

*Ahead of Print*

Mariana dos Passos Nunes<sup>1</sup> 0000-0002-8945-9269

Ana Carolina Medeiros Debelian<sup>2</sup> 0000-0002-5714-9709

Wellington Thadeu de Alcântara Azevedo<sup>3</sup> 0000-0002-1132-5797

Renato Geraldo da Silva Filho<sup>4</sup> 0000-0001-6960-9314

Cláudia Soares Santos Lessa<sup>5</sup> 0000-0002-9876-6658

Valéria Magalhães Aguiar<sup>6</sup> 0000-0003-3765-3630

<sup>1,2,4,5,6</sup> Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.

**AUTOR CORRESPONDENTE:** Valéria Magalhães Aguiar

E-mail: [valeria@unirio.br](mailto:valeria@unirio.br)

Recebido em: 29/06/2023

Aceito em: 01/09/2023

**DIETA ESTÉRIL PARA LARVAS DE *CHrysomya MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794)**

**PERSPECTIVAS DE USO NA TERAPIA LARVAL**

**STERILE DIET FOR LARVAE OF *CHrysomya MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794)**

**PERSPECTIVES OF USE IN LARVAL THERAPY**

**DIETA ESTÉRIL PARA LARVAS DE *CHrysomya MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794)**

**PERSPECTIVAS DE USO NA TERAPIA LARVARIA**

## **RESUMO**

**Objetivo:** desenvolver uma dieta à base de Agar que permita a alimentação das larvas por até 48 horas. **Método:** o homogeneizado de pulmão bovino foi adicionado à base de Agar para atender às necessidades nutricionais dos insetos, como grupo controle foi utilizado o

Agar sangue. A viabilidade e o crescimento de larvas imaturas de *Chrysomya megacephala* foram avaliados após 48 horas nas dietas esterilizadas ou não esterilizadas de pulmão bovino/ágar homogeneizado em três diferentes concentrações proteicas: 5%, 10% e 15%. **Resultados:** a viabilidade larval em diferentes concentrações da dieta artificial de pulmão bovino/ágar homogeneizado foi considerada alta. As dietas testadas apresentaram nutrientes suficientes para as larvas crescerem de 0,334 a 0,533 cm em 48 horas. **Conclusão:** o Agar sangue pode ser substituído pela dieta alternativa de pulmão bovino/Agar homogeneizado, pois é mais fácil de produzir, mais econômico, prático e nutritivo para as larvas de *C. megacephala*.

**DESCRITORES:** Terapia de desbridamento de larvas, Dieta à base de homogenato, Varejeira, dieta estéril.

#### ABSTRACT

**Objective:** to develop an agar-based diet that allows the larvae to feed for up to 48 hours. **Method:** bovine lung homogenate was added to the agar base to meet the nutritional needs of insects, as a control group blood agar was used. The viability and growth of immature larvae of *Chrysomya megacephala* were evaluated after 48 hours on sterilized or non-sterilized bovine lung/homogenized agar diets at three different protein concentrations: 5%, 10% and 15%. **Results:** larval viability at different concentrations of artificial bovine lung/homogenized agar diet was considered high. The tested diets had enough nutrients for the larvae to grow from 0.334 to 0.533 cm in 48 hours. **Conclusion:** blood agar can be replaced by the alternative bovine lung/homogenized agar diet, as it is easier to produce, more economical, practical and nutritious for *C. megacephala* larvae.

**DESCRIPTORS:** Larvae debridement therapy, Homogenate-based diet, Blowfly, Sterile diet.

#### RESUMEN

**Objetivo:** desarrollar una dieta a base de agar que permita a las larvas alimentarse hasta por 48 horas. **Método:** se añadió homogeneizado de pulmón bovino a la base de agar para satisfacer las necesidades nutricionales de los insectos, como grupo control se utilizó agar

sangre. La viabilidad y el crecimiento de larvas inmaduras de *Chrysomya megacephala* se evaluaron después de 48 horas en dietas de agar homogeneizado/pulmón bovino esterilizado o no esterilizado a tres concentraciones de proteína diferentes: 5%, 10% y 15%. **Resultados:** la viabilidad de las larvas a diferentes concentraciones de pulmón bovino artificial/dieta de agar homogeneizado se consideró alta. Las dietas probadas tenían suficientes nutrientes para que las larvas crecieran de 0, 334 a 0, 533 cm en 48 horas. **Conclusión:** el agar sangre puede ser reemplazado por la dieta alternativa Agar pulmón bovino/agar homogeneizado, ya que es más fácil de producir, más económica, práctica y nutritiva para las larvas de *C. megacephala*.

