

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BAIXA TEMPERATURA E DISTINTAS DIETAS ARTIFICIAIS SOB IMATUROS DE *Cochliomyia macellaria* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) VISANDO À PRODUÇÃO MASSAL PARA TERAPIA LARVAL

FRANCIÉLE DE SOUZA MASIERO<sup>1</sup>; JONATHAN FERREIRA MORAES<sup>2</sup>; MÁRCIA ELIENE RAMOS DE LACERDA<sup>3</sup>; PATRÍCIA JACQUELINE THYSSEN<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – franmasiero@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – jonathanferreira.moraes@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – marciaelacerda@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – thyssenpj@yahoo.com.br

## 1. INTRODUÇÃO

A terapia larval (TL) trata-se de uma miíase induzida de modo artificial para fins terapêuticos (SHERMAN, 2009), isto é, consiste na aplicação de larvas estéreis vivas de moscas, obtidas em laboratório, sobre lesões crônicas, agudas ou infectadas visando acelerar o processo de cicatrização (SHERMAN et al., 2000). As moscas utilizadas para esse fim, popularmente conhecidas como varejeiras, pertencem principalmente à família Calliphoridae, cujas larvas são encontradas criando-se em matéria orgânica em decomposição e também em tecidos necrosados de animais vivos (GUIMARÃES et al., 1983).

Em ambientes controlados, a carne *in natura* tem sido usada como recurso nutricional para as larvas de *Cochliomyia macellaria*, causadora de miíases secundárias (ZUMPT, 1965; PIRES et al., 2009). Contudo, essa fonte alimentar decompõe-se rapidamente e exala odor pútrido, que atrai outros artrópodes e dificulta a criação massal e estéril em laboratório (BARBOSA et al., 2004). Dessa forma, dietas artificiais são essenciais para a manutenção de estoques em larga escala de dípteros em laboratório (FERRAZ et al., 2011), visando: a viabilidade (através de um adequado balanceamento nutricional) (LOUREIRO et al., 2005), o aumento no tempo de sobrevivência, e a esterilidade das larvas, até a aplicação terapêutica. Apesar das inúmeras vantagens, trabalhos sobre o uso de dietas para manutenção de dípteros muscóides ainda são escassos (por exemplo, LEAL et al., 1982; ESTRADA et al., 2009; ECHEVERRI et al., 2010; BAER, 2011)

Além disso, a taxa de desenvolvimento larval pode ser diretamente influenciada por fatores abióticos, principalmente temperatura, uma vez que os insetos são organismos pecilotérmicos (BUSVINE, 1980). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da baixa temperatura e de distintas dietas artificiais na taxa de desenvolvimento de larvas de *C. macellaria* visando à criação massal para a TL.

## 2. METODOLOGIA

Colônias de *C. macellaria* foram estabelecidas a partir de coletas em ambiente natural usando armadilhas apropriadas (MORETTI et al., 2009), as quais continham iscas. Após triagem, os espécimes identificados (GRELLA e THYSSEN, 2011) foram colocados dentro de gaiolas e mantidos sob condições controladas (27±1°C, 70±10% UR e 12:12h fotoperíodo). Fêmeas foram estimuladas para ovipostura com carne bovina moída crua. Os ovos, retirados com auxílio de pincel, foram desinfetados com hipoclorito de sódio (NaClO) 1% (THYSSEN et al., 2013).

Trinta ovos foram depositados em cada uma das dietas testadas: (AS) ágar sangue; (BHI) Brain Heart Infusion agar; (BFC) BHI + farinha de carne. Carne bovina moída foi usada como grupo controle. A taxa de eclosão e o desenvolvimento dos imaturos foram avaliados sob diferentes condições de temperatura: ambiente ( $16-22\pm 1^\circ\text{C}$ ) e sob refrigeração ( $4-8^\circ\text{C}$ ). O grupo controle foi mantido a  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Observações foram realizadas a cada três horas até o momento da eclosão. Amostras de neo-larvas e de larvas com idade 30 h foram retiradas e pesadas para avaliar a taxa de desenvolvimento, em seguida armazenadas em tubos eppendorfs com álcool 70%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como esperado, os imaturos criados em carne bovina e expostos à temperatura ambiente apresentaram o maior ganho de peso (D'ALMEIDA et al., 2000). Já entre as dietas artificiais testadas, o BFC proporcionou maior ganho de peso e tamanho corporal para os imaturos, enquanto que BHI nenhuma alteração significativa. A Tabela 1 sumariza a relação entre os parâmetros observados.

