

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

MARIA LÚCIA MARCUCCI TORRES



**EFEITO DE QUATRO ANTIBIÓTICOS SOBRE LARVAS  
DE *CHRYSOMYA PUTORIA* (WIEDEMANN) (DIPTERA:  
CALLIPHORIDAE) UTILIZADAS EM BIOTERAPIA**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
MARIA LÚCIA MARCUCCI TORRES  
Ângelo Pires do Prado  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de Campinas como  
parte dos requisitos necessários para  
obtenção do grau de Mestre em Parasitologia**

**Orientador: Professor Ângelo Pires do Prado  
CAMPINAS – 2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**T636e**

**Torres, Maria Lúcia Marcucci**

Efeito de quatro antibióticos sobre larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) utilizadas em bioterapia / Maria Lúcia Marcucci Torres. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Ângelo Pires do Prado.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. *Chrysomya putoria*. 2. Terapia larval. 3. Desenvolvimento larval.
4. Feridas e lesões – Tratamento. I. Ângelo Pires do Prado.
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 22 de fevereiro de 2005.

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado (Orientador) Ângelo Pires do Prado

Prof. Dr. Arício Xavier Linhares Arício Xavier Linhares

Prof. Dr. Newton Goulart Madeira Newton Goulart Madeira

Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Muracy Bélo \_\_\_\_\_

Aos meus filhos pela compreensão e carinho mesmo ficando longe da mãe por tantos dias, até em finais de semana e férias.

Ao meu marido que tantas vezes foi um ombro amigo e outras deu a palavra que acalmou meu coração.

Vocês são o que eu tenho de mais importante na vida e tudo o que fiz dedico a vocês.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pois sem Ele eu sequer teria ingressado no Mestrado, e só cheguei até aqui porque esteve sempre ao meu lado (“Se diante de mim não se abrir o mar, Deus vai me fazer andar por sobre as águas...”).

Ao Prof. Ângelo Pire do Prado que sempre me orientou com paciência, mesmo nos seus momentos difíceis, me estimulando a descobrir o caminho e “andar com minhas próprias pernas”. Agradeço por sua serenidade e tranqüilidade que muitas vezes me serviram de amparo quando pensava que não iria conseguir.

À minha grande amiga de todas as horas, Fernanda Leme Varzim, pela companhia nas viagens durante esses três anos, pelas conversas deliciosas, pelas palavras sempre ponderadas e ditas no momento certo, por compartilhar comigo das alegrias, frustrações, inseguranças e ansiedades que permearam nosso trabalho. Também por “segurar a barra” no laboratório quando eu não podia estar presente.

À querida colega Maria Cândida (Can) por ter acreditado em meu potencial me apresentando ao meu orientador, pelo incentivo no início do laboratório em São João, pela força no decorrer de todo o trabalho.

À Luciana Zogbi da Farmácia Extrato Natural que foi tão gentil, fornecendo os antibióticos utilizados às vezes até sem aceitar pagamento.

À colega Ângela pela atenção dispensada todas as vezes em que nos encontramos no laboratório do IB, orientando nas dúvidas que surgiam a cada

etapa, compartilhando detalhes de sua experiência, sem os quais meu experimento poderia ter demorado muito mais a ser concluído.

Ao Prof. Arício Linhares pela realização da análise estatística dos dados da tese.

Ao Prof. Julio Baliero agradeço pelo auxílio com o armazenamento dos resultados iniciais utilizados posteriormente na análise estatística.

À Profa. Érica Hucke por ter me auxiliado na análise estatística.

À Angélica do Roccio o meu muito obrigado pela boa vontade e tempo gasto em ler o meu trabalho, cujas sugestões contribuíram de forma enriquecedora para torná-lo mais claro e compreensível.

As queridas colegas Maria Lucia G. Lourenço e Maria do Carmo Vaillati pela força e amizade, muitas vezes ministrando aulas em meu lugar para que eu pudesse ficar no laboratório ou frequentar as disciplinas.

À UNIFEQB, principalmente ao coordenador do curso de medicina veterinária Prof. João Flávio P. Martins, pelo apoio tanto na realização do curso de mestrado, como na manutenção do laboratório de Entomologia. Em especial, aos funcionários D. Aninha, Sr. Vieira, Marquinho e Sorriso que muito me auxiliaram na compra de materiais e doação de equipamentos.

Aos professores do Departamento de Parasitologia pela valiosa contribuição na correção deste trabalho, desde o exame de qualificação até a pré-banca da tese: Prof. Nelson, Prof. Arício, Profa. Marlene e em especial ao Prof. Odair.

À minha avó Elza, pela força de suas orações que me acompanhou, não só no período do curso de mestrado, mas que está comigo em todos os momentos.

Ao meu pai Wilson que mesmo longe está sempre comigo, o meu muito obrigado por tudo que eu sou.

Aos meus sogros Goel e Lúcia, agradeço de coração por tudo que já fizeram por mim não só durante meu mestrado, vocês são meus segundos pais.

A todos os que de alguma forma ajudaram na elaboração deste trabalho, mesmo que eu não tenha me lembrado de citar aqui, os meus sinceros agradecimentos, estejam certos que nunca esquecerei a sua colaboração. Que Deus os abençoe!

