

UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL - PPG BIO



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Comportamento Biológico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *C. putoria* (Wiedemann, 1818) e *C. albiceps* (Wiedemann, 1819) (Insecta: Diptera: Calliphoridae) para Utilização de Bioterapia no Brasil

DANIELE LOURINHO DALLAVECCHIA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (PPGBIO)
BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL



Comportamento Biológico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *C. putoria* (Wiedemann, 1818) e *C. albiceps* (Wiedemann, 1819) (Insecta: Diptera: Calliphoridae) para Utilização de Bioterapia no Brasil

DANIELE LOURINHO DALLAVECCHIA

Sob a Orientação da Professora

Valéria Magalhães de Aguiar

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Biológicas, no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas,
Biodiversidade Neotropical

Rio de Janeiro, RJ

Março de 2013

D145 Dallavecchia, Daniele Lourinho.
Comportamento biológico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974),
C. putoria (Wiedemann, 1818) e *C. albiceps* (Wiedemann, 1819) (Insecta:
Diptera: Calliphoridae) para utilização de bioterapia no Brasil / Daniele
Lourinho Dallavecchia, 2013.
xi, 62f. ; 30 cm

Orientador: Valéria Magalhães de Aguiar.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do
Estado Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

1. Díptero. 2. Bioterapia. 3. Biodiversidade. 4. Desbridamento. 5. Esteri-
lização. 6. Teste de esterilidade. I. Aguiar, Valéria Magalhães de. II. Uni-
versidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas
e da Saúde. Curso de Mestrado em Ciências Biológicas. III. Título.

CDD - 595.77

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (PPGBIO)
BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL

DANIELE LOURINHO DALLAVECCHIA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Biodiversidade Neotropical

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/03/2013

Prof^a Dr^a Valéria Magalhães Aguiar (UNIRIO)
(Orientador)

Prof^a Dr^a Cláudia Soares Santos Lessa (UNIRIO)

Prof. Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva (UNIRIO)

Suplentes:

Prof^a Dr^a Elisabete Fernandes Albuquerque Palermo (UNIRIO)

Prof^a Dr^a Rosa Maria Tavares Haido (UNIRIO)

Ao Jorge e a minha mãe, com amor!

A Rodolfo Eloi Silva, in memoriam

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus!

Agradeço a minha querida Professora Valéria por ter me recebido no Laboratório de Estudos de Dípteros – LED, como estagiária em biologia, despida de qualquer preconceito por eu ser de outra área, por ter acreditado em mim, ter me ensinado, incentivado, apoiado e por toda a compreensão que teve para comigo. Sem o seu amparo, sabedoria e força, nada do que fiz poderia ter sido realizado. Obrigada por me fazer sentir uma pesquisadora!

Agradeço ao Professor Renato por ter aberto as portas da Microbiologia e por ter possibilitado, tanto com o seu conhecimento como com o seu apoio incondicional, entusiasmo e inteligência a realização desta pesquisa. A sua dedicação foi fundamental para a realização da mesma.

Agradeço a todos os professores da Parasitologia e Microbiologia que, direta ou indiretamente possibilitaram a realização deste trabalho, em especial, Professora Rosa Haido, Professora Cleo, Professora Cláudia e tantos outros que contribuíram de algum modo, seja com conhecimento ou com compartilhamento de material. Meu muito obrigada!

Agradeço a toda a equipe do LED (principalmente ao pessoal naftalina) pelos momentos de união, conversas sem fim, troca de informações e, em muitos aspectos, até proteção. Eu adoro os biólogos!

Agradeço a todos os docentes presentes nesta banca e por sua contribuição a minha pesquisa.

Agradeço a toda a minha família Luso/Brasileira pelo apoio e, principalmente a minha mãe e ao meu marido, por compreenderem a importância desta pesquisa em minha vida.

A UNIRIO, FINEP, CNPq pelos fomentos recebidos e FAPERJ pela bolsa de mestrado recebida.

RESUMO

DALLAVECCHIA, Daniele Lourinho. **Comportamento Biológico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *C. putoria* (Wiedemann, 1818) e *C. albiceps* (Wiedemann, 1819) (Insecta: Diptera: Calliphoridae) para Utilização de Bioterapia no Brasil.** 2013. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2013.

A dissertação foi dividida em capítulos. O primeiro avaliou o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) em moela de frango (controle: carne bovina). Foram quatro repetições (100 g dieta/ 40 larvas 1º instar/2ª geração) por tratamento, cada recipiente de 200 g foi acomodado em outro de 500 g. Registraram-se a massa corporal das larvas de 3º instar e essas foram armazenadas em tubos de ensaio. A média das temperaturas foi de 26°C Mín/27° Máx. e a UR do Ar 65% Mín./80% Máx. Não foi observada diferença significativa pela análise de Variância (5% de significância) para a massa corporal de larvas de 3º instar (moela: 73,3mg / carne: 72,2mg). A duração média do estágio larval (3,2 dias) foi significativamente maior para os insetos criados em carne. Os estágios de pré-pupa (1,0 ;1,1), pupa (3,8; 3,7) e total (6,8; 6,8), respectivamente para moela e carne, não apresentaram diferença significativa. A longevidade foi maior na dieta testada (60 dias). Não houve diferença significativa quanto as viabilidades de: larva (92% , 97%); pupa (100%, 99%); e adulto (69% e 84%,) para carne e moela. A moela se mostrou satisfatória. O segundo capítulo avaliou o glutaraldeído 2% como esterilizante para a superfície de ovos de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann). Foram realizados três repetições (0,200g /40 neolarvas 1º instar/ 3ª geração) dissociadas com água destilada estéril e as suspensões obtidas, misturadas com glutaraldeído 2%. Após 15 minutos de contato, as suspensões foram filtradas em papel filtro e o resíduo obtido após o filtrado, inativado pela rinsagem com Caldo Soja Trypticaseína (TSB). As massas de ovos tratadas foram transferidas para a superfície de placas de Petri com Agar Soja Tripcaseína (TSA). Aproximadamente 10% da massa esterilizada foi transferida para tubos de ensaio com TSB e Caldo Tioglicolato Fluído (FTM). Esses foram incubados, respectivamente, a 22,5°C e 35,0°C por 14 dias para verificação da esterilidade dos ovos. As placas contendo o restante dos ovos (90%) foram vedadas e mantidas em câmara climatizada 30°C/dia, 28°C/noite, 60±10% UR até 72h para avaliar a viabilidade e sobrevivência dos insetos. O agente esterilizante Glutaraldeído a 2% mostrou-se eficaz na esterilização de volumes maiores de massa de ovos. O terceiro capítulo avaliou o glutaraldeído 2% como

esterilizante para os ovos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann), assim como a viabilidade do inseto após tratamento químico. A metodologia de esterilização e o teste de esterilidade seguiram o mesmo procedimento apresentado no segundo capítulo. Foram realizados quatro tratamentos: T1(12h), T2(24h), T3(48h) e T4(72h) e o controle. Para avaliar a viabilidade, após esterilização, foram realizadas três repetições em dieta moela de frango (100 g / 40 larvas 1º instar/9ª geração) até o abandono das larvas. Passados cada período de tempo estabelecido, constatou-se que a viabilidade larval e total foi significativamente inferior no T4 (69% e 46,6%), havendo diferença significativa em relação aos outros tratamentos. Em T1, T2 e T3 produziram-se viabilidades larval, pupal e total semelhantes ao controle (larvas sem esterilização). O quarto capítulo avaliou o comportamento biológico de larvas de *C. putoria*, após processo químico de esterilização, e físico de refrigeração à baixas temperaturas em refrigerador. Após a esterilização, papéis filtro com massas de ovos esterilizadas foram transferidas para placas de Petri contendo em sua superfície gaze umidificada com soro fisiológico estéril (lacradas e identificadas), estas foram alocadas em refrigerador a uma temperatura média de 8°C Máx./ 3,5°C Mín., pelos períodos de tempo de: 12, 24, 48 e 72 h. Passado cada período de tempo estipulado, as placas foram retiradas do refrigerador e suas larvas transferidas para dieta (3 repetições 0,200g/ 40 neolarvas 1º instar/ 9ª geração). Avaliando-se as viabilidades larval, pupal e total, estas foram semelhantes ao controle (larvas sem esterilização). No T4, constatou-se que as viabilidades larval e total foram significativamente inferiores aos demais tratamentos. Após o desenvolvimento pós-embrionário, a massa corporal das larvas foi pesada, em lotes de cinco, sendo transferidas para tubos de ensaio contendo 2g de maravalha até a emergência do inseto. O controle consistiu em utilizar 40 neolarvas não expostas a esterilização e nem à baixa temperatura. O experimento foi conduzido em câmara climatizada regulada a 30°C/dia e 28°C/noite, com 60±10% de umidade relativa do ar e 12 horas de fotofase (início às 6 horas), para observação da eclosão e viabilidade das larvas nos parâmetros biológicos: massa corporal, desenvolvimento larval, pupal, total e razão sexual.

Palavras-chave: baixa temperatura, dieta, esterilização, teste de esterilidade

ABSTRACT

DALLAVECCHIA, Daniele Lourinho. Behavior Biological *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794), *C. putoria* (Wiedemann, 1818) and *C. albiceps* (Wiedemann, 1819) (Insecta: Diptera: Calliphoridae) to Utilization of Biotherapy in Brazil. 2013. 73p. Thesis (MA in Biology). Biosciences Institute, Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2013.

The dissertation is divided into chapters. The first assessed the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) in chicken gizzard (control: beef). There were four replicates (100 g diet / 40 first instar larvae / 2nd generation) per treatment, each container of 200 g was accommodated in another 500 g. Were recorded body mass of the larvae of third instar, and these were stored in tubes. The average temperature was 26 ° C and Mín/27 ° Max., RH Air Max 65% Mín./80%. No significant difference was observed by analysis of Variance (5% significance) for body mass of larvae 3rd instar (gizzard: 73.3 mg / meat: 72.2 mg). The average duration of the larval stage (3.2 days) was significantly higher for insects reared on meat. The pre-pupal stages (1.0, 1.1), pupa (3.8, 3.7) and total (6.8, 6.8), respectively for meat and gizzards, showed no significant difference. The longevity was greater in diet tested (60 days.) There was no significant difference in the viability of: larva (92%, 97%), pupa (100%, 99%) and adult (69% and 84%) for meat and gizzard. The gizzard showed satisfactory. The second chapter evaluated as 2% glutaraldehyde sterilant to the surface of eggs *Chrysomya albiceps* (Wiedemann). Were performed three repetitions (0.200 g / 40 neolarvas instar 1st / 3rd generation) dissociated with sterile distilled water and the suspensions obtained, mixed with 2% glutaraldehyde. After 15 minutes of contact, the suspensions were filtered through filter paper and the residue obtained after the filtrate, inactivated by rinsing with Tryptic Soy Broth (TSB). The treated egg masses were transferred to the surface of Petri dishes with Tripcaseína Soy Agar (TSA). Approximately 10% of the mass was transferred to sterile test tubes with TSB and Broth Fluid Thioglycollate (FTM). These were incubated, respectively, to 22.5 ° C and 35.0 ° C for 14 days to check the sterility of the eggs. The plates containing the remaining eggs (90%) were sealed and kept in an incubator 30 ° C / day, 28 ° C / night, 60 +10% R.H AIR up to 72 hours to assess the viability and survival of the insects. The sterilizing agent glutaraldehyde and 2% was effective in sterilizing large volumes of egg mass. The third chapter evaluated as 2% glutaraldehyde sterilant for eggs *Chrysomya putoria* (Wiedemann) and insect survival after chemical

treatment. The method of sterilization and sterility test followed the same procedure presented in the second chapter. Were conducted four treatments: T1 (12h), T2 (24), T3 (48h) and T4 (72h) and more control. To evaluate the feasibility, after sterilization, three repetitions were performed on a diet of chicken gizzards (100 g / 40 first instar larvae / 9th generation) until the abandonment of the larvae. After each set period of time, it was found that larval viability and total was significantly lower in T4 (69% and 46.6%.), Significant difference compared to other treatments. In T1, T2 and T3 were produced larval, pupal and total similar to the control (larvae without sterilization). The fourth chapter assessed the biological behavior of larvae of *C. putoria* after chemical sterilization process, and physical cooling to low temperatures in the refrigerator. After sterilization, paper filter with egg masses sterilized were transferred to Petri dishes containing on its surface gauze moistened with sterile saline (sealed and labeled), they were placed in a refrigerator at an average temperature of 8 ° C max / 3.5 ° C Min, for time periods: 12, 24, 48 and 72 h. Spent each stipulated time period, the plates were removed from the refrigerator and their larvae transferred to diet (3 repetitions 0.200 g / 40 neolarvas 1st íntar / 9th generation). Evaluating larval, pupal and total, these were similar to the control (larvae without sterilization). In T4, it was found that larval and total were significantly lower than other treatments. After the post-embryonic development, the body mass of larvae was weighed in batches of five, being transferred to test tubes containing 2g of shavings until the emergence of the insect. The control consisted of using 40 neolarvas unexposed or sterilization and low temperature. The experiment was conducted in a climate chamber at 30 ° C / day and 28 ° C / night, with 60 ± 10% relative humidity and 12 h photoperiod (beginning at 6 o'clock), to observe the emergence and viability of larvae in biological parameters : body mass, larval, pupal, and total sex ratio.

Keywords: low temperature, diet, sterilization, sterility test

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE DIETA PROTÉICA E INFLUÊNCIA NA LONGEVIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE <i>Chrysomya megacephala</i> (FABRICIUS, 1794), (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)	4
CAPÍTULO II - ESTERILIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS OVOS E TESTE DE ESTERILIDADE DE <i>Chrysomya albiceps</i> (WIEDEMANN) (INSECTA: DIPTERA: CALLIPHORIDAE) PARA UTILIZAÇÃO EM BIOTERAPIA NO BRASIL	22
CAPÍTULO III - ESTERILIZAÇÃO DE OVOS DE <i>Chrysomya putoria</i> (WIEDEMANN, 1818) (INSECTA: DIPTERA: CALLIPHORIDAE) PARA UTILIZAÇÃO EM BIOTERAPIA	31
CAPÍTULO IV - COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE <i>Chrysomya putoria</i> (WIEDEMANN, 1818): APÓS ESTERILIZAÇÃO, TESTE DE ESTERILIDADE E REFRIGERAÇÃO: UMA LOGÍSTICA PARA BIOTERAPIA NO BRASIL	48
2 CONCLUSÕES GERAIS	60
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde o Velho Mundo relatam-se infestações de moscas sobre os homens. Na bíblia foram citadas no antigo testamento em Êxodo (8: 20-31), onde o Senhor pede a Moisés para dizer ao Faraó: “deixa partir o meu povo para me prestar culto. Se recusares, mandarei moscas sobre tua pessoa, tua gente, teu povo, tuas casas...”. Esse estigma ainda hoje persiste, fazendo com que as moscas sejam vistas como seres repugnantes e nocivos pela maioria das pessoas. No entanto, entre os Bamilekes e os Bamuns (Nijinji) - povos situados em Camarões, África - esses pequenos insetos eram vistos como símbolo da solidariedade e entre os gregos, a mosca era considerada um animal sagrado, ao qual referiam-se até certos nomes poderosos como os de Zeus ou Apolo, pois acreditava-se que ela poderia evocar o turbilhão da vida olímpica ou a onipresença dos deuses (Chevalier,1906).

Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794), *C. albiceps* (Wiedemann 1819) e *C. putoria* (Wiedemann, 1818) (Insecta:Diptera: Calliphoridae) são espécies de moscas varejeiras originárias da África, Mediterrâneo e Oriente Médio (Gagné, 1981), foram introduzidas no Brasil na década de 1970 quando, nos anos de 1975 e 1976, embarcações que transportavam refugiados de Angola e de Moçambique, animais domésticos e diferentes tipos de alimentos, aportaram nas costas do Sudeste do Brasil. A partir daí, disseminaram-se por diferentes regiões do país (Guimarães et al., 1979), encontrando-se, atualmente, em diversos biótopos: rural, urbano e florestal, prevalecendo sobre as outras espécies de califorídeos em algumas regiões (Guimarães et al., 1978; Souza & Linhares 1997; Carraro & Milward-De-Azevedo, 1999; Marinho et al., 2006).

Devido ao seu apurado olfato, dípteros da família Calliphoridae são atraídos por matéria orgânica em decomposição, sendo encontrados em lixões, cadáveres, lixos hospitalares, entre outros ambientes; utilizam-se desses substratos como meio proteico ou para oviposição, por isso, transportam vários microrganismos através de suas patas, atuando, desta forma, como vetores mecânicos de agentes patogênicos, entre eles: enterovírus, bactérias entéricas, esporos de fungos, cistos de protozoários de ovos e larvas de helmintos (Greenberg 1973; Furlanetto et al., 1984; Campos & Hársi 1984; Queiroz et al., 1999).

Sabe-se que a mosca varejeira tem um papel fundamental na natureza, sendo decompositora de matéria orgânica, alimentando-se de resíduos e/ou carcaças em estado de putrefação. Algumas espécies, alimentam-se somente de carne em estado de putrefação e por terem hábito alimentar necrófago, convivem com numerosas bactérias, deste modo, acredita-se que desenvolveram a capacidade de controlá-las. Essa característica específica,

vem sendo aproveitada de forma benéfica por diversos cientistas ao redor do mundo e é conhecida como Bioterapia.

As larvas secretam substâncias com ação antimicrobiana, principalmente contra *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (Pavillard & Wright, 1957). Por se alimentarem de tecidos de animais em decomposição, conseguem destruir material desvitalizado e, por uma série de mecanismos, auxiliam na cura de lesões cutâneas (Muncuoglu et al., 2007). Larvas são utilizadas para limpeza de feridas infectadas, como, por exemplo, no tratamento de feridas de pele pós-cirúrgicas decorrentes de diabetes e necrosadas, bem como, para úlceras, lesões traumáticas, gangrenas intratáveis e alguns tumores de pacientes com diabetes e até alguns casos de câncer visando à remoção de tecido necrosado (Sanchez et al., 2004)

As larvas de moscas necrobiontófagas atuam na ferida à partir da digestão de tecido morto, restos celulares, exsudado ou feridas necróticas. A digestão extracorporal é feita devido a liberação de enzimas proteolíticas (colagenases, tripsina e quimiotripsina), mecanismo através do qual as feridas são limpas. O desbridamento é auxiliado pela ingestão do tecido liquefeito e também devido ao rastreamento das larvas sobre o leito da ferida, além da maceração feita pelos ganchos orais (Sherman et al., 2000). Há estímulo a migração de fibroblastos auxiliando na remodelação da matriz-extracelular, assim como o aumento da atividade angiogênica, atividade anti-microbiana, impulso à uma resposta anti-inflamatória e inibidora pro-inflamatória, quebra do biofilme no leito da ferida e alteração do pH da ferida, diminuindo assim, o tempo de cicatrização (Prete, 1997; Muncuoglu et al., 2001; Horobin et al., 2006; Cazander et al., 2009, 2010; Zhang et al., 2010, Van Der Plas et al., 2010).