**DESCRITORES:** Terapia de desbridamiento de larvas, Dieta basada en homogeneizados, Mosca azul, Dieta estéril.

## INTRODUÇÃO

*Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) é uma espécie de Diptera da família Calliphoridae de grande importância médico-ecológica que causa miíase secundária em humanos e animais.<sup>1,2</sup> A identificação desta espécie ajuda a determinar o intervalo post-mortem (IPM) em entomologia forense.<sup>3-5</sup> Além disso, os califorídeos também são usados na terapia de desbridamento de larvas ou terapia larval. *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) é a espécie mais utilizada em países da América do Norte e Europa. No entanto, *C. megacephala* tem se mostrado eficaz na terapia larval no Brasil devido ao seu comportamento biológico semelhante ao de *L. sericata*.<sup>6</sup> Além disso, espécies do gênero *Chrysomya* são abundantes nas áreas urbanas e rurais do Brasil, de fácil reprodução em laboratório e com alta capacidade reprodutiva.<sup>7</sup>

A terapia de desbridamento de larvas é uma técnica medicinal que utiliza larvas de moscas necrobiontófagas para desbridar feridas com tecido necrótico. Os ovos dos dípteros são previamente esterilizados ou desinfetados, produzindo larvas estéreis que são utilizadas para cicatrizar e limpar feridas crônicas e persistentes, muitas vezes infectadas por microrganismos resistentes a antibióticos. O biodebridamento é parcialmente realizado

pelos ganchos bucais das larvas, proporcionando a ruptura mecânica do tecido necrótico. O tecido é então liquefeito pela liberação de enzimas proteolíticas secretadas, absorvidas e digeridas.<sup>8</sup> A técnica está aumentando em todo o mundo devido à sua eficácia, resposta rápida, baixo custo e simplicidade.<sup>9</sup> Este procedimento beneficia os pacientes, pois pode prevenir amputações, hospitalizações, reduzir as consultas ambulatoriais e o uso generalizado de antibióticos.<sup>10</sup> À medida que a resistência aos antibióticos se torna cada vez mais prevalente,<sup>11</sup> esta antiga terapia volta a ser uma ferramenta clínica.

A carne bovina é a dieta natural utilizada na criação de larvas de *C. megacephala*<sup>12</sup> na proporção aproximada de um grama por larva, sendo verificado como a densidade relativa ideal no uso de carne para diferentes califórideos.<sup>13</sup> No entanto, dietas alternativas podem ser usadas para criar e manter imaturos desta espécie em laboratório,<sup>14</sup> onde uma dieta alternativa só é eficaz quando comparada à carne fresca se fornecer os aspectos nutricionais que atendam às necessidades dos insetos.<sup>15</sup>

O meio de cultura Agar Sangue é comumente usado como substrato estéril para criar larvas estéreis e mantê-las na dieta por 48 horas para posterior aplicação em feridas para fins de aplicação na terapia larval. Portanto, a dieta não precisa suportar o desenvolvimento larval completo, mas deve ser capaz de garantir e manter o desenvolvimento larval até o segundo ínstare. O meio de criação deve ser estéril e padronizado para que os dados possam ser considerados compatíveis e comparáveis.<sup>16</sup> Ainda segundo os autores, vários estudos têm sido realizados na área da entomologia na tentativa de fazer uma dieta artificial. No entanto, a maioria dessas dietas não pode ser autoclavada.

Buscando uma dieta alternativa mais econômica, nutritiva e de fácil produção para criação de larvas para futura aplicação na terapia larval, este trabalho teve como objetivo desenvolver uma dieta estéril à base de homogeneizado de pulmão bovino em ágar em três diferentes concentrações estéreis e não estéreis, substituindo o Agar sangue utilizado como controle e para avaliar aspectos preliminares do desenvolvimento larval de *C. megacephala* do primeiro ao segundo ínstare, registrando aspectos de seu desenvolvimento como

viabilidade, crescimento e capacidade de penetração na dieta; sendo que neste último critério quanto maior a capacidade de penetração, mais prejudicial torna-se retirar as larvas da dieta artificial para possíveis aplicações na terapia larval.

Os dados obtidos neste estudo servirão de parâmetro para futura avaliação da manutenção de larvas estéreis com vistas à aplicação na terapia larval. Sendo este um estudo preliminar com foco no desenvolvimento, padronização e avaliação da adequação de uma dieta estéril para criação de larvas imaturas em laboratório, enquanto um estudo posterior focaria na aplicação dessa dieta na criação de larvas estéreis para aplicação na terapia larval.

## MÉTODO

Este estudo foi realizado no Laboratório de Estudos de Diptera (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP), Instituto Biomédico (BI) da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) RJ, Brasil.