## SUMÁRIO

<b>Lista de figuras</b> .....	ix
<b>Lista de tabelas</b> .....	x
<b>Resumo</b> .....	xi
<b>Abstract</b> .....	xiii
<b>I. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1. Bioterapia e suas indicações.....	1
2. Mecanismo de ação das larvas.....	8
3. História da terapia larval.....	12
4. Utilização da bioterapia em medicina humana e veterinária.....	15
5. Justificativa e objetivo.....	20
<b>II. BIOENSAIO COM ANTIBIÓTICOS</b> .....	22
1. Utilização de antibióticos na dieta de insetos.....	22
2. Material e Métodos.....	29
2.1. Local da pesquisa.....	29
2.2. Coleta de material.....	29
2.3. Criação e manutenção de larvas e adultos.....	30
2.4. Bioensaio com antibióticos.....	34
3. Resultados.....	46
4. Discussão.....	58
<b>III. CONCLUSÕES</b> .....	68
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	70

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Gaiolas utilizadas na criação das moscas.....	31
Figura 2 – Recipientes contendo alimento e água .....	32
Figura 3 – Frascos de meio teste (Amoxicilina) e controle .....	37
Figura 4 – Contagem e observação das larvas em placa de Petri .....	39
Figura 5 – Sulcos na superfície do meio .....	39
Figura 6 – Frasco coberto com organza .....	40
Figura 7 – Isopor contendo os recipientes com os meios .....	41
Figura 8 – Comparação entre o número de larvas que atingiram o estágio de pupa nas quatro doses e no controle, nos quatro antibióticos testados.....	53
Figura 9 – Variação de peso de pupa nas quatro doses comparadas ao grupo controle, nos quatro antibióticos testados.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dose preconizada para cães e concentração inicial de fármaco adicionado ao meio.....	42
Tabela 2 – Concentrações de Ampicilina testadas.....	44
Tabela 3 – Concentrações de Amoxicilina testadas.....	44
Tabela 4 – Concentrações de Cefalexina testadas.....	44
Tabela 5 – Concentrações de Cefalotina testadas.....	44
Tabela 6 – Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Ampicilina .....	46
Tabela 7 – Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Amoxicilina .....	47
Tabela 8 – Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Cefalexina .....	48
Tabela 9 – Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Cefalotina .....	48
Tabela 10 – Variação no nº de larvas que atingiram o estágio de pupa entre as doses testadas.....	50
Tabela 11 – Comparação entre as médias gerais de sobrevivência das larvas nos quatro tratamentos .....	51
Tabela 12 – Comparação entre as médias gerais de sobrevivência das larvas nas doses 1, 2 ,3 ,4 e controle dos quatro tratamentos.....	52

## RESUMO

A bioterapia ou terapia de desbridamento larval, é a utilização de larvas vivas de moscas varejeiras para tratamento de feridas de difícil cicatrização. Este tipo de tratamento foi descoberto acidentalmente em condições de campos de batalha, teve seu auge nas décadas de 1930 e 1940 e atualmente tem sido utilizado em muitos países. As larvas aplicadas na ferida promovem a cura por meio de vários mecanismos, como liquefação do tecido necrosado, remoção das bactérias, secreção de substâncias que auxiliam a cicatrização e estimulam o crescimento de tecido de granulação, entre outros. A aplicação é relativamente simples, sendo um tratamento não dispendioso que promove bons resultados onde algumas vezes as terapias convencionais não foram efetivas.

Sendo assim, neste trabalho a espécie *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), foi selecionada e criada em condições de laboratório, para a posterior realização da terapia larval em animais. Não obstante, as feridas de pele que ocorrem nos animais são muito contaminadas e assim, no presente trabalho, foram testados os efeitos da Ampicilina, Amoxicilina, Cefalexina e Cefalotina sobre o crescimento e desenvolvimento das larvas de *Chrysomya putoria*, com a finalidade de selecionar um ou mais fármacos que poderão ser utilizados sistemicamente, concomitante a terapia de desbridamento larval em animais.

Os antibióticos foram adicionados em várias concentrações em meio utilizado como substrato para as larvas de *Chrysomya putoria*, onde foram

introduzidas larvas recém eclodidas e observado o crescimento e desenvolvimento das mesmas, bem como o número de pupas sobreviventes em cada meio ao final do estágio larval. Para cada antibiótico e concentração testados foram realizadas três replicatas e um controle.

Foi observado ser a Amoxicilina o fármaco que apresentou menor efeito prejudicial sobre as larvas, sendo portanto o mais seguro a ser utilizado em conjunto com a terapia larval.

**Palavras-chave:** *Chrysomya putoria*; terapia larval; desenvolvimento larval; feridas e lesões-tratamento.

## ABSTRACT

Biotherapy or maggot debridement therapy is the use of live blow-fly larvae for treating non-healing wounds. This kind of treatment was discovered accidentally in battle field conditions, was commonly practiced during 1930's and 1940's and presently has been used in several countries. Larvae applied in the wound promote healing by several mechanisms such as liquefing necrotic tissue, removing bacteria, and by secretion of substances that help healing and stimulate the growth of granulation tissue. Maggot therapy use is relatively simple, a non expensive therapy that promote good results where sometimes conventional therapies are not effective.

In this work the species *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) was selected and raised under laboratory conditions for the future use of maggot therapy in animals. Since the animal skin wounds are usually infected, in this work the effects of Ampicilin, Amoxicilin, Cefalexin and Cefalotin were tested on growth and development of *C. putoria* larvae to compare with one or more of the tested drugs that will be utilized in association with larval debridement therapy in animals.

Antibiotics were used in different concentrations and added to the medium used as growth substract for *C. putoria*. The growth and developmental rates as well the number of surviving pupae were recorded. Three replicates and one control were done for each antibiotic type and concentration tested.

Amoxicilin was the drug with the least detrimental effect upon the

larvae and, therefore, was considered the safest to be used in association with maggot therapy.

**Key-words:** *Chrysomya putoria*; maggot therapy; larval development; wounds and injury-treatment.

## I- INTRODUÇÃO

### 1. Bioterapia e suas indicações

A terapia larval, que é o tratamento de feridas utilizando-se larvas vivas de moscas, tem aumentado o seu uso e popularização em muitos países do mundo, devido à grande eficácia das larvas em remover tecidos necrosados, além da segurança e simplicidade de aplicação. Este tratamento, também conhecido como terapia de desbridamento larval (TDL), bioterapia ou biocirurgia, consiste na aplicação de larvas vivas de moscas (Díptera: Calliphoridae) em ferimentos que não cicatrizam, com o objetivo de promover a remoção do material necrótico e o crescimento de novos tecidos (SHERMAN et al., 2000; MARTINI e SHERMAN, 2003).