Tabela 1. Valores médios da massa corporal larval ( $10^3$  mg), conforme idade e temperatura de exposição, considerando os diferentes grupos experimentais.

Grupos experimentais	Condições de temperatura					
	Ambiente ( $16$ a $22\pm 1^\circ\text{C}$ )		Baixas temperaturas ( $4$ a $8^\circ\text{C}/24\text{h}$ )		Baixas temperaturas ( $4$ a $8^\circ\text{C}/48\text{h}$ )	
	Idades		Idades		Idades	
	0h	30h	0h	30h	0h	30h
Carne bovina	0,25	1,9	0,6	0,9	- <sup>a</sup>	-
Ágar sangue (AS)	0,2	0,4	0,01	0,6	0,01	- <sup>b</sup>
BHI	0,4	0,4 <sup>b</sup>	0,7	0,8 <sup>b</sup>	0,5	0,6 <sup>b</sup>
BHI + farinha de carne (BFC)	0,25	0,8	0,6	0,8	- <sup>a</sup>	-

<sup>a</sup> Não houve eclosão de imaturos; <sup>b</sup> 100% dos imaturos morreram após 36h.

WALL et al. (1992) observou que a duração do período larval em dieta artificial foi ligeiramente mais longo do que em fígado bovino. Contudo, as dietas artificiais trazem uma gama de vantagens, não só pela redução do odor pútrido, mas também pela diminuição da contaminação secundária por outros insetos que, eventualmente, são atraídos pelos odores desagradáveis da carne que se decompõe no ambiente de trabalho (ESTRADA et al., 2009). Além disso, dietas desse tipo podem ser elaboradas visando à produção massal de imaturos, para quaisquer que sejam as finalidades de uso dos insetos.

Neste estudo buscou-se uma dieta que pudesse ser garantida a padronização da criação, taxa de sobrevivência igual ou superior a 75% e condições sépticas de acondicionamento dos imaturos para fins terapêuticos. Em termos de padronização, todas as dietas são de fácil preparo e baixo custo. Quanto à sobrevivência, quase 90% dos imaturos criados em BHI morreram a partir de 30 h de vida provavelmente por déficit de nutrientes essenciais, tais como aminoácidos, vitaminas e lipídeos, na alimentação. De acordo com PARRA (2001) a qualidade e quantidade de certos nutrientes são relevantes para garantir o crescimento e a sobrevivência dos insetos.

A taxa de sobrevivência foi de 74% e 97,2% em BFC e carne, respectivamente, denotando a importância dos nutrientes para o desenvolvimento do inseto.

Em todas as dietas foi observado algum tipo de crescimento microbiano: leveduras, bacilos Gram negativos e coco-bacilo Gram negativo em AS; cocos Gram positivos em BHI; e bacilos Gram positivos em BFC. Certamente, a microbiota do trato digestivo das larvas foi a fonte da contaminação das dietas, tendo em vista que as mesmas foram autoclavadas após o preparo. Na literatura ao menos um simbionte, *Proteus mirabilis*, tem sido isolado frequentemente do intestino larval (FLEISCHMANN et al., 2004), mas podem haver outros ainda desconhecidos. O acréscimo de metil parahidroxibenzoato (Nipagin) à dieta artificial, como feito por ESTRADA et al. (2009), demonstra a efetividade deste composto para inibir a colonização de micro-organismos contaminantes. PARRA (2001) acrescenta ainda que esse éster de largo espectro de ação antimicrobiana apresenta baixa toxicidade. Futuramente, próximos testes com as dietas aqui avaliadas deverão envolver o acréscimo de Nipagin para garantir a qualidade de esterilização.

Considerando a viabilidade sob diferentes condições de temperatura, as dietas representaram o melhor substrato para o desenvolvimento dos imaturos expostos às baixas temperaturas, uma vez que o ganho de peso foi maior do que o registrado para aqueles criados em carne sob as mesmas condições. Embora as taxas de crescimento possam ser afetadas diariamente por variações na temperatura ambiente e prolongados episódios de baixa temperatura (AMES e TURNER, 2003), é possível usar este parâmetro a favor da programação de larvas para o uso em TL, a fim de determinar o período de produção dos imaturos até a aplicação terapêutica.