A colônia de *C. megacephala* foi estabelecida a partir de adultos coletados no Bioparque do Rio de Janeiro, localizado no bairro de São Cristóvão. Foram utilizadas armadilhas confeccionadas com tubos de PVC, conforme descrito.<sup>17</sup> As armadilhas foram suspensas a 1,7 m do solo por correntes de ferro e apoiadas em galhos de árvores, onde ficaram expostas por aproximadamente 24 horas com 200 gramas de peixe (sardinha) utilizado como isca após serem mantidas fora da refrigeração por 24 horas para exalar odores e atrair dípteros. As moscas adultas capturadas identificadas como *C. megacephala* segundo a chave taxonômica<sup>18</sup> foram transferidas para gaiolas de polietileno (40 x 30 x 20 cm), com abertura superior e anterior coberta com tecido de náilon, permitindo ventilação e acesso ao interior da gaiola, respectivamente. Uma solução de mel a 50% foi preparada diluindo volumes iguais de mel e água (1:1). A solução de mel 50% e água ad libitum foram oferecidas diariamente em recipientes de polietileno para alimentação dos adultos. Moelas de frango foram oferecidas para maturação dos folículos ovarianos e oviposição como recomendado pelos autores.<sup>19</sup>

Uma dieta estéril à base de homogeneizado de pulmão bovino em ágar foi preparada misturando três diferentes concentrações de pulmão bovino em um misturador: uma parte de pulmão para nove partes de água (1:9) no primeiro tratamento (T1); duas partes de pulmão para oito partes de água (1:4) no segundo tratamento (T2); e três partes de pulmão para sete partes de água (3:7) no terceiro tratamento (T3). As porções fibrosas do pulmão que não homogeneizaram na solução e ficaram fixadas nas hélices do misturador foram filtradas em peneira de malha fina de polietileno de 11 cm até que todas as partes fibrosas da solução fossem retiradas. Em seguida, 100 mL de cada tratamento foram transferidos para bêqueres, onde seriam misturados à solução de ágar.

A solução de ágar (Bacteriological Kasvi, K25-1800) foi preparada a 4% em 100 mL de água destilada, aquecida a 100°C até sua completa dissolução e adicionada a 100 mL do homogenato, formando 200 mL do produto final de homogeneizado de pulmão bovino em ágar. Assim, a concentração final de ágar no homogeneizado de pulmão bovino em ágar foi de 2%. Por sua vez, o homogenato de pulmão/ágar bovino em T1 tem concentração de 5%, 10% em T2 e 15% em T3. As dietas esterilizadas (E) foram autoclavadas por 15 min. a 121°C. Três tratamentos não estéreis (NE) semelhantes também foram preparados.

Em seguida, 200 mL de cada dieta foram transferidos para seis placas de Petri (90 x 15 mm) em um volume de 25 mL/placa. Após a solidificação da dieta à temperatura ambiente, 40 larvas recém-eclodidas não estéreis de *C. megacephala* (laboratório 12<sup>a</sup> geração) foram transferidas manualmente para cada placa de Petri com o auxílio de um pincel n. 0. Em seguida, as placas foram vedadas com filme de PVC para evitar a fuga das larvas.

Agar de sangue de ovelha à base de *Tryptic Soy Agar* (TSA) estéril (New Prov, Código: PA31) foi usado como controle e as larvas foram transferidas conforme descrito acima.

Três réplicas dos três tratamentos estéreis (T1S, T2S e T3S), os três tratamentos não estéreis (T1NS, T2NS e T3NS) e o controle (Agar Sangue) foram transferidos para uma capela de criação de larvas,<sup>20</sup> onde foram mantidos por 48 horas para atingirem o segundo ínstare

larval. Após esse período, a viabilidade larval, que é o número de larvas que sobreviveram até 48 horas, foi avaliada por contagem manual com pinça anatômica e o crescimento de todas as larvas sobreviventes foi obtido medindo-se o comprimento do corpo da larva com uma régua milimetrada. A temperatura média registrada durante a fase experimental foi de 26,3°C durante o dia; 17,0°C à noite; e 60 + 10% de umidade relativa.

Em seguida, 5% de cada lote foi incubado a 35±2°C por 18 a 24 horas e mais 24 horas em temperatura ambiente para atestar a esterilidade das dietas Agar Sangue e homogeneizadas estéreis, conforme recomendação.<sup>21</sup> Na presença de contaminantes, o meio foi descartado e um novo meio (novo lote) preparado.

A análise estatística foi realizada por meio do software R versão 4.1.1. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foi realizado para verificar diferenças entre os tratamentos ( $\alpha = 5\%$ ).