Nesta dissertação foram realizados quatro estudos envolvendo três espécies de dípteros da fauna neotropical, permitindo expandir o conhecimento sobre o comportamento biológico de larvas, pupas e do adulto desses insetos. Os resultados encontrados nessa dissertação poderão vir a auxiliar, tanto entomólogos que estudam esses dípteros em suas diversas vertentes, como clientes necessitados de tratamentos alternativos ao desbridamento cirúrgico, possuidores de patologias adjacentes ou não, com a utilização da bioterapia; alvo principal, desta pesquisa. O estudo do ciclo biológico destes dípteros, também poderá contribuir em outras áreas, por exemplo: entomologia forense, miíases, utilização de pupas como reservatório de microhimenópteros, polinizadores, entre outras áreas da entomologia que necessitam do conhecimento acerca destes dípteros. No primeiro capítulo foi testada moela de frango como dieta proteica alternativa para *C. megacephala*, buscando diminuir o custo na

criação e manutenção destes dípteros em laboratório, assim como a otimização do tempo de preparo e alimentação destes insetos. No segundo capítulo avaliou-se o Glutaraldeído 2% esterilizando a superfície dos ovos de *C. albiceps*, priorizando a efetividade do Glutaraldeído como agente esterilizante e sua aprovação no teste de qualidade com testes de esterilidade indicados pela farmacopeia. Já no terceiro capítulo buscou-se, esterilizar, fazer o teste de esterilidade e analisar a viabilidade de larvas, pupas e adultos de *C. putoria*, após processo de químico de esterilização. No quarto capítulo buscou-se criar uma metodologia logística para *C. putoria*, de modo que essa espécie pudesse passar por processos químico e físico, mantendo-se viável por período necessário até chegar ao cliente usuário desta terapia. *C. putoria* foi submetida a esterilização, teste de esterilidade, períodos de inanição de 12, 24, 48 e 72 horas (quatro tratamentos) em baixas temperaturas (entre 3,5°C e 6,6°C) e após cada período de tempos pré-determinado, larvas provenientes de cada tratamento foram transferidas para dieta moela de frango, em triplicata (50g dieta/ 40 larvas 1º íntar /9ª geração), onde observou-se viabilidade, desenvolvimento pós-embriônico até a emergência, razão sexual e tempo máximo de armazenamento em refrigerador sem alimentação.

CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO NUTRICIONAL DE DIETA PROTÉICA E INFLUÊNCIA NA LONGEVIDADE PARA O DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794), (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

Avaliação Nutricional de Dieta Protéica e Influência na Longevidade para o Desenvolvimento de Imaturos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius), (Diptera: Calliphoridae)

RESUMO

Moela de frango foi testada como dieta alternativa à carne bovina para criação de *Chrysomya megacephala*, visando diminuir custos e otimizar o tempo de preparo para manutenção da colônia. Quarenta neolarvas foram transferidas para 100 gramas de dieta (0,4g/larva): moela e carne (controle), em triplicata. A massa corporal foi registrada em lotes de cinco. Na emergência, formaram-se três repetições de 10 casais. O desenvolvimento pós-embriônico foi avaliado pelo teste Tukey 5%, na longevidade ajustou-se regressão Weibull. Não foi observado diferença significativa para a massa corporal de larvas maduras. A duração média, em dias, do estágio larval foi maior para a carne. Os estágios de pré-pupa, pupa e neolarva a adulto não apresentaram diferença significativa nas dietas. Houve crescente mortalidade a partir do 22º dia após a emergência em ambas as dietas. A longevidade foi maior na moela, que mostrou-se tão eficiente quanto a carne nos parâmetros biológico testados.

PALAVRAS-CHAVE: biodiversidade, criação, dípteros, ecologia comportamental, mosca varejeira.

INTRODUÇÃO

O interesse pela criação de dípteros em laboratório vem aumentando devido a aplicabilidade desse grupo específico de insetos no controle biológico de pragas (Cristino et al., 2010), terapia com larvas medicinais (Sherman, 2009), entomologia forense (Estrada et al., 2009), entre outras áreas da ciência. Para a implementação do controle biológico, necessita-se de um grande estoque de pupas desses califorídeos para serem utilizados como hospedeiros de microhimenópteros (Barbosa et al., 2004, Mello et al., 2010). A terapia larval demanda grande quantidade de massa de ovos para serem utilizada durante o processo de esterilização (Dallavecchia et al., 2010), onde, após o processamento, serão enviadas para consultórios ou centros médicos para imediata utilização no desbridamento de feridas necróticas com diferentes etiologias (Sherman et al., 2000, Cambal et al., 2006, Aaron et al., 2009, Dallavecchia et al., 2011). A entomologia forense requer estudos comparativos acerca da biologia dos dípteros necrófagos em laboratório para que auxiliem em investigações

criminais, como também na elucidação do intervalo pós-morte de cadáveres (Mello & Aguiar-Coelho, 2009).

Existem diversas espécies de moscas varejeiras da família Calliphoridae que possuem comportamento sinantrópico, isto é, adaptam-se bem às condições adversas criadas pelo homem. Com o crescimento desordenado das habitações e alteração do ecossistema local, observa-se a formação de novos nichos ecológicos onde determinados animais conseguem adaptar-se e coexistir com os produtos resultantes desse processo de urbanização, da baixa condição de higiene ambiental, tais como excretas humanas e de animais domésticos, resquícios urbanos e industriais, lixões, aterros sanitários, fossas abertas e detritos de feiras livres; representando um sério risco para a saúde (Parallupi et al., 1996, Oliveira et al., 2002) gerando, desse modo, elevados danos econômicos e de saúde pública.

Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794) é uma espécie de mosca varejeira, originária da África, Mediterrâneo e Oriente Médio (Gagné, 1981). No Brasil, foi introduzida na década de 1970 e, atualmente, encontra-se amplamente distribuída por todo o país, desde áreas urbanas, onde são mais comuns (Marinho et al., 2003), rurais (Singh & Moore, 1985) e até florestais (Ferraz et al., 2010).

Segundo D'Almeida & Lima (1994) a dieta protéica é fundamental para os califorídeos, popularmente conhecidos como moscas varejeiras, não só devido a sua alimentação, mas também para a maturação dos folículos ovarianos, que ocorrem na fase 10 do seu desenvolvimento.

Como dieta protéica para a criação ininterrupta de dípteros da família Calliphoridae em laboratório, muitos pesquisadores utilizam a carne bovina (Gabre et al., 2005). No entanto, essa dieta onera os custos da criação, além de despender do tempo dos pesquisadores no seu processamento, onde se inclui, corte em formato de cubos (2cm³) para ser utilizada. Outros substratos foram testados visando a manutenção de *C. megacephala*, como carne eqüina, peixe (sardinha), fígado bovino, fígado de ave, carne de frango, ração pastosa para cães, entre outras (Queiroz & Milward-de-Azevedo, 1991, Ribeiro & Milward-de-Azevedo, 1997, Barbosa et al., 2004, Silva et al., 2008, Sousa, 2010).

Diante do exposto, a premência de se estabelecer um insetário em laboratório para criação de dípteros, bem como conhecer o comportamento do inseto, incluindo uma dieta adequada a um baixo custo operacional que supra as necessidades nutricionais; físicas como a consistência, físico-químicas como pH e pressão osmótica e biológicas, resultando em

indivíduos normais, com capacidade reprodutiva e longevidade adequadas ao estabelecimento da colônia estoque com elevado controle de qualidade é imprescindível.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a dieta moela de frango para criação de *C. megacephala*, analisando aspectos biológicos como massa corporal de larvas maduras, duração do estágio de desenvolvimento pós-embrionário (larva, pré-pupa, pupa e neolarvas ao adulto), abandono de larvas da dieta, ritmo de emergência e viabilidades dos estágios de larva, pupa, adultos, taxa de normalidade, razão sexual e longevidade dos adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

A colônia de *C. megacephala* foi formada por espécimes coletados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro, RioZoo. Os insetos adultos foram capturados com o auxílio de armadilhas semelhantes às descritas por Mello et al. (2007). Os insetos coletados foram encaminhados para o Laboratório de Estudo de Dípteros (LED) no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

No laboratório, os insetos foram submetidos à temperatura de -10°C por cerca de três minutos para que sua atividade metabólica diminuísse, permitindo assim, sua identificação taxonômica. Os indivíduos adultos foram transferidos para gaiolas transparentes de polietileno (40x30x20cm) com abertura na parte superior e frontal coberta por tecido de algodão apara arejamento dos insetos. Estes foram alimentados diariamente com 20 mL de solução de mel a 50% e 20 mL de água. Como proteína para alimentação e substrato para oviposição, foram oferecidos 50 gramas de carne bovina e moela de frango, respectivamente para os insetos alocados em duas gaiolas (Figura 1).



Figura 1: a) Armadilha de PVC para captura de dípteros; b) Microscópio estereoscópico para identificação taxonômica; c) Gaiolas de criação dos insetos adultos; d) Mel para alimentação (solução de mel a 50%) e água; e) Díptero em 50g de dieta para alimentação / oviposição; f) Recipientes de criação de dípteros (esquerda 1litro, contendo maravalha esterilizada), direita 500g, contendo 400g de dieta para larvas; g) Recipiente lacrado e identificado; h) Capela de Criação de Dípteros para acomodar recipiente de criação até abandono das larvas da dieta.

Na etapa experimental, a temperatura e a umidade relativa do ar foram registradas em termohigrógrafo, onde a média registrada durante o período experimental foi de 26°C Mín./ 27°C Máx. e a Umidade Relativa do Ar 65% Mín./ 80% Máx. (Figura 2).



FIGURA 2) Termohigrógrafo para registro da temperatura e Umidade relativa do Ar inserido dentro da capela de criação na primeira etapa experimental.

Quarenta neolarvas procedentes de fêmeas da segunda geração da colônia mantida no laboratório foram transferidas, mecanicamente com o auxílio de um pincel nº 01, para 100 gramas de dieta. O experimento foi realizado em triplicata para cada tratamento: carne bovina (controle) e moela de frango. A carne bovina foi cortada em frações de aproximadamente 2 cm³ e a moela foi utilizada em sua forma íntegra. Ambas foram utilizadas frescas, sem sujeição ao congelamento. Em cada tratamento, a respectiva dieta foi acondicionada em potes plásticos de polietileno (200 gramas) e estes foram inseridos em recipientes maiores (500 gramas) contendo 5g de maravalha esterilizada ao redor de sua circunferência interna e a seguir, estes recipientes foram devidamente identificados e vedados com tecido de náilon e elástico.

O registro da massa corporal das larvas que abandonaram a dieta foi realizado em lote de cinco larvas em balança semi-analítica. Os espécimes foram transferidos para tubos de ensaio (20 x 200 mm) contendo 2g de maravalha esterilizada para a pupariação. Os tubos receberam identificação de acordo com cada repetição de origem. As observações foram diárias e realizadas sempre no mesmo horário, 10 horas da manhã até a emergência dos adultos.

Após a emergência dos adultos, formaram-se três repetições com 10 casais, isolados em gaiolas confeccionadas com garrafas de polietileno com volume de um litro e meio, contendo telas de náilon nas laterais para o arejamento. Executou-se o mesmo procedimento para a dieta controle. Foi oferecido, aos adultos, diariamente, 5 mL de solução de mel a 50% e 5 mL de água, em recipientes (15X30mm) inseridos no interior das gaiolas. Não houve desvio da razão sexual em ambas as dietas, onde na dieta moela obteve-se 0,51 e na carne 0,55. As observações foram realizadas diariamente. A razão sexual (RS) foi obtida da seguinte forma: $RS = F / M+F$, onde F é o número de fêmeas e M é o número de machos (Figura 3).



FIGURA 3:a) *Chrysomya megacephala* de 2ª geração da colônia estoque; b) Massa de ovos utilizadas no experimento; c) Recipiente com 100g de dieta moela de frango que recebeu larvas de 1º ínstar inserido em recipiente de 500g com maravalha; d) Recipientes lacrados e identificados; e) Dieta transferida para capela de criação até abandono das larvas da dieta; f) Balança semi-analítica para pesar lotes de cinco larvas em 3º ínstar; g) Tubos de ensaio com maravalha estéril para acomodar o lote de cinco larvas; h) Gaiolas de garrafa pet para estudo de longevidade de 10 casais de dípteros.

Para a análise bruta dos dados e elaboração dos gráficos utilizou-se o programa Microsoft Excel. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias

foram comparadas através do pós-teste Tukey, ao nível de 5% de significância utilizando o “GraphPad Software”, versão 2.05a InStat 2. Para a análise da longevidade, foram utilizados o estimador de “Kaplan-Meier” e a regressão Weibull. Para comparar diferenças entre as curvas de longevidade, foi utilizado o teste logrank, através do programa estatístico R.

RESULTADOS

Não foi observada diferença significativa para a massa corporal de larvas maduras de *C. megacephala* criadas em dieta moela de frango e carne bovina ($p=0,578$). Já a duração média do desenvolvimento do estágio de larva ($p=0,0009$) foi significativamente maior para os insetos criados na dieta carne. Nos estágios de pré-pupa, pupa ($p=0,1314$) e total ($p=0,5996$) não houve diferença significativa entre as dietas (Tabela 1).

Tabela I. Massa corporal (mg) e duração em dias do estágio de desenvolvimento pós-embrionário de larvas maduras de *Chrysomya megacephala* oriundas de dieta moela de frango e carne bovina (T. Média: 26°C Mín. / 27° Máx., UR Média: 65% Mín./ 80% Máx).

DIETA	Massa corporal e duração dos estágios em dias				
	Massa (mg) X ± ds	Larva X ± ds	Pré-pupa X ± ds	Pupa X ± ds	Total X ± ds
Moela	73,3a ± 8,0	3,0a ± 0,08	1,0a ± 0,00	3,8a ± 0,07	6,8a ± 0,07
Carne	72,2a ± 4,5	3,2b ± 0,01	1,1a ± 0,07	3,7a ± 0,14	6,8a ± 0,05

X = Média, ds = Desvio padrão,

Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste T ao nível de 5%

As viabilidades dos estágios de larva (97%), pupa (99%) e de adultos (84%) criados na dieta carne, não diferiram significativa ($p= 0,0251$) em relação a dieta moela, onde as larvas obtiveram viabilidades de 97%, pupa 99% e adulto 84% com valor de $p= 0,0362$. O ritmo de abandono de larvas maduras de *C. megacephala* foi semelhante entre os dois substratos, com início e pico de abandono da dieta no segundo dia de experimento. No terceiro dia, houve abandono de 1,29% (moela) e 12,00% (carne), estendendo-se até o quarto dia para a dieta controle, onde 0,67% de larvas abandonaram a dieta. Quanto ao pico de emergência, foi notada semelhança entre a dieta moela e carne: ambas com o início de

emergência dos dípteros no sexto dia, tendo seu pico no sétimo dia e se estendendo até o oitavo dia na dieta carne (Figuras 4 e 5).

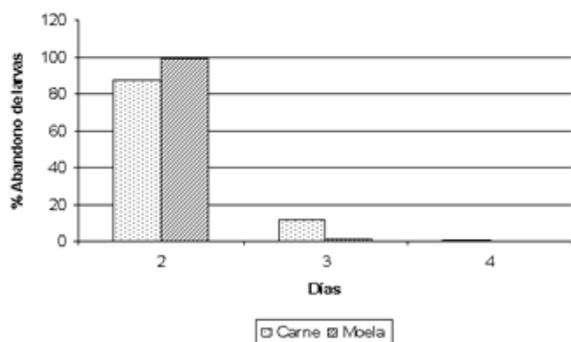


Figura 4. Ritmo de abandono de larvas maduras de *Chrysomya megacephala*, nas dietas carne bovina e moela de frango. (T. Média: 26°C Mín. / 27° Máx., UR Média: 65% Mín./ 80% Máx).

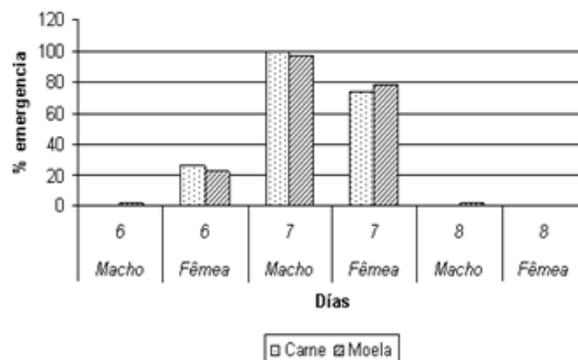


Figura.5 . Ritmo de emergência de machos e fêmeas de *C. megacephala* criados nas dietas carne e moela de frango. (T. Média: 26°C Mín. / 27° Máx., UR Média: 65% Mín./ 80% Máx).

A Figura 6 apresenta a curva de longevidade estimada pelo método não-paramétrico Kaplan-Meier e pela regressão Weibull. Nos dois casos as dietas carne e moela foram consideradas co-variáveis.

Segundo o estimador de Kaplan-Meier o tempo mediano de longevidade para as moscas na dieta carne foi de 37 dias enquanto que para a dieta moela 39 dias. Observou-se que em 55 dias todas as moscas na dieta carne estavam mortas, já para a dieta moela foi de 60 dias. Com o objetivo de comparar se existe diferença entre as curvas de longevidade foi utilizado o teste logrank. Considerando um nível de confiança de 95% obtém-se um p-valor 0,63, desta forma, conclui-se que não existe diferença entre as curvas de longevidade para a dieta carne e moela.