Os efeitos benéficos da terapia larval sobre a cicatrização de feridas infectadas têm sido reconhecidos há centenas de anos. Este processo ocorreu acidentalmente, sob condições de campos de batalhas, onde foi observado que as feridas infestadas por larvas cicatrizavam mais rapidamente e com menos complicações do que aquelas que não haviam sido infestadas (THOMAS et al., 1999b; SHERMAN et al., 2000).

As indicações clínicas para a terapia larval incluem todos os tipos de feridas infectadas ou necrosadas e de difícil cicatrização, como osteomielite, abscessos, queimaduras e feridas de pacientes diabéticos, mesmo aquelas infectadas ou colonizadas por bactérias resistentes a antibióticos, sendo particularmente efetiva na resolução de feridas contaminadas por

*Staphylococcus aureus* metilina-resistente (CHILD e ROBERTS, 1931; JONES et al., 1998; THOMAS et al., 1999b; COURTENAY, 1999; THOMAS et al., 2001; THORNTON et al., 2002; WOLFF e HANSSON, 2003).

Também tem sido relatada a importância das larvas no manejo de algumas formas de câncer (CHILD e ROBERTS, 1931; JONES et al., 1998; THOMAS et al., 1999b; THORNTON et al., 2002; SEALBY, 2004). Segundo HINSHAW (2000), as larvas de moscas podem ser utilizadas no tratamento de lesões ulcerativas e certos tipos de tumores benignos e malignos, além das indicações citadas acima, sendo este tratamento de fácil aplicação e baixo custo.

Segundo SHERMAN et al. (1995a) a terapia larval é um método seguro, simples e barato que pode ser valioso no tratamento de úlceras de decúbito em pacientes com lesão de medula espinhal. WOLFF e HANSSON (2003) relatam que a terapia larval é efetiva no debridamento de úlceras de etiologias variadas, sendo de fácil aplicação e bem aceita pelos pacientes.

De acordo com MUMCUOGLU (2001a), a TDL pode ser utilizada em qualquer tipo de ferida purulenta de pele independentemente da causa ou da localização da mesma, tanto em pacientes hospitalizados como nos ambulatoriais. Uma das maiores vantagens desta terapia é que as larvas destroem o tecido necrosado mas preservam o tecido vivo, realizando um verdadeiro debridamento cirúrgico em cerca de 80 a 95% dos casos em que é utilizada. Segundo o autor, este é um método simples, bem tolerado e de baixo custo para o tratamento de feridas e úlceras que não respondem ao tratamento

convencional ou à intervenção cirúrgica.

Com o objetivo de identificar benefícios, riscos e problemas associados a pacientes ambulatoriais (ou seja, aqueles que não ficam internados) tratados com a terapia larval, SHERMAN et al. (2001) acompanharam o tratamento de 21 pacientes por sete terapeutas que realizaram a terapia larval em ambulatório e também na própria residência do paciente quando esteve impossibilitado de se locomover ao hospital. O resultado foi que 95% dos terapeutas e 90% dos pacientes ficaram satisfeitos com a terapia, sendo que em 86% dos casos houve o desbridamento completo ou significativo da ferida. Eles concluíram que a bioterapia é uma opção valiosa de tratamento ambulatorial ou em casa para feridas que não cicatrizam, mesmo quando não aplicada por médicos.

Em outro estudo, SHERMAN (2002) acompanhou o tratamento de 145 úlceras de pressão em 103 pacientes e concluiu que a bioterapia foi mais efetiva no desbridamento destas do que os tratamentos convencionais anteriormente prescritos.

MUMCUOGLU et al. (1999) avaliaram a eficácia da terapia larval no tratamento de feridas crônicas intratáveis e úlceras em pacientes hospitalizados por longos períodos. O desbridamento completo foi observado em 88,4% dos pacientes; em 7% o desbridamento foi significativo, em 2,3%, parcial e em 2,3% a lesão permaneceu sem alteração. Em cinco destes pacientes havia anteriormente indicação de amputação. Todavia, esta não foi realizada em virtude da eficácia da terapia larval, sendo que as

estruturas foram preservadas.

Entretanto, segundo THOMAS (1997) esta terapia é contra-indicada em feridas que sangram com facilidade, feridas que têm comunicação com uma cavidade ou órgão interno e naquelas que estão muito próximas a grandes vasos sanguíneos.

A terapia larval consiste, basicamente, de uma mífase secundária induzida de modo artificial, cuidadosamente controlada, onde o tratamento visa balancear os efeitos positivos da atividade das larvas sobre os tecidos necróticos, com seus potenciais efeitos negativos sobre os tecidos sadios (SHERMAN et al., 2000).

Os efeitos negativos são decorrentes do uso inapropriado de espécies que se alimentam preferencialmente de tecidos vivos ou da introdução de um número excessivo de larvas na ferida (SHERMAN et al., 2000). As reações adversas podem incluir dor, sangramento (COURTNAY et al., 2000; WOLLINA et al., 2002), pirexia e sintomas semelhantes à influenza (COURTNAY et al., 2000).

Segundo SHERMAN e PECHTER (1988), as vantagens desta terapia incluem a redução no tempo de cura da ferida e a formação de uma cicatriz pequena, resultantes da maior proliferação de tecido de granulação.

Além disso, outros autores relatam que as larvas promovem uma diminuição do odor desagradável proveniente do tecido necrótico e da intensidade da dor que acompanham os quadros de feridas crônicas, previnem o risco de septicemia, chegando em alguns casos a evitar a amputação do

membro ou proporcionar que esta seja realizada mais distalmente, com menor perda tecidual (MUMCUOGLU et al., 1998; 1999; COURTENAY et al., 2000; MUMCUOGLU, 2001a ; WOLFF e HANSSON, 2003).