## RESULTADOS

A viabilidade de larvas de *C. megacephala* criadas em dieta estéril à base de homogeneizado de pulmão bovino em ágar é descrita na Tabela 1. Esse índice refere-se à quantidade de larvas que sobreviveram nas dietas durante o período em que foram mantidas (por 48 horas). A menor viabilidade foi observada para o tratamento 1 estéril (T1E) (44,17%), indicando que essa concentração de homogeneizado não atendeu às necessidades nutricionais das larvas, causando grande percentual de mortalidade antes do segundo estágio larval. Houve diferença significativa entre a viabilidade desse tratamento quando comparado ao T2E ( $p < 0,01$ ), T2NE ( $p < 0,05$ ), T3NE ( $p < 0,01$ ) e Agar Sangue ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos T2E, T3E, T1NE, T2NE e T3NE não diferiram entre si e todos tiveram viabilidade média superior a 70%. Conforme indicado na Tabela 1, os maiores percentuais de viabilidade foram obtidos em T2E (86,67%) e T3NE (89,17%), indicando que não houve diferença entre o tratamento estéril e não estéril, bem como entre T2 e T3. Ao comparar apenas as dietas estéreis, o T2E apresentou maior viabilidade; comparando apenas dietas não estéreis, o T3NS apresentou maior viabilidade.

**Tabela 1** - Viabilidade (%) de larvas de *Chrysomya megacephala* mantidas em dieta de ágar homogeneizado de pulmão bovino por 48h

Tratamento	Média (cm)	Teste Tukey	Desvio Padrão	Variação Interquartil (75 - 25)	Mínimo	Mediana	Máximo	Penetração Larval em %
AS	78,33		18,76	18,75 (87,50-68,75)	0,23	60,00	77,50	97,50
T1NE	73,33		7,64	7,50 (77,50-70,00)	0,29	65,00	75,00	80,00
T1E	44,17		14,65	13,75 (52,50-38,75)	0,16	27,50	50,00	55,00
T2NE	78,33		6,29	6,25 (81,25-75,00)	0,33	72,50	77,50	85,00
T2E	86,68		11,81	11,25 (91,25-80,00)	0,26	77,50	82,50	100,00
T3NE	89,17		6,29	6,25 (92,50-86,25)	0,42	82,50	90,00	95,00
T3E	74,17		9,46	8,75 (77,50- 68,75)	0,29	67,50	70,00	85,00

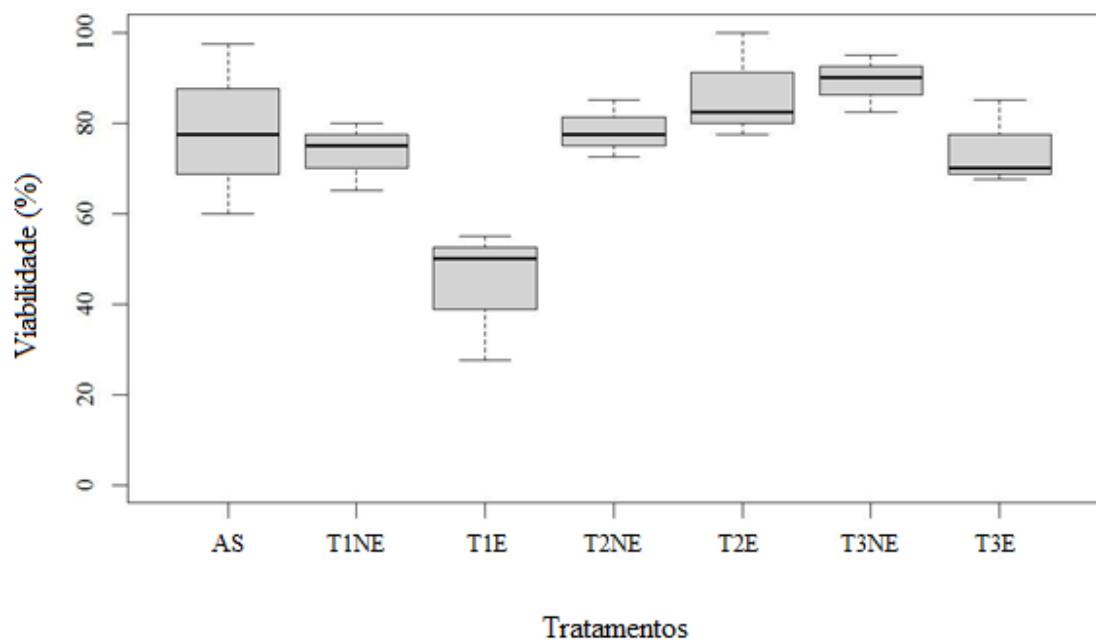
T1: Dieta a 5%. T2: Dieta a 10%. T3: Dieta a 15%. AS: Agar Sangue (controle). NE: Não Estéril. E: Estéril. Os tratamentos que possuem cores diferentes são significativamente diferentes de acordo com o pós-teste de Tukey.