Através da regressão Weibull, com p-valor de 0,59 conclui-se que não há diferença entre as dietas. As estimativas de máxima verossimilhança para os parâmetros de forma e escala foram 3,34 e 39,13, respectivamente. De acordo com Reis & Haddad (1997) a curva de sobrevivência foi do tipo I, ou seja, a taxa de mortalidade aumenta com o tempo já que o parâmetro de forma é maior que 1. O tempo médio estimado pela regressão Weibull é de acordo com Colosimo & Giolo (2006) uma forma de verificar a adequabilidade do modelo é através do gráfico construído a partir das estimativas obtidas pelo método de Kaplan-Meier

versus as estimativas obtidas pela modelo. O ajuste sendo adequado é esperado que a curva acompanhe a reta $x=y$.

A Figura 7 apresenta a longevidade estimada por Kaplan-Meier versus as estimativas obtidas pela regressão Weibull. Como a curva acompanha a reta, o modelo Weibull ajusta-se bem aos dados em estudo.

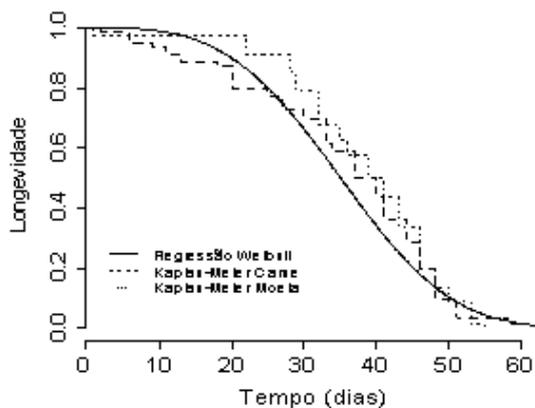


Figura. 6 - Curvas de longevidade de *Chrysomya megacephala* estimadas pelo por Kaplan-Meier e ajuste da regressão Weibull (Tmédia: 26°C M_{ín} / 27°C M_{áx}., UR média: 65% M_{ín} / 80% M_{áx}).

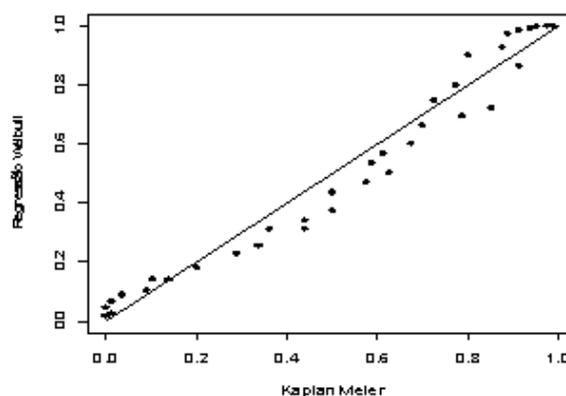


Figura 7 - Longevidade de *Chrysomya megacephala* estimada por Kaplan-Meier versus regressão Weibull (Tmédia: 26°C M_{ín} / 27°C M_{áx}., UR média: 65% M_{ín} / 80% M_{áx}).

Na tentativa de estudar o sexo das moscas dentro da dieta carne são apresentadas na Figura 8 as estimativas de Kaplan-Meier e a regressão Weibull para os machos e fêmeas que receberam esta dieta. Através do teste logrank e com p-valor de 0,58 conclui-se que não existe diferença entre os sexos o que também é verificado pela regressão Weibull com p-valor 0,77.

Os valores das estimativas obtidas para o ajuste da regressão Weibull são 2,9 para o parâmetro de forma e 38,5 para o parâmetro de escala, o que mostra que a curva de sobrevivência é do tipo 1 para os machos na dieta carne, com tempo médio de longevidade estimado em 34,3 dias. Para as fêmeas os valores estimados foram 2,8 e 39,3 para os parâmetros de forma e escala respectivamente, neste caso o tempo médio estimado foi 34,98.

A Figura 9 apresenta as estimativas de Kaplan-Meier e regressão Weibull para machos e fêmeas que receberam a dieta moela de frango. O teste logrank aponta para a não diferença entre os sexos, com p-valor de 0,87, o mesmo pode-se concluir com a regressão Weibull com p-valor de 0,88. O tempo médio estimado para a longevidade é 37,7 tanto para os machos quanto para as fêmeas que receberam a dieta moela. O parâmetro de forma e escala para os machos são 4,1 e 41,6 respectivamente e para as fêmeas 3,8 e 44,8. Em ambos os casos a curva de sobrevivência é do Tipo 1.

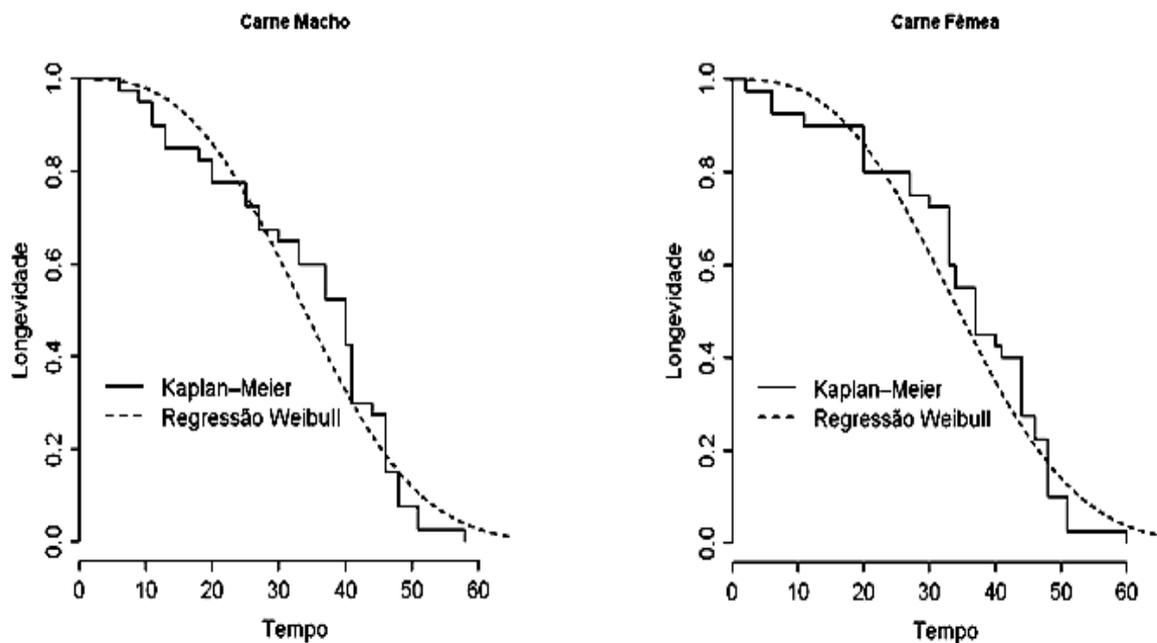


Figura 8. Longevidade de *Chrysomya megacephala* estimada por Kaplan-Meier e regressão Weibull para machos e fêmeas criados em dieta carne (T. Média: 26 °C, Mín./ Máx. 27 °C, U.R média: 65% Min / Max 80%).

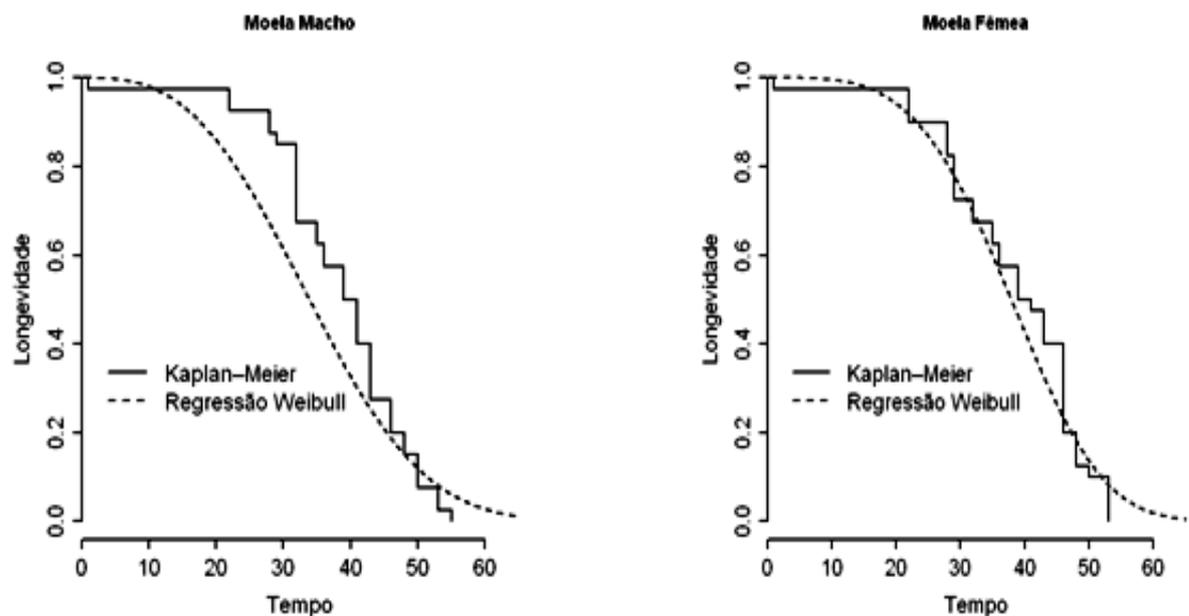


Figura 9 – Longevidade de *Chrysomya megacephala* estimado por Kaplan-Meier e regressão Weibull para machos e fêmeas criados em dieta moela de frango (T. média: 26 ° C min. / 27 ° Max, U.R média: 65% Min / Max 80%).

DISCUSSÃO

Diversos autores testaram dietas a base de proteína (Tabela 2) para a manutenção de suas colônias em laboratório, no entanto, a dieta natural mais utilizada para criação de larvas de *C. megacephala* é a carne bovina, porém, essa é adquirida a custos elevados e deve passar pelo processo de cortes, no tamanho aproximado de 2cm³ e, após, é transferida para sacos plásticos de polietileno, sendo armazenada em recipientes plásticos para ser congelada, o que demanda tempo e trabalho em seu manuseio (Queiroz & Milward-de-Azevedo 1991, Gabre et al. 2005).

Comparando-se a carne bovina (acém) e a moela de frango quanto ao valor nutricional, foi observado através de informações nutricionais exigidas pela ANVISA no verso das embalagens de 100g de cada produto, que ambas as dietas possuem os mesmos nutrientes, diferenciando-se apenas quanto aos valores (kcal, gramas ou miligramas). Seguindo esta análise, seguem as informações para carne e moela respectivamente: calorias (150 Kcal e 92Kcal), proteínas (16,0g e 21,0g), gorduras totais (2,0g e 6,0g), gorduras saturadas (0,5g e 2,0), colesterol (97mg e 125mg), cálcio (8mg e 12mg), ferro (1,95mg e 3,2mg) e sódio (82mg e 130mg). No entanto, essa diferença não afetou negativamente o desenvolvimento dos dípteros. Observou-se que a duração do estágio larval dos insetos criados na carne foi mais longa do que na moela. Isto reflete o ritmo de abandono que se estendeu até o quarto dia após o início do experimento para os insetos criados em carne, ao passo que na moela, as larvas abandonaram a dieta quase em sua totalidade no segundo dia (98,71%), indicando uma maior homogeneidade no desenvolvimento dos insetos criados na dieta testada.

Parra (2001) afirma ser importante para os insetos uma dieta que apresente aspectos atrativos como dureza, textura, homogeneização e água. Alguns autores consideram que a maior rapidez no desenvolvimento das larvas pode ser uma vantagem para sua sobrevivência, pois alcançam sua maturidade mais rapidamente (Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo, 1998).

Santos et al., (1996) ao criarem larvas de *C. megacephala* em dieta sardinha, mantidas previamente por 2 e 24 horas a 30°C, observaram o pico de abandono no terceiro dia, posterior ao do presente estudo, apesar da média de temperatura ter sido inferior (26°C Mín./ 27° C Máx.), sugerindo que a dieta pode ter influenciado neste parâmetro biológico.

A diferença observada entre a duração dos estágios larvais não interferiu na aquisição de massa corporal dos imaturos que foi semelhante para os insetos criados em ambas as dietas. O peso dos imaturos reflete diretamente o desenvolvimento dos insetos adultos, como

tamanho, sobrevivência, dispersão e capacidade reprodutiva (Aguiar-Coelho & Milward-De-Azevedo, 1998, D'Almeida & Oliveira, 2002).

A longevidade total (machos e fêmeas) dos insetos criados nas duas dietas não apresentou diferença significativa. Analisando-se fêmeas e machos isoladamente, observou-se que não existe diferença entre os sexos, e a longevidade esperada são muito próximas. Barbosa et al., (2004) em seu experimento, testando como dieta alternativa um alimento pastoso para cães (Pedigree®), observaram que as fêmeas viveram mais na dieta carne. Gabre et al., (2005) elaboraram uma tabela de vida para *C. megacephala* criadas em carne bovina e também observaram longevidade maior de fêmeas em relação aos machos.

Sousa et al., (2010) testando fígado de frango como dieta para esta espécie, observaram que os insetos apresentaram significativamente menores viabilidades dos estágios larvais e totais, ao comparar com a dieta controle. A dieta testada foi superior à carne bovina em dois parâmetros: viabilidade das larvas e total. Na viabilidade de pupa, a diferença foi mínima (99% moela e 100% carne), revelando que a moela pode ser uma alternativa mais barata e tão eficiente quanto a dieta carne bovina para a criação destes dípteros.

A razão sexual em ambas as dietas ficaram próximas de 50%, padrão considerado normal (Esser, 1990). O mesmo foi observado por Milward-De-Azevedo et al., (2000) ao compararem dietas oligídicas e para Gabre et al., (2005) em seu experimento com carne bovina.

Um aspecto a ser considerado em uma dieta é a relação custo benefício (Chaundhury et al., 2000). Um quilo de carne acém costuma ser em média 20% mais cara que um quilo de moela de frango. Outra vantagem é que esse substrato pode ser utilizado em sua forma íntegra, isto facilita o trabalho dos pesquisadores na manutenção de grandes estoques de dípteros e no armazenamento da dieta, reduzindo o tempo no seu preparo.

Estes resultados permitirão, com maior eficiência e menores custos, a produção em larga escala desses insetos para a utilização em terapia larval, no estudo de controle ambiental com pupas parasitadas, na entomologia forense e auxiliando também outros cientistas como herpetólogos, entomólogos, aquaríofilia, ranicultores, entre outros.

Tabela II: Revisão da literatura sobre diferentes dietas utilizadas para a criação de dípteros em laboratório.

Família	Espécie	Dieta	Referência	Ano
Calliphoridae	<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann,1819)	Fígado, músculo, rúmen bovino e coração de frango, todos crus.	Estrada et al.,	2009
		Carne equina em estado de putrefação.	Aguiar-Coelho et al.,	1995
		Carne bovina	Queiroz & Milward-de-Azevedo	1991
	<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794).	Fígado de Ave	Sousa et al.,	2010
		Albumina, óleo vegetal, vitaminas, sais minerais, Agar, nipagin e água destilada.	Mendonça et al.	2009
		Carne bovina	Gabre et al.	2005
		Ração pastosa para cães (Pedigre ®)	Barbosa et al.	2004
	Peixe	Esser	1990	
	<i>Cochiomya macellaria</i> (Fabricius, 1775)	Carne eqüina em estado de putrefação.	Aguiar-Coelho et al.,	1995
	<i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1830).	Carne eqüina, formaldeído, levedo de cerveja, proteinato de cálcio, sais de Wesson, agar e ovo de galinha.	Cunha e Silva et al.,	1994
		Carne eqüina em diferentes estágios de putrefação.	Paes et al.,	2000
	<i>Phaenicia sericata</i> (Meigen,1826)	Fígado bovino	Silva et al.,	2008
Sarcophagidae	<i>Ravinia belforti</i> (Prado & Fonseca, 1932).	carne moída, carne de fígado, biscoito para cachorro	Kamal	1958
Muscidae	<i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758)	farelo de trigo, carne de alfafa, grãos de purina e cerveja.	Greenberg	1954

CONCLUSÃO

A dieta moela de frango foi considerada adequada para criação de *C. megacephala* em laboratório sendo recomendada como uma dieta alternativa a utilização da carne bovina. Os parâmetros biológicos como massa corporal das larvas maduras, duração dos estágios de pré-pupa, pupa e neolarvas ao adulto não diferiram significativamente do controle (carne), enquanto as viabilidades dos estágios de larva e de neolarvas a adulto foram superiores para os adultos criados na dieta moela, assim com a longevidade dos adultos foi superior na dieta moela.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro- UNIRIO, ao CNPq - PIBIC, a FAPERJ e FINEP pelo apoio financeiro ao Laboratório de Estudo de Dípteros.