Por outro lado, foi observado por COURTENAY et al. (2000), que o uso da bioterapia pode evitar a hospitalização e cirurgia de pacientes com feridas crônicas e promover a redução da necessidade de antibióticos e de internação.

Entretanto, nem todas as larvas de moscas podem ser utilizadas na bioterapia, mas apenas aquelas que se alimentam unicamente de tecido necrosado (necrobiontófagas). As mais utilizadas são as larvas pertencentes à família Calliphoridae, especialmente as de *Lucilia sericata* (Meigen) e *Phormia Regina* (Meigen), que são classificadas como parasitos facultativos (ARCHIE e ALEXANDER, 1934; THOMAS, 1997; HINSHAW, 2000; SHERMAN et al., 2000; MARTINI e SHERMAN, 2003). Segundo HALL (1996) e SHERMAN et al. (2000), as larvas de *Lucilia sericata* são as mais utilizadas porque preferem se alimentar de tecidos necrosados ao invés de tecidos vivos, raramente invadem órgãos internos, desenvolvem-se rapidamente, são geralmente fáceis de se cultivar *in vitro* e os ovos podem ser manipulados e esterilizados sem dificuldade.

Os Califorídeos são insetos holometábolos e seu ciclo de vida compreende quatro estágios que são ovo, larva, pupa e adulto. As fêmeas adultas produzem grande número de ovos que são depositados em matéria orgânica em decomposição, como tecidos de mamíferos e aves (nas partes que

não são cobertas por pêlos ou penas), carne crua ou cozida ou ferimentos abertos. A larva que mede aproximadamente um a dois milímetros, eclode após um período de aproximadamente 24 horas, penetra na matéria orgânica e alimenta-se por meio da secreção de substâncias proteolíticas que transformam a fonte nutritiva em alimento liquefeito, que será então ingerido. Após aproximadamente cinco dias, dependendo da temperatura ambiente, ocorre a maturação da larva que atinge de oito a dez milímetros de comprimento e pára de se alimentar abandonando o alimento e procurando o solo para pupariação. A mosca adulta emerge após um período de uma semana ou mais, pois seu desenvolvimento é dependente da temperatura e umidade, sendo que sob condições adversas, pode levar de semanas a meses para emergir (GREENBERG e GEORGE, 1972; SHERMAN, 1996; MARTINI e SHERMAN, 2003; THOMAS et al., 1999b).

A aplicação das larvas medicinais (também chamadas de larvas desinfectadas ou estéreis) é relativamente simples. As larvas jovens, medindo cerca de dois milímetros, já esterilizadas, são colocadas na ferida e cobertas por uma bandagem a fim de contê-las no local. Pode ser utilizada uma tela de “nylon” sobre as larvas e acima desta, uma camada de gaze para absorver o exsudato e o tecido liquefeito. O número de larvas aplicado na ferida depende de uma série de fatores como a idade e o tamanho das larvas, a quantidade de tecido necrosado e a extensão da ferida, sendo utilizadas em média, de cinco a dez larvas por centímetro quadrado de área lesada. As larvas devem ser removidas utilizando-se solução salina estéril, em no máximo três dias e, se

necessário, novas larvas poderão ser colocadas (SHERMAN e PECHTER, 1988; THOMAS et al., 1996; THOMAS, 1997; HINSHAW, 2000; SHERMAN et al., 2000)

A duração do tratamento vai depender da gravidade e da extensão da lesão, que deve ser observada quanto ao progresso de sua cicatrização. Entretanto, STEENVOORDE e JUKEMA (2004) analisaram os níveis de leucócitos, proteína C-reativa e taxa de sedimentação eritrocitária a fim de avaliar se estes podem ser indicadores para a descontinuidade da terapia larval. Eles observaram que apenas o nível leucocitário pode ser um parâmetro do grau de cicatrização, mas não pode substituir a avaliação clínica da ferida.

Segundo THOMAS et al. (1996) a faixa etária dos pacientes que recebem o tratamento larval varia de três a 90 anos ou mais. Entretanto, alguns consideram a idéia repulsiva, uma vez que as larvas estão associadas à sujeira, deterioração ou morte. Por outro lado, IVERSEN (1996) cita que esta limitação para a terapia larval na medicina humana, que é a resistência do paciente ao tratamento, não seria problema na medicina veterinária.

De acordo com MACDOUGALL e RODGERS (2004), a bioterapia é subutilizada e mal compreendida, havendo a necessidade de mais pesquisas qualitativas e quantitativas integrando os interessados nesta terapia, considerada por eles como uma alternativa eficaz no manejo de feridas.

## 2. Mecanismo de ação das larvas

Os mecanismos pelos quais as larvas promovem a cicatrização de feridas não são totalmente compreendidos, mas podem incluir a produção natural de agentes semelhantes aos antibióticos; a secreção de agentes com propriedades cicatrizantes como alantoína e uréia; a alcalinização do pH da ferida por meio da secreção de amônia e carbonato de cálcio ; a liquefação de tecido necrosado e a ingestão e destruição de bactérias como parte normal de seu processo de alimentação (ROBINSON e BAKER, 1939; ROBINSON, 1940; SHERMAN e PECHTER, 1988; MUMCUOGLU et al., 1998; THOMAS et al., 1999a; SHERMAN et al., 2000).

Na natureza, a mosca adulta deposita um grande número de ovos em matéria orgânica e feridas supurativas. As larvas, que eclodem após aproximadamente um dia, produzem uma potente mistura de enzimas proteolíticas incluindo a colagenase, que destróem os tecidos mortos transformando-os em conteúdo semi-líquido, que é ingerido pelas larvas. Esse potencial de digestão extra-corpórea é potencializado pela disposição das larvas que ficam agrupadas e se alimentam com a região cefálica voltada para baixo. As larvas possuem ganchos bucais que são utilizados para auxiliar na locomoção e promover o acesso aos tecidos. Microscopicamente pode ser observado que as larvas utilizam esses ganchos bucais para “escavar” a superfície do alimento, o que provavelmente possibilita a ruptura das membranas tissulares, permitindo a penetração de suas secreções proteolíticas (THOMAS et al., 1996; THOMAS et al., 1999b; SHERMAN et al., 2000).