A Figura 1 corrobora os resultados da Tabela 1, onde fica evidente que a média, mediana e desvio padrão da viabilidade larval em todas as dietas de homogeneizado de pulmão bovino em ágar apresentaram níveis semelhantes, exceto para T1E. Este tratamento apresentou níveis mais baixos e diferiu da maioria dos outros tratamentos, exceto T3S e T1NE, pois sua viabilidade mínima e viabilidade máxima de T1E foram semelhantes. Os melhores resultados de viabilidade larval foram obtidos em T2E (acima de 85%), onde a concentração de homogeneizado foi de 10%.

A Figura 2 mostra o resultado final do desenvolvimento larval após 48 horas na dieta estéril e não estéril nas três concentrações, além do controle (Agar Sangue). Larvas mais desenvolvidas podem ser vistas em T2E e T3E, que continham 10% e 15% de homogeneizado de pulmão bovino em ágar, respectivamente. A dieta estéril de 15% (T3E) não apresentou homogeneidade na textura após o procedimento de esterilização, provavelmente devido à coagulação das proteínas, que formaram agregados de ágar separados. No entanto, a dieta foi consistente o suficiente para evitar um alto nível de penetração larval. As larvas T3E apenas se agruparam na região onde ocorreram os coágulos homogeneizados, se alimentaram

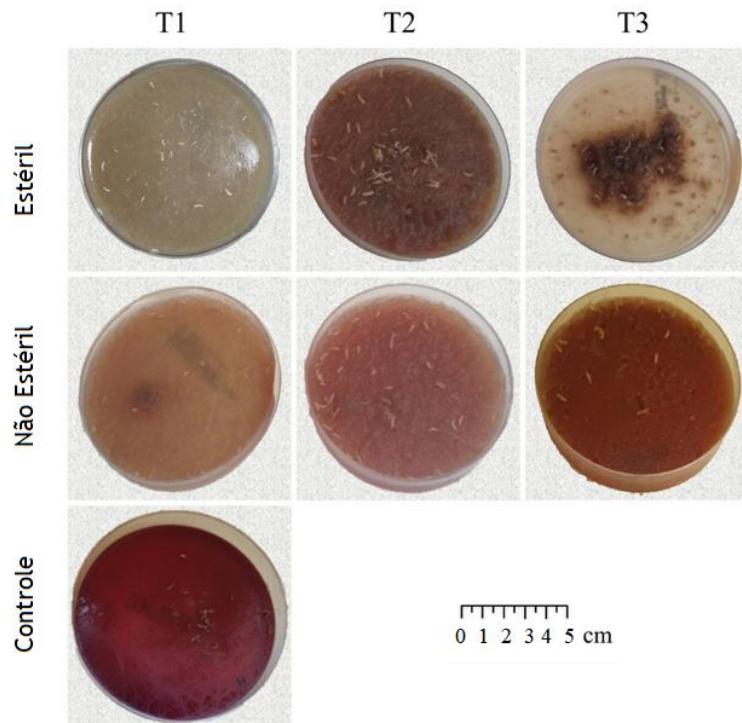
e sobreviveram por 48 horas. Um grande número não sobreviveu ao T1E por 48 horas e os que sobreviveram não cresceram como nos demais tratamentos, demonstrando o baixo valor nutricional deste tratamento.

**Figura 1** - Média, mediana e desvio padrão da viabilidade larval de *Chrysomya megacephala* criada em homogeneizado de pulmão bovino em ágar até o segundo ínstار larval



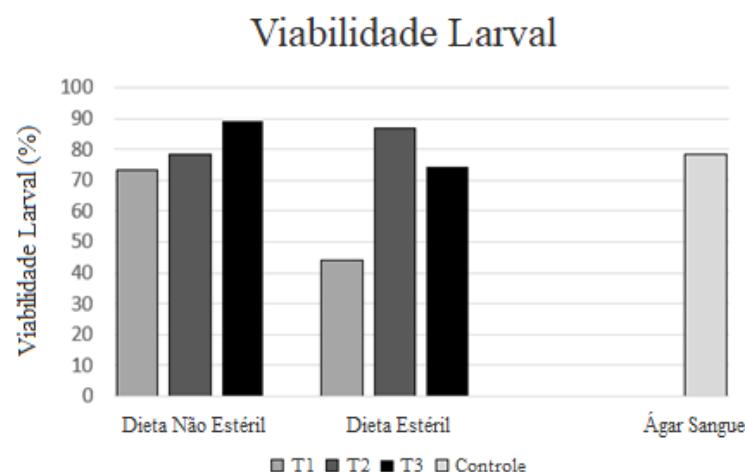
Assim como o T1E, o T1NE não foi nutritivo o suficiente para permitir um maior crescimento larval, e as larvas tiveram um tamanho médio menor em comparação com os tratamentos de maior concentração. No entanto, a viabilidade larval foi alta, pois mais de 70% sobreviveram até 48h. O controle não apresentou diferença na viabilidade larval para os demais tratamentos de homogeneizado de pulmão bovino em ágar, exceto para T1E, que foi significativamente menor.