REFERÊNCIAS

- Aaron GP, Nazni WA, Lee HL, Ariff MA, Saranum M, Naicker AS, et al. 2009. Maggot debridement Therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with convencional desbridement in diabetic foot ulcers. *International Wound Journal* 6: 39-46.
- Aguiar-Coelho VM, Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. 1995. Associações entre larvas de *Cochliomya macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoologia* 12(4):983-990.
- Aguiar-Coelho VM & Milward-de-Azevedo EMV. 1998. Combined rearing of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) under laboratory conditions. *Journal of Applied Entomology* 122: 551–554.
- Barbosa LS, Jesus DML & Aguiar-Coelho VM. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências* 6(2): 207–217.
- Cambal M, Labas P, Kozanek M, Takac P & Krumpalova Z. 2006. Maggot debridement therapy. *Bratislava Medical Journal* 107(11-12):442-444
- Chaudhury MF, Alvarez LA & Velasquez LL. 2000. A new meatless diet for adult screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Economic Entomology* 93(4):1398-1401
- Colosimo EA, Giolo SR. 2006. Análise de sobrevivência aplicada, São Paulo: Edgard Blücher

- Cristino AS, Nune FMF, Barchuk AR, Aguiar -Coelho VM, Simões ZLP & Bitondi MM. 2010. Organization, evolution and transcriptional profile of hexamerin genes of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Insect Molecular Biology* 19: 137-147.
- Cunha-e-Silva SL & Milward-de-Azevedo EMV. Estudo comparado de desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomya macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em duas dietas à base de carne, em laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 1994; 11: 659-668.
- Dallavecchia LD, Silva Filho GR, Figueiredo AMN & Aguiar-Coelho MV. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. 2010. *Revista de pesquisa: O cuidado é fundamental (Online)* (Ed. supl.1):4
- Dallavecchia DL, Proença BN, Coelho VMA. Bioterapia: uma alternativa eficiente para o tratamento de lesões cutâneas. 2011. *Revista de pesquisa: O cuidado é fundamental (Online)* 3(3):2071-79.
- D'almeida JM & Lima SF. 1994. Atratividade de diferentes iscas e sua relação com as fases de desenvolvimento ovariano em Calliphoridae e sarcophagidae (insecta, diptera). *Revista Brasileira de Zoologia* 2:177-186.
- D'almeida JM. & Oliveira VC. 2002. Dietas artificiais para a criação em laboratório de *Chrysomya* (*C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. putoria*) (Diptera: Calliphoridae). *Entomología y Vectores* 9: 79–91.
- Esser JR. 1990. Factors influencing oviposition, larval growth and mortality in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), a pest of salted dried fish in south-east Asia. *Bulletin of Entomological Research* 80: 369–376.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ. & Linhares AX. 2009. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207
- Ferraz ACP, Gadelha BQ, Aguiar-Coelho VM. 2010. Análise Faunística de Califorídeos (Diptera) da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Entomologia* 53(4): 620-628
- Ferraz ACP, Dallavecchia DL, da Silva DC, Carvalho RP, Silva Filho RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science* 12:37

- Furlanetto SMP, Campos MLC & Hársi CM. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15: 170–174.
- Gabre RM, Adham FK & Chi H. 2005. Life table of *Crysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Acta oecologica* 27: 179–183
- Gagné RJ. 1981. *Chrysomya spp.*, old World blowflies (Diptera: Calliphoridae), Recently established in the americas. *Annals of the Entomological Society of America* 27: 21-22.
- Greenberg B. 1954. A method for the sterile culture of housefly larvae, *Musca domestica* L. Can. *Entomology* 86:527-528
- Greenberg B. 1973. Flies and Diseases: Biology and Disease Transmission. Princeton (NJ): Princeton University Press, Princeton.; 2:740.
- Kamal AS. 1958. Comparative study of thirteen species os sarcophagous Calliohoridae end *Sarcophagidae* (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America* 51:261-270.
- Marinho CR, Azevedo ACG & Coelho VMA. 2003. Diversidade de Califorídeos (Diptera: Calliphoridae) em área urbana, Rio de Janeiro. *Entomologia y Vectores* 10:185-199.
- Mello RS, Queiroz MMC & Aguiar-Coelho VM. 2007. Population fluctuations of calliphorids species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia - Série Zoológica* 97(4): 1–5
- Mello RS, Borja GEM, Coelho VMA. 2010. Effects on Microhymenopteran Progeny of Different Host Exposure Periods (*Chrysomya megacephala*, Calliphoridae) to the Parasitoid Wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 53(1): 77-85
- Mello RS, Aguiar-Coelho VM. 2009. Durations of immature stage development period of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. *Parasitology Research* 104(2): 411-418
- Mendonça PM, Queiroz MMC & d'Almeida JM. 2009. Rearing *Chrysomya megacephala* on Artificial Diets Composed of Varing Concentrations of Albumin. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52(2):421-426
- Milward-de-Azevedo EMV, Carraro VM, Carvalho CRP, BrandoliniI SVP, Ribeiro EGM, Almeida ATS e Amorium MGR. 2000. Criação de *Chrysomya* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em dietas comerciais: abordagem preliminar. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 22(3): 113–116.

- Oliveira VC, Mello RP & D`Almeida JM . 2002. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico. *Revista de Saúde Pública* 36(5):614-20
- Paes MJ, Brito LG, Branco MC & Borja-Moya GE. 2000. Desenvolvimento pós-embriônico de *Lucilia cuprina* (Wied, 1830) (Diptera: Calliphoridae), criada em dieta a base de carne equina em diferentes estágios de putrefação. *Parasitol el Dia* 24(3-4): 102-108
- Paraluppi ND, Vasconcelos JC, Aquino JS, Castellon EG & Silva MSB. 1996. Calliphoridae (Diptera) in Manaus: IV Bacteria isolated from blowflies collected in street markets. *Acta Amazônica* 26: 93-96.
- Parra JRP. 2001. *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*. 6nd ed. São Paulo: FEAQ
- 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* 8:75-84.
- Queiroz MMC, Norberg NA, Maure EAP, Toledo RF, Gazêta GS, Dutra AEA, Rodrigues-Guimarães R. 1999. Veiculação de bactérias patogênicas por moscas sinantrópicas coletadas em restaurantes, hospitais e feiras da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. Anais do XIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia. Acapulco, Guerrero. México. 102 p.
- Reis PR, Haddad ML. 1997. Distribuição de Weibull como Modelo de Sobrevivência de *Iphiseiodes zuluagai* Demark e Muma (Acari: Phytoseiidae), Anais da *Sociedade Entomológica do Brasil* 26(3).
- Ribeiro RC, Milward-de-Azevedo EMV. 1997. Dietas Naturais de criação de *C. albiceps* (Diptera: Calliphoridae): Estudo comparado. *Revista Ciência Rural* 27(4): 641-644
- Santos MB, Martins C & Milward-de-Azevedo EMV. 1996. Desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) criada em dieta a base de sardinha previamente exposta, por diferentes períodos, à condições controladas. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 39: 799-805.
- Sherman RA, Hall MJ & Thomas S. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology* 45: 55-81
- 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* 3:2

Silva AS, Zanatte RA & Monteiro SG. 2008. Biologia da mosca *Phaenicia sericata* em diferentes substratos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 17(2):63-66

Singh P & Moore RF. 1985. Handbook of insects rearing. Elsevier Science Publishing. New York, USA

Sousa, A. G. P.; Ferraz, A. C. P.; Nascimento, A. L. O. & Aguiar-Coelho, V. M. 2010. Alternative natural diet for the creation of immature oriental latrine flies under controlled conditions. *Revista Brasileira de Zootecias* 12 (2): 133-140

CAPÍTULO II- ESTERILIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS OVOS E TESTE DE ESTERILIDADE DE *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN) (INSECTA: DIPTERA: CALLIPHORIDAE) PARA UTILIZAÇÃO EM BIOTERAPIA NO BRASIL

Esterilização da Superfície dos Ovos e Teste de Esterilidade de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Insecta: Diptera: Calliphoridae) para utilização em Bioterapia no Brasil

RESUMO

Esterilizar ovos de dípteros para utilização em bioterapia exige a produção de larvas estéreis em larga escala, assim como controlar sua qualidade. Neste estudo, objetivou-se avaliar a ação do Glutaraldeído na esterilização de ovos de *Chrysomya albiceps*, aplicando testes de esterilidade. Massas de ovos com 0,600 gramas foram divididas em três partes de 0,200 gramas e dissociadas com água destilada estéril, as suspensões obtidas, foram misturadas com solução ativada de Glutaraldeído 2%. Após 15 minutos de contato, as suspensões foram filtradas em papel filtro e o resíduo de Glutaraldeído excedente no filtrado foi inativado pela rinsagem com Caldo Soja Trypticaseína (TSB). As massas de ovos tratadas foram colocadas em placas de Petri contendo Agar Soja Trypticaseína (TSA). Cerca de 10% da massa esterilizada foi transferida para tubos contendo TSB e Caldo Tioglicolato Fluído (FTM). Estes tubos foram incubados, respectivamente, a 22,5°C e 35,0°C por 14 dias para verificação da esterilidade das massas de ovos. As placas contendo o restante dos ovos (90%) foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara climatizada 30°C/dia e 28°C/noite, 60+10% UR e 12h de fotofase para avaliar a viabilidade e sobrevivência dos insetos. Cada experimento foi realizado em triplicata utilizando Cabine de Segurança Biológica tipo Classe II. No agente testado não foi encontrada mudança de cor ou turvamento atestando a esterilidade do produto, assim como qualquer vestígio de contaminação. O produto testado mostrou-se eficaz para uso como esterilizante de ovos de *C. albiceps* em todos os parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Biodiversidade , larvas terapêuticas, moscas varejeiras, glutaraldeído

Introdução

Bioterapia é uma técnica terapêutica utilizada para o desbridamento de feridas, com o emprego de larvas de moscas necrobiontófagas, eclodidas de ovos previamente esterilizados.

Essa é uma técnica muito antiga, havendo indícios de que civilizações como tribos aborígenes da Austrália, habitantes do Norte de Mianmar e os Maias na América Central já utilizavam os benefícios dessa técnica (Sherman et al., 2000). Ambroise Paré (1510-1590), médico-cirurgião francês no período entre - guerras observou pela primeira vez o benefício do uso de larvas de moscas sobre as feridas, onde soldados que eram atingidos em campo e que

apresentavam infestações de larvas em seus ferimentos, cicatrizavam melhor do que os que não apresentavam infestações por larvas. Em 1829, o Barão Dominic Larrey, general-médico do exército de Napoleão, ao recolher soldados na frente de batalha, relatou que quando estes tinham suas feridas infestadas por larvas, apresentavam menos propensão à infecção e o processo de cura era mais acelerado comparado aos outros feridos (Goldstein, 1931).

Foi introduzida pela primeira vez nos Estados Unidos (1931) por William S. Baer, professor e médico ortopédico no Hospital Johns Hopkins, em Maryland, onde foi utilizada rotineiramente até meados da década de 40, em mais de 300 hospitais. Com a implantação dos antibióticos e as técnicas de desbridamento cirúrgico, o tratamento realizado por larvas terapêuticas tornou-se descartável até o início de 1990, quando, devido a alta resistência de bactérias em feridas infectadas, voltou a ser utilizado nos Estados Unidos, Reino Unido e Israel (Mumcuoglu et al., 1999; Sherman et al., 2000). Essa técnica tem sido utilizada rotineiramente em alguns países como Estados Unidos, México, Chile, Inglaterra, Alemanha, Suíça, Suécia, Ásia, Israel, Índia, Indonésia, entre outros, como uma alternativa eficiente para auxiliar na cura de feridas consideradas de difícil cicatrização como pé diabético, úlceras venosas, úlceras de pressão, queimaduras, assim como determinados tipos de tumores benignos, abscessos e osteomielitis (Sanchez et al., 2004).

As larvas de dípteros necrobiontófagos atuam liberando, no leito da ferida, secreções e linfa capazes de induzir à cicatrização. Há estímulo a migração de fibroblastos auxiliando na remodelação da matriz-extracelular, assim como o aumento da atividade angiogênica, atividade anti-microbiana, estímulo à uma resposta anti-inflamatória (IL-10) e inibidora pro-inflamatória (TNF- α , IL-12p40), quebra do biofilme, morte das bactérias por ingestão e alteração do pH da ferida, diminuindo assim, o tempo de cicatrização (Prete, 1997; Muncuoglu et al., 2001; Horobin et al., 2006; Cazander et al., 2009, Nitsche et al., 2010; Zhang et al., 2010; Van Der Plas et al., 2010; Cazander et al., 2010).

Chrysomya albiceps (Wiedemann 1819) foi introduzida e relatada pela primeira vez no Estado de São Paulo, Brasil, no final da década de 1970, e encontra-se atualmente distribuída em quase todo o território nacional dada sua considerável habilidade de dispersão e adaptação (Estrada et al., 2009). Trata-se de uma espécie necrobiontófaga, causadora de miíase secundária (atraída por carne em putrefação). Segundo Ferraz et al., (2011) *C. albiceps* é um agente etiológico de miíases exóticas no Brasil, sendo reportado como agente causador de miíases em um Hospital no Rio de Janeiro.

Para utilizar essa espécie em bioterapia são necessários estudos laboratoriais e/ou clínicos para avaliar sua eficácia como larva terapêutica. Para isso, torna-se indispensável produzir larvas estéreis em larga escala, conhecer e dominar uma técnica de esterilização de ovos para dípteros. Desta forma, objetivou-se avaliar a ação do glutaraldeído na esterilização de ovos de *C. albiceps*, aplicando testes de esterilidade segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-Brasil), para que as larvas possam ser aplicadas aos clientes com segurança e sem qualquer possibilidade de veicularem microorganismos.

Material e Métodos

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

Os insetos adultos foram capturados na Fundação Jardim Zoológico da cidade do Rio de Janeiro e transferidos para o LED, onde procedeu-se identificação taxonômica segundo Mello et al., (2007). A metodologia de criação seguiu Dallavecchia et al., (2009).

A esterilização da superfície da massa de ovos foi realizada com o esterilizante químico glutaraldeído, um esterilizante líquido comumente utilizado na esterilização de materiais de uso hospitalar. Esse agente possui ação rápida e eficaz sobre bactérias, Gram-positivas e negativas, micobactérias, fungos e vírus (Anvisa 2007). Na avaliação da eficácia do procedimento de esterilização foram utilizados dois testes de esterilidade microbiológica, por adição em meio líquido, com base no método de inoculação direta descrito na farmacopeia brasileira (Brasil 2010).

Massas de ovos provenientes de fêmeas de *C. albiceps* da colônia estoque pertencentes a 3ª geração, foram transferidas, com auxílio de pinça estéril para uma lâmina de vidro de microscopia e, em seguida, pesadas em balança semi-analítica até alcançar o peso total de 0,600 g, após, foram divididas em três partes iguais de 0,200g, a média de ovos em 0,200g é de aproximadamente 1900 ovos. A seguir, as massas foram transferidas para placas de Petri estéreis e misturadas com 4 mL de água destilada estéril para desagregar os ovos, sendo estes dissociados mecanicamente com a ajuda de um pincel nº 0. A suspensão de ovos obtida foi transferida, assepticamente, para um tubo de ensaio contendo 20 ml de solução de glutaraldeído 2%, ativada pela elevação do pH para 8,0-8,2 através da adição de bicarbonato de sódio 0,4% e fosfato de sódio monobásico 0,05%. Passados 15 minutos de contato, o conteúdo do tubo foi filtrado através de um disco de papel filtro Whatman 0,8 µm de

espessura e com 2 cm de diâmetro colocado em um suporte plástico estéril (copo monitor Bactor Estéril 100ml), tendo por apoio um kitasato. Imediatamente após a filtração, o papel de filtro foi rinsado com 30 mL de Caldo Soja Tripticaseína (TSB), para neutralização de qualquer resíduo de glutaraldeído que pudesse ter efeito tóxico sobre os ovos. Em condições assépticas, os ovos foram transferidos para a superfície de placas de Petri com Agar Soja Tripticaseína (TSA), sendo lacradas com filme plástico de PVC e colocadas em câmara climatizada regulada a 30°C/dia e 28°C/noite, com 60±10% de umidade relativa do ar e 12 horas de fotofase (início às 6 horas), para observação da eclosão das larvas e algum crescimento bacteriano na placa.

Para o teste de esterilidade, cerca de 10% (média de 190 ovos) da massa tratada com glutaraldeído foi retirada da superfície do papel de filtro, com auxílio de um pincel estéril, e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de TSB (detecta a presença de bactérias aeróbias e facultativas) e Caldo Tioglicolato Fluído (FTM) (detecta a presença de aeróbios e anaeróbios), sendo esses incubados, respectivamente, a 22,5°C e 35,0°C por 14 dias. Após o período de incubação os tubos foram inspecionados visualmente quanto a indícios de crescimento bacteriano. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo o manuseio dos materiais feito em Cabine de Segurança Biológica tipo Classe II (Fig 1).

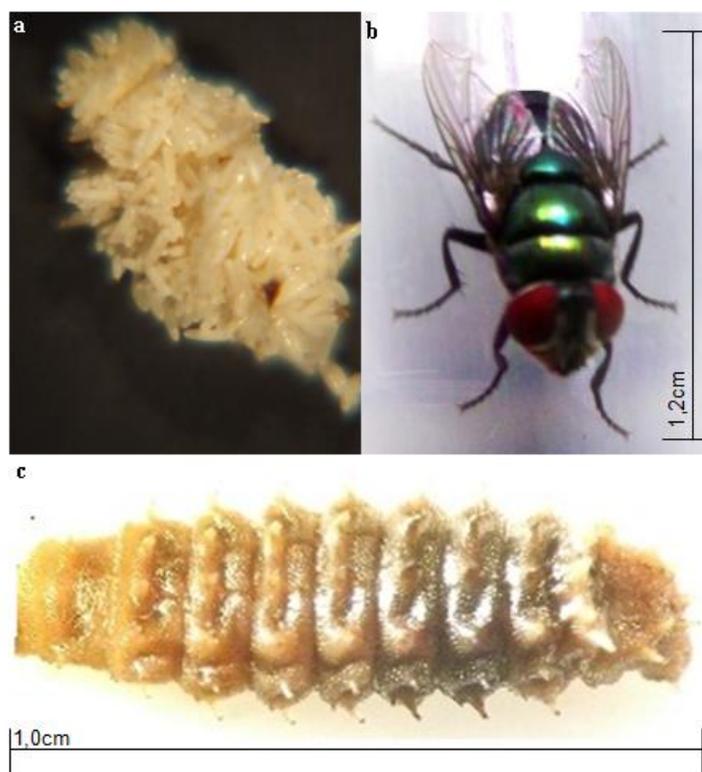


Fig 1: a) Massa de ovos de *Chrysomya albiceps* com 0,200g; b) Espécime do sexo feminino de *C. albiceps* da colônia do laboratório; c) Pupa de *C. albiceps*.