SIMMONS (1935) observou inicialmente que alguns fatores poderiam contribuir, isoladamente ou em conjunto, para eliminar a infecção da ferida, tais como:

- A remoção mecânica das bactérias para fora da ferida, por meio da estimulação da drenagem promovida pelas larvas sobre os tecidos viáveis; a liquefação enzimática dos tecidos necrosados e conseqüente aumento da exsudação.

- A utilização dos tecidos necrosados como alimento pelas larvas, resultando em condições desfavoráveis para o crescimento bacteriano.

- A destruição das bactérias no interior do trato alimentar das larvas e o rápido desenvolvimento de tecido de granulação.

Entretanto, SIMMONS (1935) concluiu que tais fatores não eram suficientes para promover a completa ausência de infecção encontrada em alguns casos na terapia larval. Dessa forma, o autor desenvolveu um experimento onde testou a ação (*in vitro*) de excrementos de larvas esterilizadas de *Lucilia sericata*, sobre culturas de microorganismos de importância etiológica em infecções piogênicas, como o *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium welchii*, *Proteus vulgaris*, entre outros. O resultado encontrado foi que a exposição inibiu o crescimento dos microorganismos, concluindo que as excreções das larvas utilizadas em bioterapia possuem um potente agente bactericida. Para o autor, a efetividade demonstrada contra esses microorganismos *in vitro* explica o sucesso da bioterapia no tratamento da osteomielite, citado por alguns autores.

Por outro lado, PRETE (1997) comprovou o potencial dos efeitos da estimulação do crescimento tecidual pelas larvas em tecidos de mamíferos, realizando a exposição de uma cultura de fibroblastos humanos a extratos de larvas de *Phaenicia*=(*Lucilia*) *sericata*. Semelhante ao citado por SIMMONS (1935) há mais de 60 anos, ela concluiu que a cicatrização promovida pela terapia larval se deve a fatores como, a continua irrigação da ferida pelo abundante exsudato formado pelo hospedeiro em resposta a presença das larvas, liquefação dos tecidos necrosados, ingestão e digestão das bactérias e secreção de alantoína pelas larvas, rápida formação de tecido de granulação estimulada pelo contínuo movimento larval sobre a ferida.

ERDMANN e KHALIL (1986) realizaram a identificação de dois compostos antibacterianos, o Ácido Fenilacético (PAA) e o Fenilacetaldeído (PAL), isolados de uma cepa de *Proteus mirabilis* proveniente de larvas de moscas varejeiras *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel). Esses autores citam que o *Proteus mirabilis* foi isolado de glândulas salivares das larvas esterilizadas e também do fluído de feridas de animais infestadas por larvas de insetos. De acordo com ERDMANN (1987), o *P. mirabilis* é um endossimbionte em várias espécies de varejeiras fazendo parte de sua microflora normal, sendo benéfico a elas no sentido de controlar o microambiente interno e externo, inibindo o crescimento de outras bactérias que poderiam competir com as larvas ou tornar o ambiente da ferida inadequado à elas.

Segundo ERDMANN (1987), os compostos acima citados,

demonstraram ação bactericida quando incubados em uma solução contendo *Salmonella typhimurium*, inibindo o crescimento da mesma.

WOLLINA et al. (2002) investigando os efeitos, possíveis mecanismos de ação e efeitos colaterais da terapia larval em 30 pacientes com feridas na perna de origens variadas, concluíram que um possível modo de ação foi o aumento da oxigenação tecidual, mensurado por espectroscopia. Porém, segundo os autores, esta forma de ação necessita ainda de novos estudos.

### **3. História da terapia larval**

Os primeiros relatos do uso de larvas em feridas infectadas e gangrenosas datam de tempos muito antigos, como os dos índios Maias e tribos Aborígenes da Austrália. Um dos primeiros trabalhos escritos sobre a terapia larval é creditado a Ambróise Paré, um cirurgião militar francês em 1557. Também há relatos sobre D. J. Larrey, um cirurgião do exército de Napoleão, que em 1829 observou os efeitos benéficos da infestação de feridas de soldados por larvas de uma “mosca azul”. J. F. Zacarias, um cirurgião confederado da Guerra Civil americana em 1860, tornou-se o primeiro a utilizar as larvas de moscas varejeiras no tratamento de feridas, ao invés do tratamento convencional, relatando que a terapia larval era mais eficiente que os métodos comumente utilizados na época, sendo que muitos soldados foram salvos graças a ela (ERDMANN, 1987; HINSHAW, 2000; SHERMAN et al., 2000; MARTINI e SHERMAN, 2003).

O primeiro estudo científico sobre o uso medicinal de larvas de moscas foi realizado por W. S. Baer em 1928. Durante a primeira guerra mundial, Baer observou que dois soldados feridos que ficaram perdidos no campo de batalha por uma semana após a luta, tinham suas fraturas e feridas abdominais cheias de larvas, mas estas apresentavam granulação sem evidência de sepse (ERDMANN 1987; MARTINI e SHERMAN, 2003).

Alguns anos mais tarde, quando se tornou professor de Cirurgia Ortopédica da “John Hopkins Medical School”, Baer introduziu a terapia larval no tratamento de seus pacientes e documentou mais de 100 casos de

osteomielite crônica cujo tratamento foi apenas cirurgico e utilização de larvas na ferida (ERDMANN 1987; HINSHAW, 2000; SHERMAN et al., 2000). Nos resultados do tratamento em 87 pacientes, BAER (1931) relatou que, as larvas eliminavam minúsculos fragmentos ósseos e tecidos descamados pelo trauma cirúrgico, por meio de sua ação digestiva e em locais onde nenhum outro tratamento poderia alcançar, além de diminuir o crescimento de bactérias patogênicas e não causar reação tóxica como os tratamentos químicos.