**Figura 2** - Repetição de cada dieta estéril e não estéril à base de homogeneizado de pulmão bovino em ágar, e controle em Ágar Sangue, colocados em placas de Petri (90 x 15 mm) com as larvas sobreviventes de *C. megacephala* após um período de 48 horas: T1: dieta a 5%; T2: dieta a 10%; T3: dieta a 15%



A Figura 3 mostra a alta viabilidade larval de dietas de homogeneizado de pulmão bovino em ágar em tratamentos estéreis e não estéreis. O grupo controle também obteve alta porcentagem de viabilidade larval, porém menor quando comparada a T2E e T3NE.

**Figura 3** - Viabilidade larval de *Chrysomya megacephala* criada em dietas à base de homogeneizado de pulmão bovino em ágar após um período de 48 horas. T1: dieta a 5%; T2: dieta a 10%; T3: dieta a 15%; AS: Ágar Sangue (controle); NE: Não Estéril. E: Estéril



Os resultados da Tabela 2 destacam que os tratamentos Agar Sangue, T1E e T1NE tiveram o menor crescimento larval médio; enquanto T2NE, T2E, T3NE e T3E apresentaram as maiores taxas de crescimento, indicando 10% não estéril (T2NE), 10% estéril (T2E) e 15% não estéril (T3NE) como mais nutritivo que o controle ( $p = 0,00399$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Ao comparar apenas cada concentração de tratamento de homogeneizado de pulmão bovino em ágar estéril e não estéril usando o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, observa-se que T2NE, T2E e T3NE tiveram crescimento larval médio significativamente maior do que T1NE ( $p = 0,02925$ ,  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). Todos os tratamentos, exceto T1NE, apresentaram crescimento significativamente maior quando comparados a T1E ( $p < 0,001$  para T2NE, T2E, T3NE;  $p = 0,0454$  para T3E). As larvas T2E e T3NE tiveram maior média de crescimento larval do que T3E ( $p = 0,01269$  e  $p < 0,001$ , respectivamente).

**Tabela 2** - Tamanho corporal médio de larvas de *Chrysomya megacephala* mantidas em ágar homogeneizado de pulmão bovino por 48h

Tratamento	Média (cm)	Teste Tukey	Desvio Padrão	Variação Interquartil (75 - 25)	Mínimo	Mediana	Máximo	Penetração Larval em %
AS	0,385		0,081	0,115 (0,440 - 0,325)	0,23	0,390	0,56	≤ 10
T1NE	0,373		0,075	0,060 (0,380 - 0,32)	0,29	0,370	0,57	0
T1E	0,334		0,088	0,102 (0,390 - 0,287)	0,16	0,325	0,50	≤ 10
T2NE	0,456		0,066	0,075 (0,490 - 0,415)	0,33	0,440	0,64	≤ 10
T2E	0,484		0,096	0,130 (0,537 - 0,407)	0,26	0,510	0,70	≤ 10
T3NE	0,533		0,080	0,070 (0,560 - 0,490)	0,42	0,520	0,66	≤ 10
T3E	0,408		0,069	0,067 (0,442 - 0,375)	0,29	0,425	0,54	≤ 10

T1: Dieta a 5%. T2: Dieta a 10%. T3: Dieta a 15%. AS: Agar Sangue (controle). NE: NãoEstéril. E: Estéril. Os tratamentos que possuem cores diferentes são significativamente diferentes de acordo com o pós-teste de Tukey.

Apenas o T3E obteve maiores taxas de penetração larval na dieta (que é a quantidade de larvas que conseguiram penetrar na dieta deixando-a irregular e consequentemente dificultando a retirada) do que os demais tratamentos, maiores ou iguais a 10%. As proteínas

do meio foram desnaturadas durante o processo de esterilização, perdendo a consistência homogênea que apresentavam antes da esterilização, o que provavelmente facilitou a penetração das larvas e consequentemente dificultou sua remoção do meio.