Resultados e Discussão

Neste estudo foram realizados testes preliminares para esterilização de ovos de *Cryomyia albiceps* utilizando Hipoclorito de Sódio 0,5 e 1%, desenvolvidos em diferentes tempos de exposição, para esterilizar massa de ovos. Porém, ao se fazer o teste de esterilidade, de acordo com protocolo farmacopeico, os resultados não foram satisfatórios, verificando-se a presença de contaminação nos tubos de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) e Caldo Tioglicolato Fluído (FTM) que continham os ovos esterilizados. O resultado supracitado serviu de base para descontinuar o uso do Hipoclorito de Sódio e buscar como substância esterilizante alternativa o Glutaraldeído 2% (Dallavecchia et al., 2010). Hipoclorito de sódio, usado isoladamente ou associado ao ácido bórico (Líquido de Dakin) tem sido o agente químico mais utilizado entre os pesquisadores. Varzin et al., (2005) testaram oito agentes esterilizantes, em concentrações e tempos distintos. As análises do teste de esterilidade foram realizadas com Plate Count Agar (PCA), onde somente três dos agentes testados, dentre os oito selecionados, não continham crescimento bacteriano, entre estes, Formaldeído, Farmasept- plus® e hipoclorito de sódio 0,5%, no entanto, as viabilidades das larvas foram pouco acima de 50% com os químicos testados.

Para esterilizar ovos de *C. megacephala* e *C. putoria*, Nitsche et al.,(2010) utilizaram grupos de 60 ovos, divididos em três grupos de 20 para cada espécie, empregaram soluções de hipoclorito de sódio 0,5% e 1,0%. Para atestarem a esterilidade das larvas, empregaram técnica parecida com a de Varzin et al., (2005), onde, após esterilizararem os ovos, utilizaram PCA e Agar Sangue, não encontrando, em suas amostras contaminação.

No atual trabalho, procurou-se esterilizar grandes demandas de ovos de moscas para utilização em bioterapia, visando atender às necessidades hospitalares. Sherman et al., (2000) sugeriram que para a limpeza das feridas o ideal seria utilizar 10 larvas /cm² de área da superfície necrosada de uma ferida. Geralmente, feridas consideradas pequenas podem receber a aplicação de até 200 larvas, ao passo que grandes feridas receberiam a aplicação de até 1000 larvas para um desbridamento eficaz, portanto, é necessário que o profissional avalie a extensão da ferida e o número aproximado de larvas que necessitará utilizar (Muncuoglu et al., 1999; Jarvis, 2000).

O agente químico Glutaraldeído 2%, utilizado no processo de esterilização não impediu a eclosão das larvas da espécie testada. A esterilidade microbiológica dos ovos de *C. albiceps* foi comprovada pelo teste de esterilidade farmacopeico, assim como a qualidade das larvas, promovendo maior confiabilidade ao agente testado para este procedimento.

Paulino (1999) afirmou que o glutaraldeído é um agente químico que apresenta como desvantagem a alta mortalidade dos insetos quando utilizado na desinfecção de ovos, porém, no presente estudo este fato não foi observado. Sugere-se que isto possa estar relacionado com a não utilização de um agente neutralizador de toxicidade.

O agente esterilizante Glutaraldeído a 2% mostrou-se eficaz na esterilização de volumes maiores de massa de ovos (0,600g) e a toxicidade atribuída ao agente esterilizante, sendo considerado por Paulino (1999) como inviável devido as altas taxas de mortalidade das larvas pode ser evitado se, ao esterilizar os ovos, as massas forem rinsadas com um agente neutralizador.

O teste de esterilidade, segundo as normas da ANVISA é indispensável para garantir a qualidade do produto, assim como para a segurança do cliente final. Estudos e investimentos precisam ser realizados e analisados no sentido de ampliar a fabricação das larvas e disponibilizá-la para uso do paciente portador de feridas de difícil cicatrização.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro- UNIRIO, ao CNPq - PIBIC, a FAPERJ pela bolsa concedida e ao FINEP pelo apoio financeiro ao Laboratório de Estudo de Dípteros.

Referências

Anvisa. 2007. *Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde: Fundamentos para a utilização*. Gomes SM, Verotti M, Melo JR, Santi L.

Brasil. 2010. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1, 5ª Edição, Brasília.

Cazander G, Van Veen KEB, Bernards AT, Jukema GN. 2009. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *Journal of Tissue Viability* 18: 80-87.

Cazander G, van de Veerdonk MC, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Schreurs MWJ, and Jukema GN. 2010. Maggot Excretions Inhibit Biofilm Formation on Biomaterials. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 468(10): 2789–2796.

Dallavecchia DL ; Ferraz AC; Proença, B ; Aguiar-Coelho VM. Análise comparativa da longevidade entre duas gerações (G2 E G10) de *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae) criadas em dieta moela de frango, sob condições controladas. In: XXI CONGRESSO

BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA e II ENCONTRO DE PARASITOLOGIA DO MERCOSUL, Foz do Iguaçu, 2009.

Dallavecchia DL, Proença, B, Aguiar-Coelho VM. 2011. Biotherapy: an efficient alternative for the treatment of skin lesions. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental (Online)* 3(3): 2971-2079.

Dallavecchia DL, Silva Filho RG, Figueiredo NMA, Aguiar-Coelho VM. 2011. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental (Online)* In: 120 anos da Escola de Enfermagem Alfredo Pinto (EEAP/UNIRIO). 1-4

Estrada, Dora A; Grella, Maicon D; Thyssen, Patricia J and Linhares, Arício X. 2009. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotropical Entomology*. 38(2):203-207.

Ferraz, ACP; Almeida de VRG; Jesus de DM; Rotatori GN; Nunes R; Proença B; Aguiar-Coelho VM; Lessa CSS. 2011. Epidemiological study of myiases in the Hospital do Andaraí, Rio de Janeiro, including reference to an exotic etiological agent. *Neotropical Entomology [online]*. 40(3): 393-397

Goldstein H. 1931. Maggots in the treatment of wound and bone infections. *The Journal of Bone & Joint Surgery*; 13:476-78

Horobin, AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. 2006. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *Journal of Investigative Dermatology* 126(6):1410-8.

Jarvis A. Maggots in orthopaedics: past, present and future. Fifth International Conference on Biotherapy; 2000 Jun 29-Jul 1; Wurzburg, 11-2

Mello RS, Queiroz MMC & Aguiar-Coelho VM. 2007. Population fluctuations of calliphorids species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia - Série Zoológica* 97(4): 1-5.

Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedman R, Schulman H, Bichucher H, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Raz I. 1999. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *International Journal of Dermatology* 38(8):623-7.

- Mumcuoglu, KY, J Miller, M Mumcuoglu, M Friger and M Tarshis. 2001. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera : Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 38:161-166.
- Nitsche MJT. 2010. Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, Brasil.
- Paulino CA. 1999. Anti-sépticos e desinfetantes. In: Spinosa HS, Gorniak SL, Bernardi MM. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 2.ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil.
- Sánchez MC, Chuaire L, Narváez R, Segura NA. 2004. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. La terapia larval. *Revista Ciencias de la Salud* 2(2):156-64
- Sherman, RA.; Hall, MJ.; Thomas, S. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology*.; 45: 55-81.
- Van Der Plas MJA, Baldry M, Van Dissel JT, Jukema GN & Nibbering PH. 2009. Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia* 52:1962–1970.
- Van Der Plas MJA, Dambrot C, Dogterom-Ballering HCM, Kruithof S, van Dissel JT and Nibbering PH. 2010. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 65: 917–923
- Varzim LSBF. 2007. Esterilização de ovos de moscas varejeiras *Chrysomya putoria* (Wedermann, 1830), (Díptera calliphoridae) para utilização em bioterapia. Dissertação de Mestrado, Departamento de parasitologia, UNICAMP, São Paulo, Brasil.
- Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhang J, Decheng LV. 2010. Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids in Health and Disease* 9:24.

CAPÍTULO III – ESTERILIZAÇÃO DE OVOS DE *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1818) (INSECTA: DIPTERA: CALLIPHORIDAE) PARA UTILIZAÇÃO EM BIOTERAPIA

Esterilização de ovos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Insecta: Diptera: Calliphoridae) para utilização em bioterapia.

Resumo

Para o uso da bioterapia é necessária a produção de larvas de dípteros estéreis em laboratório em larga escala com controle de qualidade. Neste estudo, objetivou-se avaliar a ação do glutaraldeído na esterilização de ovos de *Chrysomya putoria*, aplicando testes de esterilidade farmacopeicos. Massas de ovos com 0,600 gramas foram divididas em três partes de 0,200 gramas e dissociadas com auxílio de água destilada estéril e, as suspensões obtidas, misturadas com solução ativada de glutaraldeído 2%. Após 15 minutos de contato, as suspensões foram filtradas em papel filtro Whatman 0,8 µm e o resíduo de glutaraldeído obtido no filtrado, inativado pela rinsagem com Caldo Soja Trypticaseína (TSB). As massas de ovos tratadas foram colocadas, assepticamente, em placas de Petri contendo gaze umedecida com solução salina estéril. Cerca de 10% da massa esterilizada foi transferida para tubos contendo TSB e Caldo Tioglicolato Fluído (FTM). Estes tubos foram incubados, respectivamente, a 22,5°C e 35,0°C por 14 dias para verificação da esterilidade das massas de ovos. As placas contendo o restante dos ovos (90%) foram vedadas com filme plástico e mantidas em câmara climatizada 30°C/dia e 28°C/noite, 60±10% UR e 12h de fotofase para avaliar a viabilidade e sobrevivência dos insetos. Cada experimento foi realizado em triplicata utilizando Cabine de Segurança Biológica tipo Classe II. No agente testado não foi encontrado mudança de cor ou turvamento atestando a esterilidade do produto, assim como qualquer vestígio de contaminação. Quarenta larvas (em três repetições) nos períodos de 12, 24 e 48 horas após a esterilização transferidas para dieta produziram viabilidades larval, pupal e total semelhantes ao controle (larvas sem esterilização). No entanto, no tratamento de 72 horas, constatou-se viabilidades larval e total significativamente inferiores aos demais tratamentos. Não houve diferença significativa para o estágio pupal. O produto testado mostrou-se eficaz para uso como esterilizante de ovos de *C. putoria* em todos os parâmetros avaliados.

Palavras -chave: Feridas, larvas estéreis, terapia larval, teste de esterilidade.

Abstract: Large-scale, quality controlled laboratory production of fly larvae is needed for biotherapy. The objective of the present study was to assess the action of glutaraldehyde on the sterilization of *Chrysomya putoria* eggs by applying pharmaceutical sterility tests. Egg masses with 0.600 g were divided into three parts of 0.200 g, the eggs separated using sterile distilled water and the suspensions obtained were mixed with activated 2% glutaraldehyde solution. After 15 min contact, the suspensions were filtered through 0.8 µm Whatman filter paper and the glutaraldehyde residue obtained in the filtrate was inactivated by rinsing with Tryptocasein Soybean Broth (TSB). The treated eggs were placed aseptically on Petri dishes containing gauze moistened with sterile saline solution. About 10% of the sterilized mass was transferred to test tubes containing TSB and Fluid Thioglycollate Broth (FTB). The tubes were incubated, respectively, at 22.5°C and 35.0°C for 14 days to verify the egg mass sterility. The plates containing the rest of the eggs (90%) were sealed with plastic film and kept in an acclimatized chamber 30°C/day, 28°C/night, 60+10% RH and 12h light period to assess the insect viability and survival. Each experiment was carried out in triplicate using a biological class II safety cabinet. No change in color or turgidity were found in the agent tested that proved the sterility of the product and there was no trace of contamination. Forty larvae (in three replications) in the period of 12, 24 and 48 hours after sterilization, when transferred to the diet produced larva, pupa and total viability similar to the control (larvae without sterilization). However, in the 72-hour treatment, larva and total viability were significantly lower than the other treatments. There was no significant difference for the pupa stage. The product tested was shown to be efficacious for use as a sterilizer of *Chrysomya putoria* eggs for all the parameters assessed.

Keywords: wounds, diabetes, sterile larvae, larva therapy, sterility test

Introdução

Estudos relacionados a dípteros necrobiontófagos vêm despertando interesse entre entomologistas e pesquisadores devido à aplicabilidade em diversas áreas da ciência, como na bioterapia (Sherman, 2010), entomologia forense (Estrada et al., 2009; Ferraz et al., 2012), no controle biológico através da utilização de algumas espécies como hospedeiras para microhimenópteros parasitóides (Mello et al., 2009; Barbosa et al., 2010), assim como, na capacidade de produzirem miíases ocasionais ou acidentais (Ferraz et al., 2010).

Bioterapia, também conhecida como terapia larval, é uma técnica terapêutica utilizada para o desbridamento rápido de feridas, com o emprego de larvas de dípteros vivas e estéreis colocadas de forma intencional na ferida para que se alimentem somente dos tecidos desvitalizados, ou seja, façam a “desbridamento minucioso”, preservando os tecidos vivos. Por outro lado, miíase é a presença de larvas de moscas desenvolvendo-se em tecido vivo ou necrosado, sendo o processo acidental (Sherman et al., 2000; Ferraz et al., 2010). A bioterapia tem sido utilizada rotineiramente em alguns países da América do Norte, Central e Europa, como uma alternativa eficiente para auxiliar na cicatrização de feridas consideradas de difícil cicatrização como pé diabético, úlceras venosas, úlceras de pressão, queimaduras, assim como determinados tipos de tumores benignos, abscessos e osteomielites (Sanchez et al., 2004).

Nitsche et al., (2010), verificaram que lesões induzidas experimentalmente em ratos modelo Wistar, tratados com bioterapia, cicatrizaram mais rapidamente comparados a outros submetidos a métodos de tratamento tradicional.

Horobin et al., (2006), em testes realizados *in vitro*, demonstraram que a liberação de extratos/secreções (ES) de larvas de dípteros estimulam a migração de fibroblastos auxiliando na remodelação da matriz-extracelular, assim como aumenta a atividade angiogênica dos tecidos (Zhang et al., 2010), fatores indispensáveis para a cicatrização. Os ES atuam no processo infeccioso dos tecidos por sua atividade anti-microbiana sobre espécies de bactérias Gram positivas e negativas (Cazander et al., 2009) e por sua ação benéfica nos neutrófilos humanos, estimulando a produção de uma resposta anti-inflamatória (IL-10) e inibidora pro-inflamatória (TNF- α , IL-12p40) (Van Der Plas et al., 2009, 2010).

A bioterapia, também auxilia na desinfecção anti-microbiana da ferida pela ação direta das larvas sobre as bactérias encontradas no leito da ferida, por liberarem enzimas e fazerem a ingestão destas. Segundo Muncuoglu et al.,(2001) larvas de dípteros ao digerirem o tecido necrosado da ferida, acumulam no intestino médio anterior, altas taxas de bactérias, no intestino posterior já pode ser observada uma diminuição significativa na quantidade de

bactérias e, o número dessas diminuiu mais ainda na porção final do intestino e praticamente nenhuma bactéria é vista na extremidade posterior, próximo ao ânus, o que indica que as fezes depositadas nas feridas contêm apenas um pequeno número de bactérias que não são nocivas.

A formação de biofilme em processos infecciosos, em tecidos ou associados a implantes de dispositivos médicos, representa um grande desafio terapêutico. A matriz extracelular que envolve as bactérias nos biofilmes dificulta a ação de antibióticos, assim como células e moléculas efetoras do sistema imune do hospedeiro (Van Der Plas et al., 2008). Estudos *in vitro* demonstraram que os ES de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) inibem a formação ou determinam a desagregação de biofilmes formados por importantes patógenos como *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus* (Harris et al., 2009; Cazander et al., 2010), esta desagregação na superfície dos materiais de implantes potencializaria a eficácia de antibióticos utilizados durante o tratamento (Van Der Plas et al., 2009, 2010).

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1818) possui características biológicas com potencial para a utilização em bioterapia (Dallavecchia et al., 2010), pois apresenta comportamento necrobiontófago e elevada capacidade reprodutiva com grande produção de massa de ovos, características indispensáveis a sua utilização. Esse díptero ocorre em abundância em ambientes antropofizados (Gadelha et al., 2009), facilitando o estabelecimento de colônias desse inseto e a manutenção em condições laboratoriais (Barbosa et al., 2004; Ferraz et al., 2010).

Para utilizar os benefícios dessa terapêutica é necessário produzir larvas estéreis para aplicar nas feridas necróticas, conhecer e dominar a técnica de esterilização dos ovos dos dípteros, evitando que a larva seja um vetor de patógenos ao cliente portador de feridas de difícil cicatrização (Baer, 1935). Dessa forma, objetivou-se avaliar a ação do glutaraldeído na esterilização de ovos de *C. putoria*, aplicando testes de esterilidade segundo as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-Brasil), para que as larvas possam ser aplicadas aos clientes com segurança e sem qualquer possibilidade de veicularem microorganismos.

Material e Métodos

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

Os insetos adultos foram capturados com o auxílio de armadilhas confeccionadas com tubo de (PVC) seguindo modelo elaborado por Mello et al., (2007). Em seu interior, como isca para atração dos insetos, foram inseridos 200 gramas de moela de frango. As armadilhas ficaram expostas por 12 horas em locais de grande infestação de moscas na Fundação Jardim Zoológico da cidade do Rio de Janeiro e, após, recolhidas e levadas ao LED. Os insetos capturados foram submetidos à temperatura de -10° C por cerca de 3 minutos até cessarem seus movimentos, permitindo a identificação taxonômica em microscópio estereoscópico.

Os adultos foram transferidos para gaiolas transparentes de polietileno (40x30x20cm), com abertura na parte superior coberta por tecido de náilon para arejamento, e na parte lateral para permitir o acesso ao interior da gaiola. Os adultos foram alimentados com solução de mel a 50%, água e moela de frango como fonte de proteína e substrato para oviposição e criação das larvas. A metodologia de criação seguiu Dallavecchia et al., (2010).

A esterilização das massas de ovos foi realizada com o glutaraldeído, um esterilizante líquido comumente utilizado na esterilização de materiais de uso hospitalar. Este agente possui ação rápida e eficaz sobre bactérias, Gram-positivas e negativas, micobactérias, fungos e vírus (Brasil, 2007). Na avaliação da eficácia do procedimento de esterilização foi utilizado teste de esterilidade microbiológica, por adição em meio líquido, com base no método de inoculação direta descrito na farmacopeia brasileira (Brasil, 2010).