Seguidas a essas experiências, o uso de larvas em feridas passou a ser comum na década de 1930, particularmente nos Estados Unidos da América, onde as larvas de *Lucilia sericata* eram produzidas comercialmente em grande número por uma companhia farmacêutica, Lederle®, aprovado pelo FDA (“Food and Drug Administration”). Esta forma terapêutica era realizada em mais de 300 hospitais até a metade da década de 1940, quando começou a ser substituída pelos novos antibióticos e técnicas cirúrgicas que se acreditavam ser superiores à terapia larval (SHERMAN, 1996b; THOMAS et al., 1999b, HINSHAW, 2000; SHERMAN et al., 2000).

O final do século 20 testemunhou, no mundo microbiano, o aparecimento de resistência a muitos antibióticos criados e talvez como consequência disto, a comunidade de saúde novamente se voltou para o uso das larvas de moscas (SHERMAN et al., 2000).

A terapia de desbridamento pelas larvas (TDL), como já relatado, tem sido utilizada por mais de 60 anos nos Estados Unidos para o tratamento

de feridas de tecidos moles. Atualmente ela está sendo também realizada com muito sucesso em outros países como Alemanha, Inglaterra, Holanda, Suécia, Bélgica e Israel (SHERMAN, 1996b; SHERMAN et al., 2000; MUMCUOGLU, 2001a; MARTINI e SHERMAN, 2003).

#### **4. Utilização da bioterapia em medicina humana e veterinária**

Inúmeros experimentos e relatos de caso têm sido descritos relatando a eficácia da terapia larval em medicina humana.

MUMCUOGLU (1997) relata o caso de um paciente diabético com ferida gangrenosa e osteomielite em região podal não responsiva a antibioticoterapia, ao qual já havia sido indicada a amputação, que obteve a cura após sete meses sendo tratado duas vezes por semana com a terapia larval. Este autor e seus colaboradores (MUMCUOGLU et al., 1999) realizaram um estudo dos casos de utilização da terapia larval em vários hospitais e clínicas em Israel.

No final da década de 90, COURTENAY (1999) traçou um perfil da utilização da bioterapia no Reino Unido (Inglaterra) e concluiu que esta vinha sendo utilizada em mais de 350 hospitais e instituições para o tratamento de feridas dos mais variados tipos. Mais recentemente, o mesmo autor e alguns colaboradores, realizaram o acompanhamento de 70 pacientes em nove hospitais da Inglaterra que foram tratados com sucesso por meio da terapia larval (COURTENAY et al., 2000)

Comparando o tratamento larval em úlceras venosas com terapias modernas como o hidrogel, WAYMAN et al. (2000) concluíram que a bioterapia se mostrou mais efetiva tanto no aspecto clínico, como em relação ao custo do tratamento.

WOLLINA et al. (2002) investigando os efeitos, possíveis mecanismos de ação e efeitos colaterais da biocirurgia, acompanharam 30

pacientes com feridas de origens variadas em membro pélvico, onde o desbridamento larval teve ação rápida e seletiva e o tratamento foi bem tolerado na maioria dos pacientes.

SHERMAN (2003), um pesquisador da Universidade da Califórnia, Irvine, Estados Unidos da América, publicou muitos artigos sobre a terapia larval em medicina humana, sendo talvez um dos maiores incentivadores desta opção terapêutica na atualidade. Em um de seus estudos, ele acompanhou dezoito pacientes diabéticos com feridas que não cicatrizavam, dos quais alguns grupos receberam tratamento convencional a base de curativos com gase umedecida em solução salina, antibióticos tópicos, hidrogel, hidrocolóide e debridamento cirúrgico e outro a bioterapia. O autor concluiu que, a bioterapia foi mais efetiva e eficiente em desbridar feridas diabéticas do que o tratamento padrão convencional para este tipo de ferida (SHERMAN, 2003).

HUSAIN e FALLAT (2003) relatam o caso de um paciente com ferida localizada no pé, provocada por extensiva perda tecidual decorrente de amputação transmetatarsial, a qual apresentou fechamento completo com o uso da terapia larval sem complicações adversas ou necessidade de outras intervenções.

Os pesquisadores ingleses, MACDOUGALL e RODGERS (2004) relatam um caso de sucesso onde a terapia larval, utilizada no tratamento de um paciente com ferida pós-cirúrgica necrosada e muito dolorosa, foi efetiva e segura no desbridamento tecidual, permitindo uma melhor cicatrização.

A terapia de desbridamento larval, apesar da grande importância científica e da bem sucedida utilização em humanos, com raras exceções, não tem sido aplicada na Medicina Veterinária (SHERMAN et al., 2000). Um dos poucos relatos a respeito da terapia larval na literatura veterinária é o experimento realizado por DICKE (1953). Ele utilizou larvas de moscas *Lucilia sericata* cultivadas em laboratório e não esterilizadas, no tratamento de uma lesão por Actinomicose na mandíbula de um bovino da raça Guernsey de seis anos de idade. Ele relata que, a lesão encontrava-se em estágio avançado, tendo surgido dois anos antes do estudo, apresentava aspecto de tumoração e inflamação, envolvendo estruturas adjacentes a ela e dificultando a respiração e ingestão de alimentos pelo ruminante. Apesar do estado debilitado do animal, alguns dias após o início da terapia larval, ele já era capaz de se alimentar e após três meses já havia recuperado sua condição física e capacidade respiratória.