## DISCUSSÃO

A taxa de desenvolvimento pupal e larval de *C. megacephala* varia de acordo com o tipo de substrato e temperatura. Autores observaram que a viabilidade larval de *Chrysomya albiceps* (Wiedmann, 1819) (Diptera: Calliphoridae) foi alta (acima de 86%) em larvas criadas com dieta de pulmão bovino, demonstrando ser um substrato com valor nutricional adequado.<sup>22</sup> Segundo o autor, as larvas passaram por todos os estágios larvais em 3,5 a 4,5 dias a 28°C dia/26°C noite, 70 ± 10% UR e 12 h de fotofase. Porém, para aplicação segura da terapia larval em pacientes, as larvas devem necessariamente ser mantidas em dieta estéril, ecloididas de ovos estéreis (Dallavecchia et al. 2010), bem como aplicadas em seu estágio L1 ou L2; portanto, a dieta a ser utilizada na terapia larval não precisa suprir as reservas nutricionais dos dípteros até o seu completo desenvolvimento (L3). Com base nos resultados em estudos, sugere-se o uso de dieta artificial com rúmen bovino para manutenção de colônias de dípteros em laboratório, principalmente para a espécie *C. albiceps*, onde os componentes adicionados a cada dieta artificial foram: leite em pó, cerveja em pó, caseína, nipage e ágar.<sup>23</sup> Deve-se levar em consideração a textura, dureza, homogeneidade e teor de água de dietas oferecidas em laboratório.<sup>15</sup>

Segundo autores, os ovos de *L. sericata* criados em dieta estéril à base de fígado a 27°C atingiram os menores tempos de duração do primeiro, segundo e terceiro estágios larvais, com tempo médio de 12, 16,1 e 34,2 horas, respectivamente.<sup>24</sup> Além disso, o meio de criação utilizado pelos autores se aproximou da dieta natural por ser à base de tecidos, com as vantagens de ser de simples produção e sem odor pútrido. Em nosso estudo, as larvas de *C. megacephala* alimentadas com dieta de homogeneizado de pulmão bovino em ágar a 26,3°C durante o dia e 17°C à noite por 48 horas apresentaram tamanho corporal médio variando de 0,334 a 0,533 cm. As dietas estéreis foram tão viáveis quanto as não estéreis

(exceto T1E) para viabilidade larval e crescimento. Esses dados indicam que o Agar Sangue pode ser substituído por dietas de homogeneizado de pulmão bovino em ágar estéreis.

Outros autores demonstraram que dietas alternativas à base de homogeneizados foram tão eficazes quanto outras dietas naturais, onde o substrato ágar fígado fresco a 25 e 30°C permaneceu úmido por mais tempo que o fígado puro, proporcionando maior viabilidade das larvas de *C. megacephala*.<sup>25</sup> Outros autores compararam duas dietas artificiais -Agar Sangue e uma dieta baseada em 20% de sangue de cavalo adicionado a 5% de *Yeast Extract Agar* (YEA) - com fígado de porco fresco,<sup>16</sup> e consideraram o desenvolvimento da espécie *L. sericata* satisfatório nas três dietas, não havendo variação significativa na taxa de desenvolvimento e no tamanho das larvas ao comparar as dietas artificiais com o controle.

## **CONCLUSÕES**

Dietas estéreis à base de homogeneizado de pulmão bovino em Agar podem ser utilizadas para substituir o ágar sangue em futuras aplicações de na terapia larval, uma vez que 70% a 90% das larvas sobreviveram e cresceram nas dietas por 48h. As concentrações de 10% e 15% de homogeneizado de pulmão bovino em ágar apresentaram maior viabilidade e taxas de crescimento larval, indicando que são substratos nutritivos para manter as larvas até o segundo ístar. Também foi observada baixa penetração larval em dietas estéreis, o que é de grande benefício para sua futura aplicação na terapia larval, pois facilita sua remoção e transferência da dieta.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - concessão 88882.426021/2019-01) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro e à Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

## **REFERÊNCIAS**

1. Zumpt F. *Myiasis in Man and Animals in the Old World: A Textbook for Physicians, Veterinarians, and Zoologists*. Michigan University, Michigan; 1965.