Massas de ovos provenientes de fêmeas de *C. putoria* da colônia estoque pertencentes a 9ª geração, foram transferidas, com auxílio de pinça estéril para uma lâmina de vidro de microscopia e, em seguida, pesadas em balança semi-analítica até alcançar o peso total de 0,600 g, após, foram divididas em três partes iguais de 0,200g. Logo, transferidas para placas de Petri estéril e misturadas com 4 mL de água destilada estéril para desagregar os ovos, sendo estes dissociados mecanicamente com a ajuda de um pincel nº 0. A suspensão de ovos obtida foi transferida, assepticamente, para um tubo de ensaio contendo 20 ml de solução de glutaraldeído 2%, ativada pela elevação do pH para 8,0-8,2 através da adição de bicarbonato de sódio 0,4% e fosfato de sódio monobásico 0,05%. Transcorridos 15 minutos de contato, o conteúdo do tubo foi filtrado através de um disco de papel filtro Whatman 0,8 µm de espessura e com 2 cm de diâmetro colocado em um suporte plástico estéril (copo monitor Bactor Estéril 100ml), tendo por apoio um kitasato. Imediatamente após a filtração, o papel de filtro foi rinsado com 30 mL de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) para neutralização de qualquer resíduo de glutaraldeído que pudesse ter efeito tóxico sobre os ovos. Em condições assépticas, os ovos foram transferidos para a superfície de uma gaze umedecida com solução

salina estéril 0,9% e colocados em placas de Petri. Ao final do processo, essas foram lacradas com filme plástico de PVC e colocadas em câmara climatizada regulada a 30°C/dia e 28°C/noite, com 60±10% de umidade relativa do ar e 12 horas de fotofase (início às 6 horas), para observação da eclosão e viabilidade das larvas.

A viabilidade foi avaliada transferindo-se quarenta (40) neolarvas de *C. putoria* das placas de Petri com gazes umedecidas para 0,100g de proteína (moela de frango) que serviu como fonte alimentar para as larvas, intencionando assim, avaliar a viabilidade e o desenvolvimento dos insetos nos períodos de tempo de 12, 24, 48 e 72 horas após a esterilização .

Para o teste de esterilidade, cerca de 10% da massa dos ovos, tratada com glutaraldeído, foi retirada da superfície do papel de filtro, com auxílio de um pincel estéril e transferidas para tubos de ensaio contendo 10 mL de TSB e Caldo Tioglicolato Fluído (FTM), sendo estes incubados, respectivamente, a 22,5°C e 35,0°C por 14 dias. Após o período de incubação os tubos foram inspecionados visualmente quanto a indícios de crescimento bacteriano. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo o manuseio dos materiais feito em Cabine de Segurança Biológica tipo Classe II (Figura 1).

Para a análise estatística foram utilizados os programas BioStat 5.3 (<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>), análise de variância seguida de pós teste Tukey a 5% de significância.



Figura 1: Sequência do processo de esterilização: a) Massa de ovos em dieta proteica moela de frango; b) Massa de ovos transferida assepticamente para placa de Petri para ser pesada e dividida em triplicata para dissociação; c) Copo de filtro monitor Bacter Estéril e papel filtro com massas de ovos esterilizadas, d) Amostra de massa de ovos esterilizados transferidos para tubo de ensaio contendo 10ml FTM para o teste de esterilidade; e) Larvas eclodidas após 12 horas e transferidas para dieta moela de frango; f) Larvas com desenvolvimento normal.

Resultados

O processo de esterilização pelo agente químico Glutaraldeído 2%, não impediu a eclosão das larvas da espécie testada. Quanto a viabilidade e desenvolvimento dessas (Tabela 1), verificou-se que a viabilidade larval e total foram significativamente inferiores no período de tempo de 72h (T4) em relação aos demais tratamentos (controle, T1, T2, T3). Não foi

observada diferença significativa para o estágio pupal entre os tratamentos. Embora as viabilidades larval e total tenham sido menores no período de tempo de 72 horas, essas atingiram índices próximos de 70 e 50%, respectivamente, sendo considerados satisfatórios.

A transferência das larvas com 12, 24, 48 e 72 horas de vida para a dieta larval permitiu o desenvolvimento dos insetos até a formação de pupas e emergência das formas adultas sem nenhuma anormalidade.

A esterilidade microbiológica do Glutaraldeído foi comprovada pelo teste de esterilidade farmacopeico, comprovando deste modo, a qualidade das larvas, assim como maior confiabilidade no agente testado para este procedimento.

Tabela I. Viabilidade média dos estágios larval, pupal e total de *Chrysomya putoria* transferidas para dieta moela de frango após 12, 24, 48 e 72 horas (T1, T2, T3, T4 respectivamente) após a eclosão das larvas esterilizadas e Controle sem esterilização)

Tratamento (h)	Viabilidades*		
	Larval %	Pupal %	Total %
Controle	95,0a	98,0a	92,5a
T1 (12)	95,0a	95,0a	90,0a
T2 (24)	96,0a	90,0a	91,0a
T3 (48)	95,0a	80,0a	75,2a
T4 (72)	69,0b	66,0a	46,6b

* 40 larvas/dieta/três repetições

**Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativa pela Análise de Variância, seguida de teste Tukey a 5% de significância.

Discussão

Vários agentes antimicrobianos já foram utilizados na esterilização de ovos de moscas visando sua utilização em bioterapia (Tabela 2). Dentre estes, o mais utilizado é o hipoclorito de sódio, isoladamente ou associado ao ácido bórico (Líquido de Dakin).

Varzin et al., (2005) testaram oito agentes esterilizantes, em concentrações e tempos diferenciados. As análises do teste de esterilidade com Plate Count Agar (PCA) demonstraram que somente três dos agentes testados, dentre os oito selecionados, não continham crescimento bacteriano, entre estes, Formaldeído, Farmasept- plus® e hipoclorito de sódio 0,5%, no entanto, as viabilidades das larvas foram pouco acima de 50% com os químicos testados.

Nitsche et al., (2010), para esterilizar ovos de *C. megacephala* e *C. putoria*, utilizando grupos de 60 ovos, divididos em três grupos de 20 ovos para cada espécie, empregaram soluções de hipoclorito de sódio 0,5% e 1,0%. Para atestarem a esterilidade das larvas, empregaram técnica parecida com a de Varzin et al., (2005), onde, após esterilizar os ovos, utilizaram PCA e Agar sangue, não encontrando em suas amostras, segundo a autora, contaminação.

No atual trabalho, procurou-se esterilizar grandes demandas de ovos de moscas para utilização em bioterapia, visando atender às necessidades hospitalares. Sherman et al., (2000) sugeriram que o ideal seria utilizar 10 larvas /cm² de superfície necrótica. Geralmente, feridas consideradas pequenas podem receber a aplicação de até 200 larvas, ao passo que grandes feridas receberiam a aplicação de até 1000 larvas para um desbridamento eficaz, portanto, é o profissional quem deve fazer uma avaliação da extensão da ferida para determinar o número aproximado de larvas que deverá utilizar (Muncuoglu et al., 1999; Jarvis, 2000).

Testes preliminares de esterilização de ovos de *Cryomya albiceps* utilizando o Hipoclorito de Sódio 0,5 e 1%, foram desenvolvidos em diferentes tempos de exposição, para esterilizar 0,600g de massa de ovos, divididas em três grupos de 0,200g. No entanto, ao se fazer os testes de esterilidade de acordo com protocolo farmacopeico, os resultados não foram satisfatórios, verificando-se a presença de contaminação nos tubos de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) e Caldo Tioglicolato Fluído (FTM) com cerca de 10% de massa de ovos previamente esterilizadas. O referido resultado serviu de base para descontinuar o uso do Hipoclorito de Sódio no presente estudo e, buscar como substância esterilizante alternativa, Glutaraldeído 2% (Dallavecchia et al., 2010).

Paulino (1999) refere que o glutaraldeído é um agente químico que apresenta desvantagem devido a alta mortalidade dos insetos quando utilizado na desinfecção de ovos, porém, no presente estudo este fato não ocorreu. Sugere-se que isto possa estar relacionado com a rinsagem dos ovos com um produto neutralizador da toxicidade do agente químico testado.

Larvas estéreis estão sendo produzidas e comercializadas por empresas no Reino Unido, Alemanha, bem como por laboratórios nos EUA, Israel, Suécia, Suíça, Áustria e Ucrânia (Muncuoglu et al., 2001)

Atualmente, estima-se que mais de 3.000 médicos, clínicas e hospitais em mais de 24 países se utilizem dos benefícios desse tratamento (Figura 2). Em 2008, aproximadamente 50.000 tratamentos foram administrados em mais de 10.000 pacientes (Bter Foundation , 2009) .

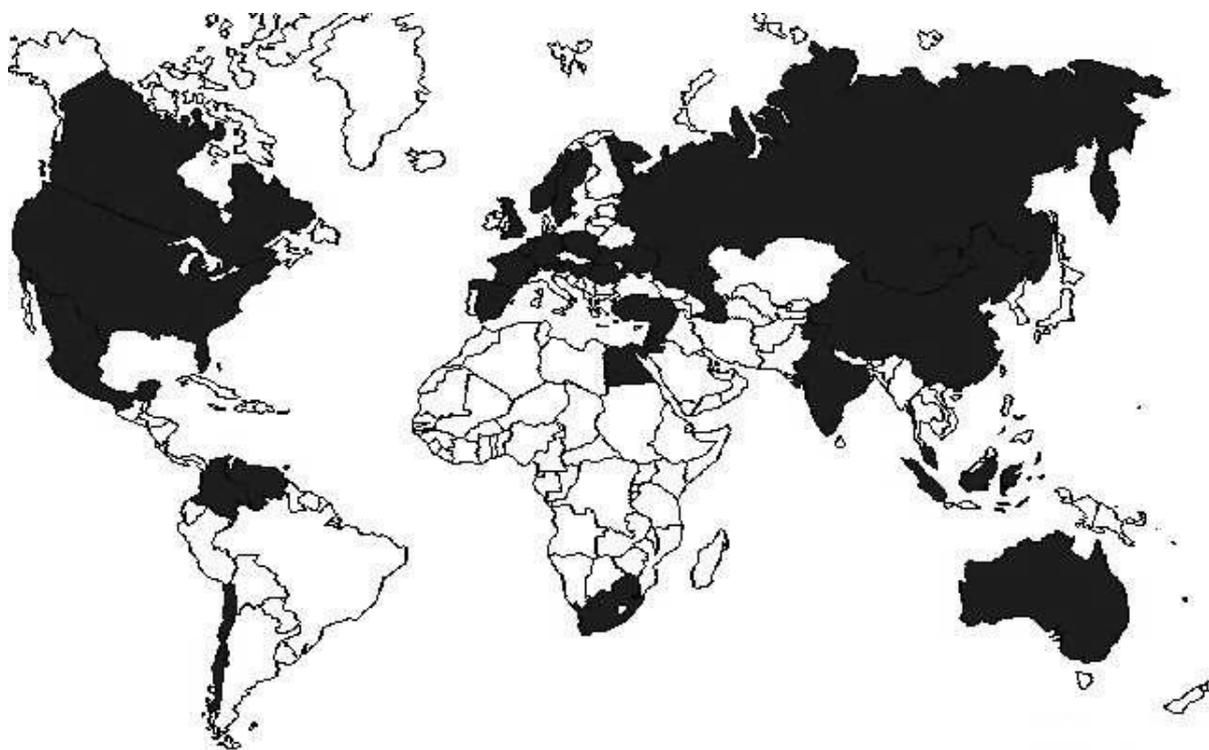


Figura 2. Mapa Mundi ilustrando os países onde a bioterapia é utilizada atualmente: EUA, Canadá, México, Venezuela, Colômbia, Chile, Noruega, Reino Unido, Israel, Alemanha, Suécia, Áustria, Hungria, Suíça, Bélgica, Ucrânia, Austrália, Tailândia, Turquia, China, Rússia, França, Espanha, Indonésia, Egito, África do Sul, Índia, Polônia, Estônia, Eslováquia e Bélgica (Dallavecchia et al. 2011).

No Brasil, ainda há poucos estudos sobre a bioterapia e esterilização de larvas, ainda que esta seja uma técnica muito antiga e utilizada em diversos países.

Bioterapia traz inúmeros benefícios ao tratamento de feridas em clientes diabéticos podendo contribuir para minimizar indiretamente os danos causados por esta doença, além disso, seus efeitos sobre as feridas já foi comprovado por inúmeros estudos (Muncuoglu et al., 1999; Sherman, 2000; Contreras et al., 2005; Figueroa et al., 2006) e sua eficácia, comparada a outras técnicas de desbridamento é a mais eficaz.

Tabela II: Esterilizantes e suas concentrações utilizados em dípteros para esterilização da superfície dos ovos de dípteros.

Família	Espécie	Esterilizante / concentração	Referência / País
Calliphoridae	<i>Phormia Regina</i> (Meigen, 1826)	Cloreto de mercúrio (1:1000), álcool etílico 25%, ácido clorídrico 0,5%	Willian Baer, (1931) /EUA
		Formol 10% e cloreto de sódio 0,85%	Fine, A. & Alexander H. (1934) / EUA
	<i>Chrysomya Putoria</i> (Wiedemann, 1818)	Hipoclorito de sódio 0.5%, Formaldeído 1%, Farmasept- plus® 1:4000	Varzim, et al., (2005) / Brasil
	<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)	Glutaraldeído 2% e Tween 20 5mL	Dallavecchia et al., (2010) /Brasil
	<i>Lucilia caesar</i> (Linnaeus, 1758)	Cloreto de mercúrio (1:1000), álcool etílico 25% ácido Clorídrico 0,5%	Baer W. (1931) /EUA
	<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1826)	Formalina 5% e Hidróxido de sódio 1%	Simmons, (1934) /EUA
		Sulfito de sódio 2,5% e Formaldeído 2,5%	Mumcuoglu et al., (1999) /Israel
		Ortophtaldeído / (não especificado)	Contreras et al., (2005) /México
		Hipoclorito de sódio 0,5% e Formalina 10%	Figueroa et al., (2006) /Chile
		Ácido acético e estreptomina.	Kocisova et al., (2006) /Eslovaquia
Fenol 3% ou Hipoclorito de sódio 0,5%		Sherman et al., (2007) / EUA	
<i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann, 1830)	Raios ultra-violetas (UVC); álcool 70% e clorexidina.	Mohd et al., (2005) / Malásia	
Muscidae	<i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758)	Formol 10% e Cloreto de sódio 0,85%	Fine & Alexander, 1934 /(EUA)

A cada 30 segundos, uma pessoa tem um membro amputado devido a complicações relacionadas ao diabetes, este fato acarreta inúmeros problemas socioeconômicos e culturais e está diretamente relacionado com a má qualidade de vida destes clientes e com os gastos exacerbados do governo em tratamentos, internações e subsídios, já que a maioria destes utentes não consegue manter-se trabalhando, além dos problemas psicológicos que uma amputação gera não só ao amputado, mas a sua família (International Diabetes Federation, 2005).

Glutaraldeído a 2% mostrou-se eficaz na esterilização de volumes maiores de massa de ovos (0,600g) e a toxicidade atribuída ao agente esterilizante, sendo considerado por Paulino (1999) como inviável devido as altas taxas de mortalidade das larvas pôde ser evitado ao se rinsar os ovos esterilizados com um agente neutralizador.

O teste de esterilidade, segundo as normas da ANVISA é indispensável para garantir a qualidade do produto, assim como para a segurança do cliente final. Estudos e investimentos precisam ser realizados e analisados no sentido de ampliar a produção das larvas e disponibilizá-las para uso do cliente portador de feridas de difícil cicatrização.

No presente trabalho o Glutaraldeído 2% mostrou-se eficaz para a esterilização dos ovos, não prejudicando a eclosão das larvas, tampouco a viabilidade larval, pupal. e total.

Referências

- Anvisa. 2007. Glutaraldeído em estabelecimentos de assistência à saúde: Fundamentos para a utilização. Gomes SM, Verotti M, Melo JR, Santi L.
- Baer WS. 1931. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *The Journal of Bone & Joint Surgery* 13:438–75
- Barbosa LS, Couri MS and Coelho VMA.2010. Performance of the parasitoid *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae) using as host *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) under different exposition times. *Revista Brasileira de Entomologia* 54(1):125-129.
- Barbosa LS, Jesus DML, Aguiar-Coelho VM. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794)(Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociencias* 6: 207-217.
- Brasil. 2010. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1, 5ª Edição, Brasília.
- Bter Foundation. 2009. Biotherapeutics Education & Research Foundation. Available online: <http://www.bterfoundation.org/indexfiles/references.htm>
- Cazander G, Van Veen KEB, Bernards AT, Jukema GN. 2009. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *Journal of Tissue Viability* 18: 80-87
- Cazander G, van de Veerdonk MC, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Schreurs MWJ, and Jukema GN. 2010. Maggot Excretions Inhibit Biofilm Formation on Biomaterials. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 468(10): 2789–2796.
- Contreras RJ, Suarez AF, Orantes MK ,Mares MLE, Cherit DJ. 2005. Larval Debridement Therapy in México. *Wound care Canada* 3(1):42-46
- Dallavecchia DL, Silva Filho RG, Figueiredo NMA, Aguiar-Coelho VM. 2010. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius,1794) para utilização em biodesbridamento. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental (Online)* In: 120 anos da Escola de Enfermagem Alfredo Pinto (EEAP/UNIRIO). 1-4.
- Dallavecchia DL, Silva Filho RG, Aguiar-Coelho VM. 2011. Esterilização da Superfície dos Ovos de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1830), para Utilização em Bioterapia. In: XXII Congresso Brasileiro de Parasitologia, Minas gerais.