#### 4. CONCLUSÕES

A dieta BFC é apropriada para a manutenção massal de imaturos de dípteros que são criados visando à aplicação terapêutica, embora tenham que ser estudados ainda aspectos para garantir total esterilidade do meio. O período máximo de armazenamento de larvas sob baixas temperaturas é de 24 horas, considerando a manutenção de taxas apropriadas de viabilidade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMES, C.; TURNER, B. Low temperature episodes in development of blowflies: implications for post-mortem interval estimation, **Medical and Veterinary Entomology**, London, n.17, p. 178-186, 2003.
- BAER, W.S. The Classic: The Treatment of Chronic Osteomyelitis With the Maggot (Larva of the Blow Fly). **Clinical Orthopaedics and Related Research**, Washington, n. 46, p. 920–944, 2011.
- BARBOSA, L.S.; JESUS, D.M.L.; AGUIAR-COELHO, V.M. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligolítica. **Revista Brasileira de Zootecias**, Juiz de Fora, n.6, p.207-217, 2004.
- BUSVINE, J.R. **Insects and Hygiene: The biology and control of insect pests of medical and domestic importance**. London: Handcover, 1980.
- D'ALMEIDA, J.M.; FRAGA, M.B.; FERRO, C.L. Desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em dietas artificiais. **Entomología y Vectores**, Rio de Janeiro, n.7, p.155-162, 2000.

- ECHEVERRI, M.I.W.; ÁLVAREZ, C.R.; HIGUITA, S.E.H.; IDÁRRAGA, J.C.W.; FRANCO, M.M.E. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), uma nova alternativa para a terapia larval y reporte de casos en Colombia. **Iatreia**, Antioquia, n.23, p.107-116, 2010.
- ESTRADA, D.A.; GRELLA, M.D.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. **Neotropical Entomology**, Londrina, v.38, n.2, p.203-207, 2009.
- FERRAZ, A.C.P.; DALLAVECCHIA, D.L.; SILVA, D.C.; CARVALHO, R.P.; SILVA FILHO, R. G.; COELHO, V.M.A. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. **Journal of Insect Science**, Annapolis, v. 12, n.43, 2011.
- FLEISCHMANN, W.; GRASSBERGER, M.; SHERMAN, R. **Maggot therapy: a handbook of maggot-assisted wound healing**. New York: Thieme, 2004.
- GRELLA, M.D. e THYSSEN, P.J. Chave taxonômica interativa para espécies de dípteros califorídeos (Infraordem: Muscomorpha) do Brasil. Disponível em: <[http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae\\_brazil](http://keys.lucidcentral.org/keys/v3/calliphoridae_brazil)> Acesso em 09 de novembro de 2011.
- GUIMARÃES, J.H.; PAPAVERO, N.; PRADO, A.N. As míases na Região Neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revista Brasileira de Zoologia**, São Paulo, v.1, n.1, p. 239-416, 1983.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. ANTUNES, J.A. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chlopyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, n.1, p.41-44, 1982.
- LOUREIRO, M.S.; OLIVEIRA, V.C.; D'ALMEIDA, J.M. Desenvolvimento pós-embrionário de *Pattonella intermutans* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae) em diferentes dietas. **Revista Brasileira de entomologia [online]**, v.49, n.1, p.127-129, 2005.
- MORETTI, T.C.; THYSSEN P.J.; SOLIS, D.R. Breeding of the Scuttle Fly *Megaselia scalaris* in a fish Carcass and Implications for the use in Forensic Entomology (Diptera: Phoridae). **Entomologia Generalis**, Stuttgart, v.31, p.349-353, 2009.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 2001.
- PIRES, S.M.; CÁRCAMO, M.C.; ZIMMER, C.R.; RIBEIRO, P.B. Influência da dieta no desenvolvimento e investimento reprodutivo de *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.76, n.1, p.41-47, 2009.
- SHERMAN, R.A.; HALL, M.J.R.; THOMAS, S. MEDICINAL MAGGOTS: An Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. **Annual Review of Entomology**, New York, n.45 p.55–81, 2000.
- SHERMAN, R.A. 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**, San Mateo, v.3, n.2, p. 336-344, 2009.
- THYSSEN, P.J.; NASSU, M.P.; NITSCHKE, M.J.T.; LEITE, D.S. Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. **Journal of Medicine and Medical Sciences**, Lagos, v. 4, n.10, p. 405-409, 2013.
- WALL, R.; FRENCH, N.; MORGAN, K.L. Effects of temperature on the development and abundance of the sheep blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Bulletin of entomological research**, London, n.82, p.125-131, 1992.
- ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 1965.