Segundo HINNSAW (2000), as escoriações ou cortes infectados assim como as fraturas decorrentes do confinamento de grandes animais, podem ser tratados pela terapia larval, reduzindo o uso de antibióticos na medicina veterinária e conseqüentemente, os resíduos destes na carne e leite. Por outro lado, a utilização de antibióticos no tratamento de feridas em equinos afeta o delicado balanço normal da flora gastrintestinal, o que na terapia larval não ocorreria. Os animais de companhia também podem ser beneficiados com a bioterapia no tratamento de certos tipos de tumores benignos ou malignos como ocorre na espécie humana, quando seus

proprietários não tem condições de pagar um tratamento cirúrgico ou quimioterápico de alto custo. Entretanto, segundo o autor, a medicina veterinária parece estar muito atrás da medicina humana na utilização da terapia larval.

IVERSEN (1996) relata que, a bioterapia tem sido utilizada no tratamento de úlceras crônicas e feridas purulentas e fistuladas, produzidas por equipamentos de trabalho de grandes animais, como cangas, arreios e selas, que não respondem a outro tipo de tratamento.

Uma vez que a terapia larval é freqüentemente empregada em processos infecciosos ou destrutivos persistentes, os pacientes tratados geralmente recebem concomitantemente uma antibioticoterapia oral ou parenteral (SHERMAN et al., 1995).

Segundo KNOWLES et al. (2001) a terapia larval tem sido utilizada há muitos anos no “Manchester Diabetic Center” (Manchester, Estados Unidos da América) para debridamento de úlceras diabéticas nos pés. Eles relatam o caso de um paciente com ferida diabética associada a grave infecção secundária e osteomielite, tratado com a bioterapia associada a antibioticoterapia a base de Clindamicina e Ciprofloxacina, onde não há citação de que estes fármacos tenham interferido na ação das larvas.

Em um caso relatado por CHAFFEY (1997), uma paciente com ferida causada por picada de inseto tratada pela terapia de debridamento larval, recebeu concomitantemente antibioticoterapia intravenosa durante certo período, e esta não interferiu na ação das larvas sobre a ferida, sendo o

tratamento concluído com grande sucesso. De acordo com HINSHAW (2000) as larvas podem ser utilizadas concomitantemente ao tratamento convencional com antibióticos sistêmicos.

Entretanto, os efeitos dos fármacos antibióticos sobre as larvas de moscas usadas na biocirurgia são ainda pouco conhecidos. SHERMAN et al. (1995b) testaram *in vitro* o efeito de sete antibióticos, Ampicilina, Cefazolina, Ceftizoxima, Clindamicina, Gentamicina, Mezlocilina e Vancomicina, utilizados no tratamento de feridas de pele em humanos, sobre o crescimento e desenvolvimento de larvas de *Lucilia sericata*, utilizadas em bioterapia. Eles concluíram que as doses que promoveram uma maior mortalidade das larvas estão acima das eventualmente prescritas para tratar infecções em pacientes humanos, e que as larvas são capazes de sobreviver e promover a cicatrização na ferida normalmente, a despeito da presença de componentes antimicrobianos.

Porém, os fármacos testados no estudo acima citado, com exceção da Ampicilina, não são os mais comumente utilizados para o tratamento de feridas em pequenos animais, nem tampouco as doses utilizadas são as mesmas para humanos e animais.

## 5. Justificativa e objetivo

Até o presente momento não se tem relato da utilização da bioterapia em animais de companhia como cães e gatos e poucos relatos a respeito desta terapia em outros animais domésticos, conforme citado anteriormente. Além disso, em virtude das feridas que ocorrem na pele desses animais serem muito contaminadas na sua maioria, algumas vezes o clínico terá que fazer uso de algum fármaco antimicrobiano para auxiliar a cicatrização, mesmo optando em fazer uso da terapia larval, e neste caso, a falta de dados a respeito da influência dos antibióticos sobre as larvas e sua ação nas feridas, pode ser um fator limitante.

Os principais microorganismos isolados nas feridas de pequenos animais são os *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos, *Pasteurella* spp. e *Escherichia coli*, além dos anaeróbicos como os Bacteroides, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium* e *Actinomyces*. Esses patógenos são comumente encontrados principalmente nos ferimentos por mordedura, visto que nesses casos ocorre a introdução de bactérias orais sob a pele, mas também em feridas cirúrgicas (ROSIN et al., 1998).

Segundo ROSIN et al. (1998), a sensibilidade antimicrobiana dos principais microorganismos presentes nas feridas de pele de pequenos animais, *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*, aos antibióticos comuns pode ser bastante variável de acordo com o fármaco escolhido. Em um estudo, a Ampicilina mostrou uma efetividade de 37% e 55% contra os *Staphylococcus* spp. e *E. coli*, respectivamente, enquanto que tanto a

Cefalotina como a Cefalexina apresentaram 99% e 67% de efetividade, respectivamente, contra os microorganismos citados. De acordo com o autor, a seleção dos antibióticos deve ser realizada considerando-se tanto a sua efetividade contra o provável patógeno, como outros fatores como a toxicidade, o preço e a administração mais conveniente. A escolha pode basear-se nos resultados de cultura e testes de sensibilidade, ou preferencialmente tomar como base os dados acumulados dos registros da clínica.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo selecionar uma espécie apropriada para a prática da terapia larval em nosso meio, bem como testar a ação de alguns fármacos antibióticos utilizados na rotina da clínica de pequenos animais, sobre o crescimento e desenvolvimento de dípteros da família Calliphoridae, que se alimentam de tecidos em decomposição e que tem facilidade de adaptação às condições climáticas do Brasil.

Os fármacos testados no presente trabalho foram selecionados com base no que a literatura apresenta como sendo efetivos, assim como na frequência de utilização dos mesmos no tratamento de feridas de animais atendidos no Hospital Veterinário Vicente Borelli, da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB) em São João da Boa Vista, São Paulo, a saber: Ampicilina, Amoxicilina, Cefalexina e Cefalotina.