- Dallavecchia DL, Proença, B, Aguiar-Coelho VM. 2011. Biotherapy: an efficient alternative for the treatment of skin lesions. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental (Online)* 3(3):2971-2079.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ. & Linhares AX. 2009. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207,
- Ferraz ACP, Proença B, Gadelha BQ, Faria LM, Barbalho MGM, Aguiar-Coelho VM, Lessa, CSS. 2010. First Record of Human Myiasis Caused by Association of the Species (Diptera: Calliphoridae), (Diptera: Sarcophagidae) and (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 47(3): 487-490.
- Ferraz ACP, Almeida VRG de, Jesus, DM de, Rotatori GN, Nunes R, Proença B, Aguiar-Coelho VM, Lessa CSS. 2011 . Epidemiological study of myiasis in the Hospital of the Andaraí, Rio de Janeiro, including reference to an exotic etiological agent. *Neotropical Entomology (Impresso)* 40:393-397.
- Ferraz ACP, Dallavecchia DL, da Silva DC, Carvalho RP, Silva Filho RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science* 12:37
- Figuroa L, Uherek F, Yusef P, López L, Flores J. 2006. Maggot therapy in patients with chronic skin ulcers. *Parasitologia Latino Americana* 61:160-164.
- Fine A, Alexander H.1934. Maggot therapy: technique and clinical application. *The Journal of Bone & Joint Surgery* 16:572–82
- Gadelha BQ, Ferraz ACP, Aguiar-Coelho VM. 2009. A Importância dos Mesembrinélneos (Díptera: Calliphoridae) e seu potencial como indicadores de preservação ambiental. *Oecologia Brasiliensis* 13(4):661-665
- Horobin, AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. 2006. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *Jornal of Investigative Dermatology* 126(6):1410–8.
- Jarvis A. 2000. Maggots in orthopaedics: past, present and future. *Fifth International Conference on Biotherapy*, Wurzburg, 11-2.
- Kocisova A, Pistl J, Link R & Goldová CM. 2006. Maggot Debridement Therapy in the Treatment of Footrot na Foot Scald in Sheep. 2006. *Acta Veterinaria Brno* 75:277-281

- Mello RS, Queiroz MMC & Aguiar-Coelho VM. 2007. Population fluctuations of calliphorids species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia - Série Zoológica* 97(4): 1–5.
- Mello RS, Aguiar-Coelho VM. 2009. Durations of immature stage development period of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. *Parasitology Research* 104(2): 411-418
- Mohd MS, Nazni WA, Lee HL, T Rogayah TAR. and Subramaniam, S. 2005. Sterilisation of *Lucilia cuprina*, Wiedemann maggots used in therapy of intractable wounds. *Tropical Biomedicine* 22(2): 185–189
- Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedman R, Schulman H, Bichucher H, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Raz I.1999. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *International Journal of Dermatology* 38(8):623-7.
- Mumcuoglu, KY, J Miller, M Mumcuoglu, M Friger and M Tarshis. 2001. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera : Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 38:161-166.
- Nitsche MJT. 2010. Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, Brasil.
- Paulino CA. 1999. Anti - sépticos e desinfetantes. In: Spinosa HS, Gorniak SL, Bernardi MM. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 2.ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil.
- Sánchez MC, Chuairé L, Narváez R, Segura NA.2004. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. La terapia larval. *Revista Ciencias de la Salud* 2(2):156-64.
- Sherman RA, Hall MJ & Thomas S. 2000. Medicinal 418 maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology* 45: 55-81.
- Sherman RA, Morrisson S, NG D.2007. Maggot debridement therapy for serious horse wounds – A survey of practitioners. *The Veterinary Journal* 174:89-91.
- 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* 3(2):336-344

- Simmons SW.1934. Sterilization of blowfly eggs in the culture of surgical maggots for use in the treatment of pyogenic infections. *The American Journal of Surgery New Series* 25 (1): 140-147
- Van Der Plas MJA, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HCM, Lagendijk EL, Gulpen Cy, van Dissel JT, Bloemberg GV and Nibbering PH.2008. Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 117–122.
- Van Der Plas MJA, Baldry M, Van Dissel JT, Jukema GN & Nibbering PH. 2009. Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia* 52:1962–1970.
- Van Der Plas MJA, Dambrot C, Dogterom-Ballering HCM, Kruithof S, van Dissel JT and Nibbering PH. 2010. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 65: 917–923.
- Varzim LSBF. 2007. Esterilização de ovos de moscas varejeiras *Chrysomya putoria* (Wedermann, 1830), (Diptera calliphoridae) para utilização em bioterapia. Dissertação de Mestrado, Departamento de parasitologia, UNICAMP, São Paulo, Brasil.
- Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhang J, Decheng LV. 2010. Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids in Health and Disease* 9(24):2-9.
- WHO - International Diabetics Federation. 2005. Position Statement - The diabetic foot. IDF. Available online: <http://www.idf.org/position-statement-diabetic-foot>

**CAPÍTULO IV – COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE *Chrysomya putoria*
(WIEDEMANN, 1818): APÓS ESTERILIZAÇÃO, TESTE DE ESTERILIDADE E
REFRIGERAÇÃO: UMA LOGÍSTICA PARA BIOTERAPIA NO BRASIL**

Comportamento Biológico de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818): após Esterilização, Teste de Esterilidade e refrigeração – uma Logística para Utilização de Bioterapia no Brasil

RESUMO

O presente trabalho procurou avaliar o desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae) após processo químico de esterilização e físico de refrigeração. As larvas, após serem esterilizadas necessitam de logística para chegar ao cliente final. Foram realizados quatro tratamentos: controle (sem esterilização), T1, T2, T3 e T4 (12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente). Após o processo químico de esterilização, cada tratamento, em triplicata foi inserido em placa de Petri contendo gaze umedecida e inserido no refrigerador a uma temperatura média entre 3,5°C e 8°C até o período pré-estabelecido, seguindo o mesmo procedimento em todos os tratamentos. Após retirar as respectivas placas de Petri do refrigerador, 40 neolarvas foram transferidas para 50 g de dieta e acomodadas em câmara climatizada regulada a 30°C/dia e 28°C/noite, com 60±10% de umidade relativa do ar e 12 horas de fotofase (início às 6 horas), para observação da eclosão das larvas e viabilidade. O mesmo processo foi repetido para todos os outros tratamentos. A duração média do período de larva a adulto foi 8,11 dias para o controle; 8,10 dias para T1; 7,72 dias para T2; 7,68 dias para T3 e 9,13 dias para T4. As viabilidades larvais foram 95%, 95%, 96%, 95% e 69%, respectivamente, apontando diferença significativa na viabilidade larval em T4 (69%) em relação aos demais tratamentos; as viabilidades de pupa foram 98%, 95%, 90%, 80% e 66%, respectivamente e as viabilidades totais foram 92,5%, 90%, 91%, 75,2% e 46,6% respectivamente. Houve diferença significativa em T4 (46,6%) na duração do período total entre os tratamentos testados.

PALAVRAS-CHAVE: Armazenamento, bioterapia, larvas estéreis, refrigeração, viabilidade

INTRODUÇÃO

Bioterapia consiste na aplicação de larvas vivas, previamente esterilizadas, de moscas necrobiontófogas (Diptera: Calliphoridae) em feridas desvitalizadas, com o objetivo de remover o material necrosado e promover o crescimento de novos tecidos. Muitos médicos e cirurgiões têm dado preferência em utilizar essa terapia alternativa, principalmente nos casos de feridas de difícil cicatrização ou infectadas com bactérias resistentes. Atualmente sabe-se, através de estudos clínicos e laboratoriais, de cinco ações benéficas da bioterapia sobre as lesões: desbridamento do tecido necrosado, descontaminação microbiana, estímulo ao tecido de granulação e ação anti-inflamatória. Além de atuação sobre o biofilme bacteriano, bem como maior segurança e facilidade na aplicação (Sherman, 2009).

As feridas que acometem a derme podem afetar a fisiologia da pele. O processo de cicatrização com a finalidade de cura das feridas pode ser dividido, de modo simplificado, em três fases que se superpõem: inflamatória, proliferativa e de remodelação. Durante a primeira fase, ocorre o processo de hemostasia, migração de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual, a segunda fase se caracteriza por fibroplasia, angiogênese e reepitelização do tecido lesionado, iniciando a cicatrização, esta é tida como a fase de proliferação, já a terceira e última fase do processo de cicatrização é responsável pelo aumento da resistência do leito danificado. Os fenômenos descritos de forma resumida referem-se ao processo de cicatrização fisiológica, este mesmo processo pode ter a resposta do organismo diminuída nos casos onde há uma patologia associada como diabetes melito e/ou na exposição excessiva à radiação, entre outros, formando-se, assim, úlceras que traduzem a falta de cicatrização (Isaac et al., 2010).

Desbridamento é a remoção de tecido desvitalizado, partículas, ou materiais estranhos de uma ferida infectada. Por vezes, é a única forma de tratamento da ferida, já que o preparo do leito de uma ferida consiste na retirada de tecidos necrosados, com infecção e/ou biofilme bacteriano, expondo, deste modo, o tecido saudável. Sendo assim, precisa deixar de ser visto isoladamente, para ser considerado como elemento fundamental no alcance da cicatrização (Fowler & Van Rijswijk, 1995)

A principal razão para o desbridamento de feridas desvitalizadas é o fato de o tecido necrosado servir como substrato para o crescimento de bactérias, além do processo de inflamação em curso e infiltração de leucócitos, retardando as fases proliferativas e de remodelação da cicatrização, também compromete a restauração da estrutura e função da pele

podendo progredir para amputação do membro ou, em alguns casos, óbito do utente (Finn & Bo JOrgensen, 1996).

Chrysomya putoria (Wiedmann 1818) é um díptero que apresenta comportamento necrobiontófago, também se trata de uma espécie em abundância no Brasil, principalmente nos centros urbanos (Marinho et al., 2003), permitindo livre acesso aos seus exemplares para o estabelecimento de colônia em laboratório. O conhecimento e domínio das técnicas de criação, a elevada capacidade reprodutiva das fêmeas com oviposição de grande quantidade de massa de ovos, facilita o processo de esterilização e, conseqüentemente, armazenamento em baixa temperatura e fornecimento de suas larvas para utilização ambulatorial e/ou hospitalar para bioterapia (Dallavecchia et al., 2010, Ferraz et al., 2012).

No Brasil, ainda há poucos estudos sobre a bioterapia e esterilização de larvas, ainda que essa seja uma técnica muito antiga e utilizada em diversos países.

Segundo o International Diabetes Federation (2005), a cada 30 segundos, uma pessoa tem um membro amputado devido a complicações relacionadas ao diabetes, este fato acarreta inúmeros problemas socioeconômicos e culturais e está diretamente relacionado com a má qualidade de vida destes pacientes e com os gastos exacerbados do governo com tratamentos, internações e subsídios, já que a maioria destes pacientes não consegue manter-se trabalhando, além dos problemas psicológicos que uma amputação gera não só ao amputado, mas a sua família. Os inúmeros benefícios da Bioterapia no tratamento de feridas de pacientes com diabetes e outras feridas consideradas de difícil cicatrização, foram comprovados por vários estudiosos sobre o assunto (Muncuoglu et al., 1999, Sherman, 2000, Contreras et al., 2005, Figueroa et al., 2006) e sua utilização tem contribuído para minimizar indiretamente os danos causados aos portadores de feridas.

Objetivou-se estudar a tolerância de larvas de *C. putoria* à baixa temperatura e o tempo que se mantêm viáveis em refrigerador, isto é, em situações adversas. Este estudo é importante para se estabelecer uma metodologia de conservação das larvas, de modo que se mantenha viável e possa ser transportado até hospitais / clientes que necessitem da bioterapia.

Material e Métodos

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

A esterilização das massas de ovos foi realizada com o Glutaraldeído, um esterilizante líquido comumente utilizado na esterilização de materiais de uso hospitalar. Este agente possui ação rápida e eficaz sobre bactérias, Gram-positivas e negativas, micobactérias, fungos e vírus (Brasil, 2007). Na avaliação da eficácia do procedimento de esterilização foi utilizado teste de esterilidade microbiológica, por adição em meio líquido, com base no método de inoculação direta descrito na farmacopeia brasileira (Brasil, 2010).

Após as larvas serem esterilizadas conforme modelo apresentado por Dallavecchia et al., (2010), placas de Petri com gaze umedecidas em soro estéril contendo papel filtro com 0,200g de ovos esterilizados, foram transferidos para um refrigerador contendo termohigrógrafo. Foram avaliados os seguintes períodos de tempo em refrigeração: T1: 12h, T2: 24 h, T3: 48 h, T4: 72 h e o controle que utilizaram-se larvas sem esterilização e refrigeração, em triplicata (Figura 1).

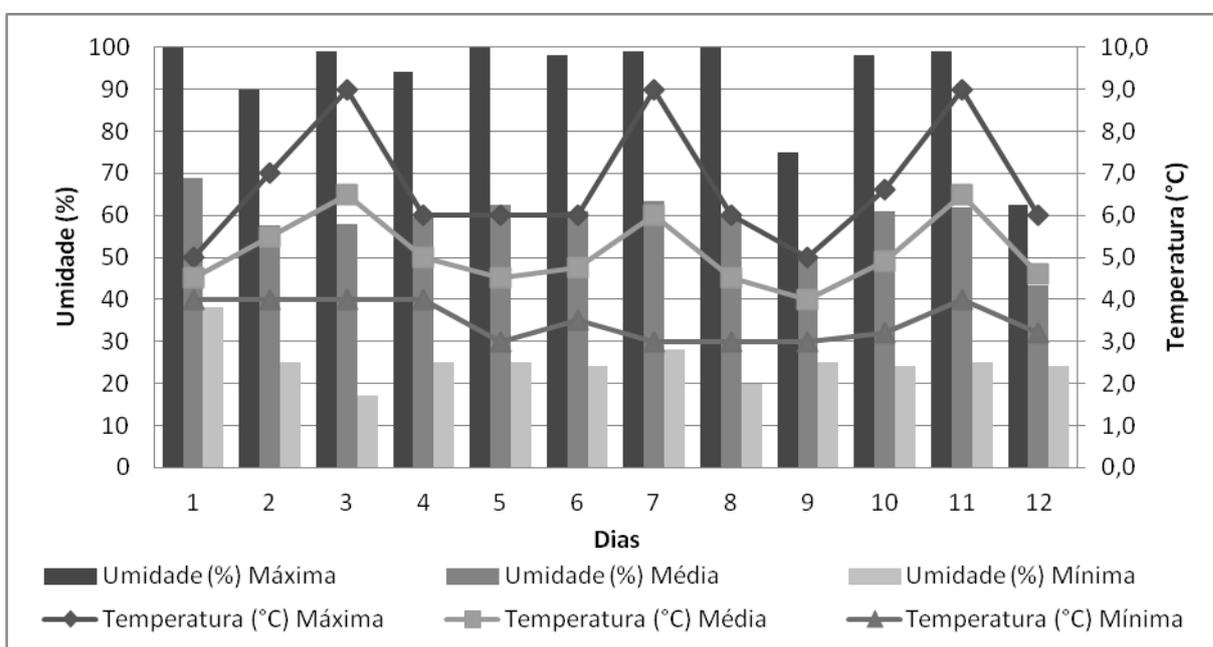


Figura 1: Variação de temperatura registrada foi 3,5°C/Mín e 6,6°C/Máx. e Umidade Relativa do Ar 95±25% durante os dias de experimentação registrados no interior do refrigerador .

Após o tempo predeterminado para cada tratamento, as placas foram retiradas do refrigerador, em triplicata e 40 neolarvas foram aleatoriamente selecionadas e transferidas para 0,50g de moela de frango acondicionadas em becker de 100 mL e esses foram inseridos em beckers maiores de 500mL com maravalha esterilizada servindo de substrato para pupariação. Os recipientes foram devidamente lacrados com tecido de náilon e identificados. O controle consistiu em utilizar 40 neolarvas não esterilizadas e não expostas a baixa

temperatura. Todos os tratamentos foram transferidos para câmara climatizada regulada a 30°C/dia e 28°C/noite, com 60±10% de umidade relativa do ar e 12 horas de fotofase (início às 6 horas), para observação da eclosão e viabilidade das larvas.

Após o abandono das larvas, lotes de cinco larvas em 3º íntar foram pesadas em balança semi-analítica e transferidas para tubos de ensaio contendo 2g de maravalha esteril, esses foram vedados e identificados. A observação fez-se diária até a emergência dos insetos. O objetivo desta série de procedimentos foi estabelecer uma logística para produção, armazenamento, conservação e transporte das larvas em 1º íntar.

Durante a observação foram analisados parâmetros biológicos como eclosão e viabilidade das larvas, massa corporal, desenvolvimento larval, pupal e total, assim como a razão sexual. A razão sexual foi calculada pela seguinte fórmula $F / F+M$, onde F é fêmea e M, macho. Para a análise estatística foram utilizados os programas BioStat 5.3 (<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>), análise de variância seguida de pós teste Tukey a 5% de significância (Figura 2).

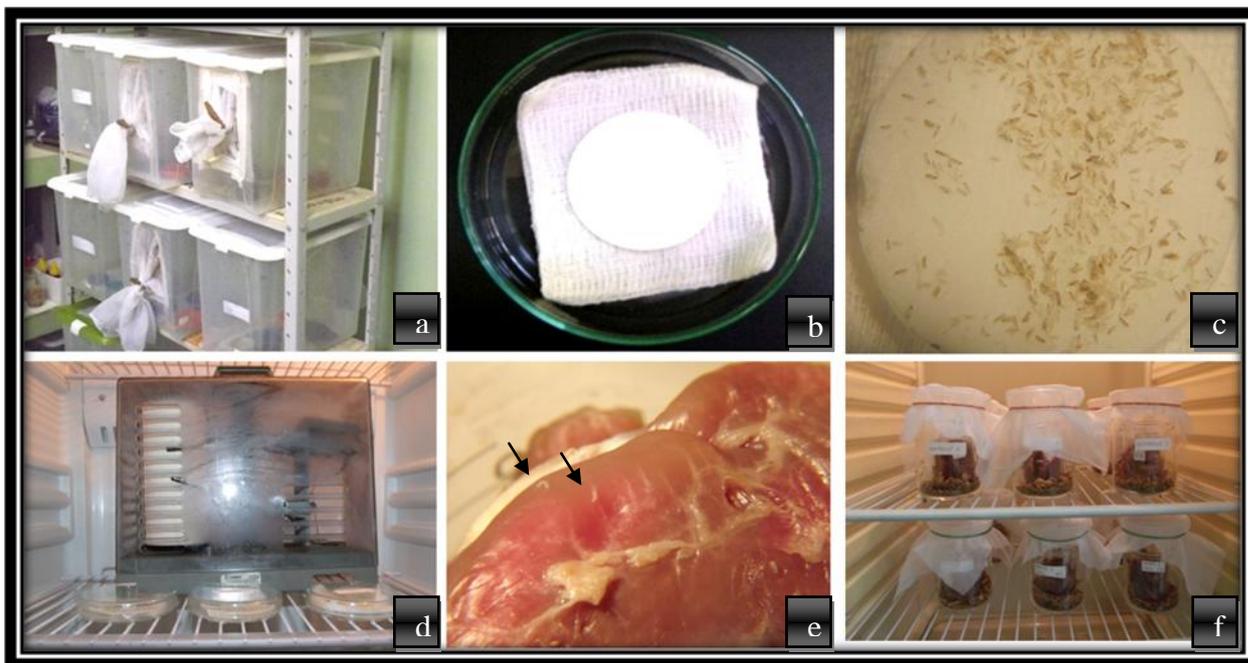


Figura 2: a) Gaiola de criação dos dípteros; b) Placa de Petri com papel filtro e gaze para receber ovos esterilizados e para transporte até o cliente; c) Massa de ovos esterilizados com larvas eclodindo; d) Termohigrógrafo em refrigerador e placas de Petri com larvas estéreis há 72 horas; e) Larvas em 1º íntar viáveis transferidas para dieta após 72 horas e f) Beckers com dieta 40 neolarvas em câmara climatizada para desenvolvimento das larvas.