2. Valviesse VRGA, Ferraz ACP, Proença B, Werneck GRN, Aguiar VM, Lessa CSS. Míase com exposição de calota craniana causada pela associação de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), (Diptera: Calliphoridae) em um paciente atendido em Hospital Público, Rio de Janeiro. *Entomotropica* 29: 191-196; 2014.
3. Greenberg B. Flies as Forensic Indicators. *Journal of Medical Entomology* [Internet]. 1991 [cited 2022 feb 10];28. Available from: <https://doi.org/10.1093/jmedent/28.5.565>.
4. Wells JD, Kurahashi H. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) development: Rate, variation and the implications for forensic entomology. *Medical Entomology and Zoology*. [Internet]. 1994 [cited 2022 feb 10];45. Available from: [https://doi.org/10.7601/mez.45.303\\_1](https://doi.org/10.7601/mez.45.303_1).
5. Oliveira-Costa, J. *Entomologia Forense: Quando Os Insetos São Vestígios.* 3º Ed. Campinas. Millennium Editora, 502p; 2011.
6. Dallavecchia DL, Filho RGS, Figueiredo NMA, Coelho VMA. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. *Rev. Pesqui.* (Univ. Fed. Estado Rio J., Online). [Internet]. 2010 [acesso em 10 de fevereiro 2022];2. Disponível em: <https://doi.org/10.9789/2175-5361.2010.v0i0.%25p>.
7. Pinheiro, MARQ. Uso da terapia larval no tratamento de úlceras crônicas em pacientes diabéticos no Hospital Universitário Onofre Lopes- Natal, RN. [Mestrado em Ciências Biológicas]. Rio Grande do Norte (Brasil): Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2014. [acesso em 10 de fevereiro de 2022]. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/23572>.
8. Sherman RA. 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; 2009.

9. Sherman RA. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. *Wound repair regen.* [Internet]. 2002 [cited 2022 feb 10];10. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2002.10403.x>.
10. Marcondes CB. Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo (Online)*. [Internet]. 2006 [acesso em 10 de fevereiro 2022];48. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000600014>.
11. Santos NQ. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & contexto enferm.* [Internet]. 2004 [acesso em 10 de fevereiro 2022];13. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>.
12. Ulyett GC. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences.* [Internet]. 1950 [cited 2022 feb 10];234(610). Available from: <https://doi.org/10.1098/rstb.1950.0001>.
13. Aguiar-Coelho VM, Queiroz MMC, Milward-de-Azevedo EMV. Relações intra-específicas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Díptera) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia.* [Internet]. 1996 [acesso em 10 de Fevereiro 2022];12(4). Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0101-81751995000400025>.
14. Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Filho RGS, Aguiar-Coelho VM. Alternative Diets for *Chrysomya putoria*, an Old World Screwworm Fly. *Journal of Insect Sciences.* [Internet]. 2012 [cited 2022 feb 10];12. Available from: <https://doi.org/10.1673/031.012.4301>.
15. Parra, JRP. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 3º Ed. Piracicaba, FEALQ, 137p; 1996.
16. Barnes KM, Gennard DE. Rearing bacteria and maggots concurrently: a protocol using *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) as a model species. *Japanese journal of applied*

entomology and zoology. [Internet]. 2013 [cited 2022 feb 10];48. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13355-013-0181-7>.

17. Mello RS, Queiroz MMC, Aguiar-Coelho VM. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia, Série Zoologia*. [Internet]. 2007 [acesso em 10 de fevereiro 2022];97. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0073-47212007000400019>.
18. Mello RP. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomología y vectores*, 10(2), 255-268; 2003.
19. Barbosa LS, Jesus DML, Coelho VMA. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) oriundos de lavras criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências* 6(2); 2004.
20. Carneiro LT, Azevedo WTA, Aguiar VM, Couri MS. The Nocturnal Oviposition Behavior of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Brazil and Its Forensic Implications. *J. med. entomol.* [Internet]. 2021 [cited 2022 feb 10];58. Available from: <https://doi.org/10.1093/jme/tja239>.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). [Internet]. Módulo 6 - Controle de Qualidade em Microbiologia Clínica; 2008 [Acesso em 10 de fevereiro de 2022]. Disponível em:  
[https://www.anvisa.gov.br/servicosaudae/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo\\_6/esterilidade.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicosaudae/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo_6/esterilidade.htm).
22. Salazar-Souza M, Couri MS, Aguiar VM. Chronology of the Intrapuparial Development of the Blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): Application in Forensic Entomology. *J. med. entomol.* [Internet]. 2018 [cited 2022 feb 10];55. Available from: <https://doi.org/10.1093/jme/tjy054>.
23. Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal

para uso forense. *Neotrop. entomol.* [Internet]. 2009 [acesso em 10 de fevereiro de 2022];38(2) . Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2009000200006>.

24. Sherman RA, Tran JMT. A simple, sterile food source for rearing the larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Med. vet. entomol.* [Internet]. 1995 [cited 2022 feb 10];9.

Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1995.tb00011.x>.

25. Gruner SV, Slone DH. A Fresh Liver Agar Substrate for Rearing Small Numbers of Forensically Important Blow Flies (Diptera: Calliphoridae). *J. med. entomol.* [Internet]. 2014 [cited 2022 feb 10];51. Available from: <https://doi.org/10.1603/ME13070>.