *Journal of Medical Entomology*, v. 5, n. 1, p. 31–38.

GUIMARÃES, JH (1984). Considerações gerais sobre moscas do gênero *Chrysomya* no Brasil. *Agroquímica Ciba Geigy*, n. 24, p. 8-12.

HUSAIN, ZS; FALLAT, LM (2003). Maggot Therapy for Wound Debridement in a Traumatic Foot-Degloving Injury: A Case Report. *The Journal of Foot & Ankle Surgery*, v. 42, n. 6, p.371–376.

MARCONDES, CB (2006). Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. Editora da UFSC, Florianópolis, v.48 n.6, p. 1-88.

MELLO RP (2003). Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomology and Vectors*, v. 10, n.2, p. 255-268.

MESSER FC; MCCLELLAN, RH (1935). Surgical maggots. A study of their functions in wound healing, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 20, n. 12, p. 1219-1226.

MUMCUOGLU KY; MILLER J; MUMCUOGLU M; FRIGER M; TARSHIS M (2001). Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), *Journal of Medical Entomology*, v. 38, n. 2, p. 161–166.

NORRIS, KR (1965). The bionomics of blow flies. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Canberra, Australia, v. 10, n.1, p. 47-68.

PARRA, JRP (1996). Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/Fundação de Estudos Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 137p.

PINHEIRO, MARQ (2014). Terapia larval: uso de *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) no tratamento de úlceras crônicas em pacientes diabéticos no

Hospital Universitário Onofre Lopes. Programa de pós graduação em ciências biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

PRETE, PE (1997). Growth effects of *Phafnicia sfricata* larval extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. Life science, California, v.60, n.8, p. 505-510.

QUEIROZ, MMC, MILWARD-DE-AZEVEDO EMV (1991). Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. Revista Brasileira de Zoologia, v. 8, n. 1/2/3/4, p. 75-84.

ROBINSON W (1935). Stimulation of healing in non-healing wounds by allantoin occurring in maggot secretions and of wide biological distribution. Journal of Bone and Joint Surgery, v. 17, p. 267–271.

ROBINSON W; BAKER FL (1939). The enzyme urease and occurrence of ammonia in maggot infected wounds. Journal of Parasitology, v. 25, n. 2, p. 149–155.

SANTOS, NQ (2004). A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. Texto & Contexto Enfermagem, v. 13, n. 2004, p. 64-70.

SHERMAN, RA (2002). Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. Wound Repair and Regenerations, v. 10, n. 4, p. 208-214.

SHERMAN, RA (2009). Maggot Therapy Takes Us Back to the Future of Wound Care: New and Improved Maggot Therapy for the 21st Century. Journal of Diabetes Science and Technology, v. 3, n. 2, p. 336-344.

SHERMAN, RA; HALL, MJR; THOMAS, S (2000). MEDICINAL MAGGOTS: An Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. Annual Review of Entomology v. 45, n.1, p. 55-81.

SOUZA, MS (2017). Desenvolvimento de imaturos e aspectos bionômicos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações em entomologia forense. Programa de pós graduação em ciências biológicas. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

TÉLLEZ, GA; ACERO, MA; PINEDA, LA; CASTAÑO JC (2012). Larvaterapia aplicada a heridas con poca carga de tejido necrótico y caracterización enzimática de la excreción, secreción y hemolinfa de larvas. *Biomédica*, Bogotá, v.32, n.3, p.312-320.

THOMAS, S; ANDREWS, AM; HAY, NP; BOURGOISE, S (1999). The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of Tissue Viability*, v. 9, n. 4, p.127–132.

ULLYETT, GC (1950). *Competition for Food and Allied Phenomena in Sheep-Blowfly Populations. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 234, n. 610, p. 77–174.

VALACHOVÁ, I; BOHOVÁ, J; PÁLOŠOVÁ, Z; TAKÁČ, P; KOZÁNEK, M; MAJTÁN J (2013). Expression of lucifensin in *Lucilia sericata* medicinal maggots in infected environments *Cell and tissue research*. Freiburg, v.353, n.1, p.165-171.

VALACHOVÁ, I; MAJTANB, T; TAKAC, P; MAJTAN, J (2014). Identification and characterisation of different proteases in *Lucilia sericata* medicinal maggots involved in maggot debridement therapy. *Journal of Applied Biomedicine, Bohemia*, v.12, n.3, p.171-177.

VIANNA, ACS; NUNES, MP; DIAS, RF; DEBELIAN, ACM; CORREIA, YP; SILVA-FILHO RG; LESSA, CSS; AGUIAR-COELHO, VM (2018). Esterilização de ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) para uso em bioterapia. 17ª Jornada de Iniciação Científica, UNIRIO-RJ, In: 17ª Jornada de Iniciação Científica, UNIRIO-RJ, 2018, Rio de Janeiro. Anais da 17ª Jornada de Iniciação Científica, UNIRIO-RJ.

VON ZUBEN, CJ; STANGENHAUS, G; GODOY, WAC (2000). Competição larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): efeitos de diferentes níveis de agregação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio Claro, v. 60, n.2, p. 195-203.

Wang, S; Wang, J; LV, D; Diao, Y; Zhang, Z (2010). *Clinical research on the bio-debridement effect of maggot therapy for treatment of chronically infected lesions. Orthopaedic Surgery*, v. 2, n. 3, p. 201–206.

WHITAKER, IS; TWINE, C; WHITAKER, MJ; WELCK, M; BROWN, CS; SHANDALL, A (2007). Larval therapy from antiquity to the present day: mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgraduate Medical Journal*, v. 83, n. 980, p. 409–413.

YAN L; CHU J; LI M; WANG X; ZONG J; ZHANG X; SONG M; WANG S (2018). Pharmacological Properties of the Medical Maggot: A Novel Therapy Overview. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2018, p.1-11.

YATES, I; FOX, Ma; CREWDSON, M.; WOODYER, AB (2003). Larvae – a key member of the multidisciplinary foot team? *The Diabetic Foot Journal*, Londres, v.6, n.4, p.166-171.