RESULTADOS E DISCUSÃO

A média da massa corporal individual das larvas em 3º íntar, não apresentou diferença significativa entre os tratamentos e o controle ($p=0,5346$) (Tabela 1).

Quanto a duração de desenvolvimento do estágio larval houve diferença significativa entre os tratamentos ($p=0,0000113$). O tratamento 4 foi significativamente mais prolongado que os demais tratamentos e o controle ($p < 0,01$). No entanto, não foi observada diferença significativa em relação a duração do estágio pupal ($p=0,1850$). O desenvolvimento do estágio total foi significativamente maior em T4, ($p=0,0046356$). Entre o controle e T4; T1 e T4 obteve-se ($p < 0,05$); entre T2 e T4; T3 e T4 ($p < 0,01$), ou seja, foi extremamente significativo.

Tabela I. Massa corporal (mg) e duração em dias do estágio de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* oriundas de dieta moela de frango nos tratamentos (T1-12h, T2-24h, T3-48h, T4-48h após a esterilização e refrigeração, Controle- larvas sem esterilização) (T. 30°C dia/28°C noite, 60± 10% UR, 12 h de fotofase).

Massa corporal e duração dos estágios em dias				
Tratamento	Massa (mg)	Larva	Pupa	Adulto
	X ± ds	X ± ds	X ± ds	X ± ds
Controle	0,0522a ± 0,005	5,02a ± 0,040	3,08a ± 0,096	8,11a ± 0,100
T1 (12h)	0,0565a ± 0,003	4,01a ± 0,003	3,30a ± 0,310	8,10a ± 0,086
T2 (24h)	0,0536a ± 0	5,00a ± 0	3,13a ± 0,035	7,72a ± 0,028
T3 (48h)	0,0569a ± 0,003	5,00a ± 0	3,02a ± 0,046	7,68a ± 0,548
T4 (72h)	0,0537a ± 0,002	6,15b ± 0,160	3,00a ± 0	9,13b ± 0,115

X= média, ds=desvio padrão

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativa pela Análise de Variância, seguida de teste Tukey a 5% de significância.

A duração média do período de larva a adulto foi 8,11 dias para o controle; 8,10 dias para T1; 7,72 dias para T2; 7,68 dias para T3 e 9,13 dias para T4. Estes resultados mostraram-se similares aos de Ferraz et al., (2012) avaliando o desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria*, em uma média de temperatura de 20,6°C e Umidade Relativa do Ar média de 67,7%, onde observaram uma duração média total de 8,88 dias para o insetos criados em carne bovina; 8,68 dias para os criados em moela de frango e 9,07 dias para uma dieta a base de

Agar-Moela, o que demonstra que o processo de esterilização e os dias de inanição das larvas o seu ciclo biológico.

Observou-se diferença significativa entre as viabilidades larvais ($p = 0.0028$), sendo constatado índice significativamente inferior em T4 comparado com os demais tratamentos ($p < 0.01$) (Tabela 2). Como supracitado, essa diferença provavelmente deve-se ao fato de as larvas permanecerem até 72 horas, após processo químico de esterilização, sem oferecimento de alimentação (inanição) e em refrigeração (média de 3,5°C Mín. e 6,6 Máx.). Ainda assim, um percentual de 69,0% das larvas conseguiram adaptar-se a situação de grande estresse.

A viabilidade pupal não apresentou diferença significativa ($p = 0.0634$), de modo contrário, a viabilidade total apresentou diferença significativa ($p = 0.0107$). No entanto, o controle diferiu significativamente do T4 ($p < 0,05$); T4 diferiu do T1 ($p < 0,05$) e do T2 ($p < 0,05$).

A viabilidade das larvas de *C. putoria* é de suma importância para se ter sucesso em bioterapia, visto que estes insetos necessitam passar por diversas etapas antes de sua aplicação: dissociação dos ovos (perturbação mecânica), esterilização (contato com produto químico), rinsagem, filtragem e armazenamento em baixa temperatura (estresse físico) (médias: 6°C máx./3,5°C mín.) por até 72 horas. Todas as etapas a que o inseto foi submetido foram necessárias para observar a resistência do mesmo às adversidades (Tabela 2).

Tabela II. Viabilidade média dos estágios larval, pupal e total de *Chrysomya putoria* criados, em moela de frango nos tratamentos nos tratamentos (T1-12h, T2-24h, T3-48h, T4-48h após a esterilização e refrigeração, Controle- larvas sem esterilização) (T. 30°C dia/28°C noite, 60± 10% UR, 12 h de fotofase).

Tratamento (h)	Viabilidades*		
	Larval %	Pupal %	Total %
Controle	95,0a	98,0a	92,5a
T1 (12)	95,0a	95,0a	90,0a
T2 (24)	96,0a	90,0a	91,0a
T3 (48)	95,0a	80,0a	75,2a
T4 (72)	69,0b	66,0a	46,6b

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pela Análise de Variância, seguida de teste Tukey a 5% de significância

Como supracitado, nota-se que em todos os tratamentos a viabilidade larval, pupal e a total foram positivas quanto a sobrevivência dos insetos, porém, é a viabilidade total a mais importante para a bioterapia e essa variou de 92,5 a 46,6 % entre os tratamentos. Ou seja, os insetos que menos resistiram, foram os que ficaram mais tempo (cinco dias) em condições adversas. Em alguns trabalhos de autores que utilizam a bioterapia, esses estipulam que o tempo máximo de conservação dos insetos é de 5 dias e em temperatura que varia de 7-8 ° C (Mumcuoglu et al., 1999).

O ritmo de abandono das larvas de *C. putoria* teve seu pico no 4º dia após o início do experimento em todos os tratamentos testados, indicando uma maior homogeneidade no desenvolvimento dos insetos. Apenas o controle (n=8) e T1 (n=17) abandonaram no 3º dia,

Quanto a pupariação, essa teve seu pico no 5º dia após o início do experimento, para todos os tratamentos, com exceção de T4 que teve seu pico no 6º dia. O pico de emergência foi no 8º dia em todos os tratamentos, porém, no T4 a emergência iniciou-se no 9º dia. No entanto, o fato de T4 ter os picos de desenvolvimento diferenciado dos demais tratamentos, não interferiu em seu ciclo biológico, na qual o inseto passou por todas as fases, emergindo com todos os seus espécimes normais (Figura 3). A razão sexual em todos os tratamentos ficaram próximas de 50%, padrão considerado normal (Esser, 1990).

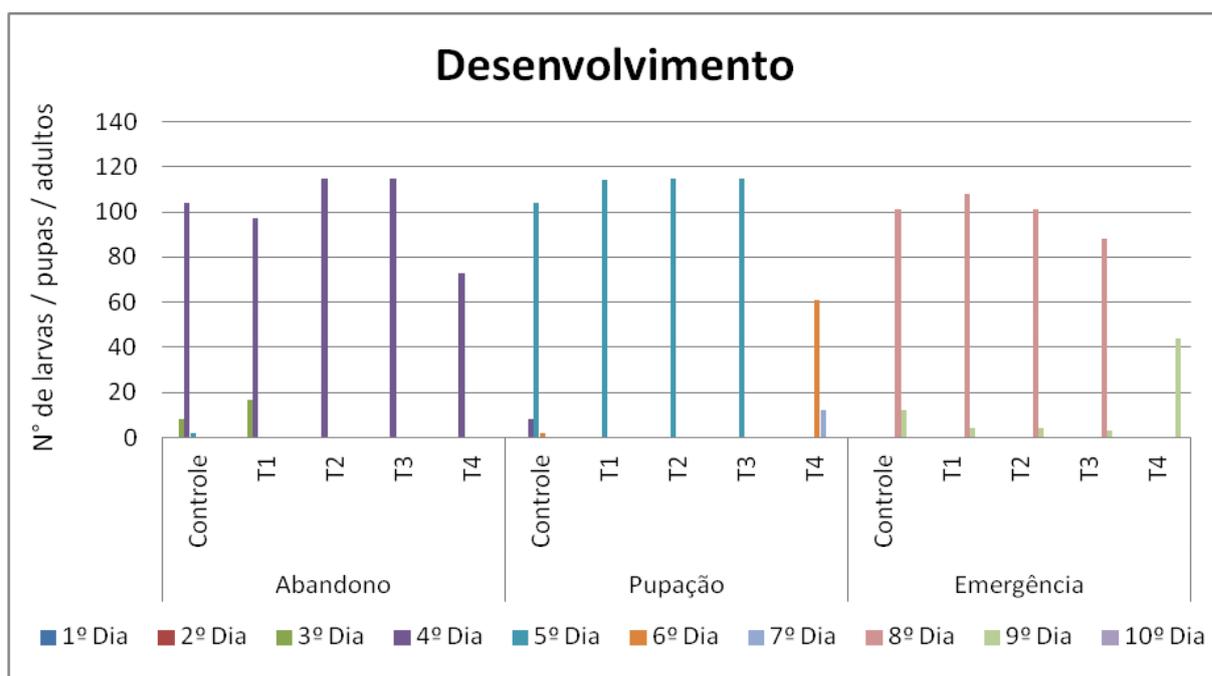


Figura 3: Duração do desenvolvimento larval (neolarvas ao abandono de larvas da dieta), pupariação e emergência dos adultos de *Chrysomya putoria* criados, em moela de frango nos tratamentos (T1-12h em

refrigeração após a esterilização, T2-24h, T3-48h, T4-48h e Controle- larvas sem esterilização) (T= 30°C dia/28°C noite, 60± 10% UR, 12 h de fotofase)

Um fato relevante a ser observado é que todas as larvas mantiveram-se em 1° íntar, até receber alimento proteico. Para a bioterapia, os dípteros devem ser aplicados em 1° íntar, visto que as larvas ficam em média 48 horas na ferida (Sherman et al., 2000).

Este trabalho desenvolveu uma logística que permitiu conservar as larvas terapêuticas até o período máximo de 5 dias em 1° íntar, com viabilidade e sobrevivência satisfatórias, mostrando que a logística praticada durante o procedimento foi eficaz. Esta técnica desenvolvida no Laboratório de Estudos de Dípteros, juntamente com o laboratório de microbiologia, beneficiará centenas de pacientes que sofrem com feridas de difícil cicatrização e que possuem a possibilidade de ter acesso a este tratamento alternativo.

REFERÊNCIAS

- Brasil. 2010. *Farmacopeia Brasileira*, volume 1, 5ª Edição, Brasília
- Contreras RJ, Suarez AF, Orantes MK, Mares MLE, Cherit DJ. 2005. *Larval Debridement Therapy in México*. *Wound care Canada* 3(1):42-46
- Dallavecchia DL, Proença BN, Coelho VMA. Bioterapia: uma alternativa eficiente para o tratamento de lesões cutâneas. 2011. *Revista de pesquisa: O cuidado é fundamental (Online)* 3(3):2071-79
- Dallavecchia LD, Silva Filho GR, Figueiredo AMN & Aguiar-Coelho MV. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. 2010. *Revista de pesquisa: O cuidado é fundamental (Online)* (Ed. supl.1):4
- Esser JR. 1990. Factors influencing oviposition, larval growth and mortality in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), a pest of salted dried fish in south-east Asia. *Bulletin of Entomological Research* 80: 369–376.
- Ferraz ACP, Dallavecchia DL, da Silva DC, Carvalho RP, Silva Filho RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science* 12:37
- Figuerola L, Uherek F, Yusef P, López L, Flores J. 2006. Maggot therapy in patients with chronic skin ulcers. *Parasitologia Latino Americana*. 61: 160-164.
- Finn Gottrup and Bo Jorgensen. 2011. Maggot Debridement: An Alternative Method for Debridement. *Journal Information ePlasty*, v.11
- Fowler E, van Rijswijk L. 1995. Using wound debridement to help achieving the goals of care. *Ostomy Wound Man*, 41(7).(suppl): 23S-36S
- International Diabetics Federation. 2005. Position Statement - The diabetic foot. IDF. Disponível em: <<http://www.idf.org/position-statement-diabetic-foot>> (acesso: 18 jul. 2012)
- Isaac C, Ladeira PRS, Rego FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. 2010. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *Revista de Medicina São Paulo*, 89(3/4):125-31.
- Marinho CR, Azevedo ACG & Coelho VMA. 2003. Diversidade de Califorídeos (Diptera: Calliphoridae) em área urbana, Rio de Janeiro. *Entomologia y Vectores* 10:185-199.
- Mumcuoglu KY, Ingber A, Gilead L, Stessman J, Friedman R, Schulman H, Bichucher H, Ioffe-Uspensky I, Miller J, Galun R, Raz I. 1999. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *International Journal of Dermatology* 38(8):623-7

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* 3:2

2 CONCLUSÕES GERAIS

- A dieta moela de frango foi considerada adequada para criação de *C. megacephala* em laboratório sendo recomendada como uma dieta alternativa à utilização da carne bovina. Os parâmetros biológicos como massa corporal das larvas maduras, duração dos estágios de pré-pupa, pupa total não diferiram significativamente do controle (carne), enquanto as viabilidades dos estágios de larva e total foram superiores para os adultos criados na dieta alternativa. A longevidade dos adultos foi superior na dieta moela.
- O agente esterilizante Glutaraldeído a 2% mostrou-se eficaz na esterilização de de massa de ovos (0,600g) de *C. albiceps* e *C. putoria* e a toxicidade atribuída ao agente esterilizante, sendo considerado como inviável devido as altas taxas de mortalidade das larvas pôde ser evitada rinsando os ovos esterilizados com um agente neutralizador. Os testes de esterilidade aplicados comprovaram a esterilidade dos ovos.
- A esterilização de ovos *C. putoria* com o Glutaraldeído 2% não influenciou negativamente a eclosão das larvas, a viabilidade larval, pupal. e total dos dípteros.
- A logística desenvolvida para conservar larvas terapêicas foi adequada e permitiu a viabilidade de larvas de *C. putoria* de forma satisfatória por até 5 dias, podendo ser esta técnica promissora para utilização no Brasil da Bioterapia, o que poderá beneficiar centenas de pacientes que sofrem com feridas de difícil cicatrização.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carraro, VM; Milward-de-Azevedo, EMV. 1999. Quantitative descriptions of calliphorid dipterans captured on Campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro using sardine bait. *Revista Brasileira de Zoociências* I(1): 77-89
- Cazander G, Van Veen KEB, Bernards AT, Jukema GN. 2009. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *Journal of Tissue Viability* 18: 80-87
- Cazander G, van de Veerdonk MC, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Schreurs MWJ, and Jukema GN. 2010. Maggot Excretions Inhibit Biofilm Formation on Biomaterials. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 468(10): 2789–2796.
- Chevalier J, Gheerbrant A. Dicionário de Símbolos. 21.ed.Rio de Janeiro: José Olympio, 2007
- Furlanetto SMP, Campos MLC & Hársi CM. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15: 170–174.
- Gagné RJ. 1981. *Chrysomya* spp., old World blowflies (Diptera: Calliphoridae), Recently established in the Americas. *Annals of the Entomological Society of America* 27: 21-22.
- Guimarães JH, Prado AP & Linhares AX. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22(1): 53-60.
- Guimarães JH, Prado AP, Buralli GM. 1979. Dispersal and Distribution of three newly introduced species of *Chrysomya Robineau-Desvoidy* in Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 23 (4): 245-255
- Greenberg B. 1973. *Flies and Diseases: Biology and Disease Transmission*. Princeton (NJ): Princeton University Press, Princeton.; 2:740.
- Horobin, AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI. 2006. Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *Journal of Investigative Dermatology* 126(6):1410–8.
- Marinho RC. 2007. Estudo da relação parasitóide *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) utilizando como hospedeiro *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em laboratório. Dissertação Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

- Mumcuoglu, KY, J Miller, M Mumcuoglu, M Friger and M Tarshis. 2001. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 38:161-166.
- Pavillard ER, Wright EA. 1957. An antibiotic from maggots. *Nature*,180:916-917
- Prete PE. 1997. Growth Effects of *Phaenicia sericata* Larval Extracts on Fibroblasts: Mechanism for Wound Healing by Maggot Therapy, *Life Sciences*, 60(8):505-510
- Queiroz MMC, Norberg NA, Maure EAP, Toledo RF, Gazêta GS, Dutra AEA, Rodrigues-Guimarães R. 1999. Veiculação de bactérias patogênicas por moscas sinantrópicas coletadas em restaurantes, hospitais e feiras da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. *Latinoamericano de Parasitologia. Acapulco, Guerrero. México*. 102 p.
- Sánchez MC, Chuaire L, Narváez R, Segura NA.2004. Biocirugía: utilización de larvas de insectos necrófagos en la curación de heridas. *La terapia larval. Revista Ciencias de la Salud* 2(2):156-64
- Sherman RA, Hall MJ & Thomas S. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology* 45: 55-81
- Souza AM, Linhares AX. 1997. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Medical and Veterinary Entomology* 11(1): 8-12.
- Van Der Plas MJA, Dambrot C, Dogterom-Ballering HCM, Kruithof S, van Dissel JT and Nibbering PH. 2010. Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 65: 917–923
- Zhang Z, Wang S, Diao Y, Zhang J, Decheng LV. 2010. Fatty acid extracts from *Lucilia sericata* larvae promote murine cutaneous wound healing by angiogenic activity. *Lipids in Health and Disease* 9:24.