## II- BIOENSAIO COM ANTIBIÓTICOS

### 1. Utilização de antibióticos na dieta de insetos

A obtenção de larvas para utilização em bioterapia, assim como para outros fins experimentais depende da criação e manutenção dos insetos em laboratório, alimentados com dietas artificiais. Segundo FYTIZAS e TZANAKAKIS (1965), é muito importante que se consiga um método eficaz de produção de insetos em massa e o maior fator que pode tornar uma criação insatisfatória e algumas vezes inviável, é a contaminação da colônia por bactérias.

SINGH e HOUSE (1970b) escreveram que, os avanços recentes na produção de insetos em massa com dietas sintéticas tem enfatizado a necessidade por culturas com um padrão de qualidade para pesquisas entomológicas, pois as dietas sintéticas são altamente suscetíveis ao ataque de bactérias, fungos, leveduras e vírus que promovem a deterioração das mesmas, corrompendo a cultura de insetos.

Alguns experimentos tem sido realizados utilizando a adição de antimicrobianos nas dietas artificiais de larvas de insetos, tanto no sentido de prevenir a contaminação destas por microorganismos, como para testar a ação desses fármacos no desenvolvimento e maturação das larvas. Para prevenir a contaminação, compostos antimicrobianos são freqüentemente adicionados a dietas sintéticas e apesar de serem amplamente utilizados, pouco se sabe a respeito dos seus efeitos no organismo do inseto, e poucas referências tem

sido encontradas sobre isso. Os resultados destas pesquisas são contraditórios entre si, ou seja, alguns compostos são prejudiciais aos insetos e outros não.

Com o intuito de mantê-las vivas até a pupariação a fim de desenvolver estratégias de controle, CHAMBERLAIN e SCHOLL (1991) realizaram um estudo com larvas de *Hypoderma lineatum* (Villers) (Díptera: Oestridae), coletadas de miíases de bovinos no Texas. Após coletadas, as larvas sofreram sucessivas lavagens em solução salina estéril 0,9% e soluções antibióticas, e foram colocadas em vários meios artificiais contendo Penicilina, Sulfato de Estreptomicina, Nistatina e Cloranfenicol. Os autores observaram que nos meios contendo o Cloranfenicol, as larvas jovens conseguiram alcançar o estágio de pupa aparentemente porque o antibiótico preveniu o crescimento de bactérias resistentes à Penicilina e à Estreptomicina, bactérias estas identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (CHAMBERLAIN, 1989).

SINGH e HOUSE (1970b) utilizando larvas de *Agria affinis* (Fallen) (Diptera: Sarcophagidae) criadas sob condições assépticas e dietas químicas, realizaram um experimento onde, vinte e um componentes antimicrobianos foram adicionados na dieta sintética das moscas, a fim de determinar os efeitos gerais desses fármacos sobre as larvas e os níveis seguros de utilização dos mesmos na prevenção da contaminação de culturas de insetos. Entre eles, alguns antibióticos como a Aureomicina, Bacitracina, Pencilina G potássica, Estreptomicina e Terramicina foram testados em doses crescentes, no total de cinco doses e um controle para cada um deles. Os autores

observaram que cada fármaco exerceu efeitos deletérios de acordo com a concentração utilizada, estabelecendo uma classificação para cada um deles nas seguintes categorias: nível seguro, nível inibitório primário, nível inibitório secundário e nível tóxico. Foram usadas 25 larvas em cada teste e o mesmo foi repetido três vezes. As larvas foram examinadas diariamente por dez dias sendo observados a taxa de crescimento e desenvolvimento e a mortalidade (SINGH e HOUSE, 1970b).

Os autores adotaram critérios arbitrários para classificar os antimicrobianos de acordo com seus efeitos, a saber:

- 1- Nível seguro: a taxa de crescimento e desenvolvimento das larvas não foi prolongada mais que 25% em relação ao grupo controle, e o produto das pupas e adultos foi normal.
- 2- Nível inibitório primário: comparado ao grupo controle, o período larval foi prolongado mais do que 25%, mas pelo menos 50% das larvas chegaram ao 3º estágio ao 10º dia.
- 3- Nível inibitório secundário: a mortalidade das larvas foi menor que 25% e menos de 50% chegaram ao 3º estágio ao 10º dia.
- 4- Nível tóxico: a mortalidade das larvas foi maior ou igual a 25%.

A conclusão desta pesquisa assegura que um mesmo antimicrobiano adicionado a dietas sintéticas pode ser seguro, inibitório ou altamente prejudicial dependendo da concentração utilizada, influenciando a taxa de desenvolvimento larval assim como a pupariação e a emergência de adultos (SINGH e HOUSE, 1970b).

O papel dos microorganismos apossimbióticos no intestino dos insetos é bem conhecido. Sabe-se que muitas espécies de insetos, uns mais outros menos, dependem das atividades destes microorganismos em seu intestino como nutrientes suplementares ou para auxiliar nos processos digestivos. Por conta desses benefícios, a destruição dos microorganismos por certos antimicrobianos pode ser indiretamente prejudicial a seus insetos hospedeiros, sendo que a alteração no desenvolvimento dos insetos pode advir desse fato e não propriamente da ação direta dos antimicrobianos (SINGH e HOUSE, 1970b).

HAGEN (1963) (*apud* FYTIZAS e TZANAKAKIS, 1966) trabalhando com adultos de *Dacus oleae* (Gmelin) (Tephritidae) que eram alimentados com dietas contendo a Estreptomicina observou que, embora a longevidade dos insetos fosse maior, sua progênie não era capaz de se desenvolver em larvas, em virtude da ausência de bactérias simbióticas necessárias para a digestão da proteína da fruta de oliva.

Por outro lado, FYTIZAS e TZANAKAKIS (1966) adicionando um quinto da dose de Estreptomicina utilizada por HAGEN (1963) na dieta do mesmo inseto, relataram que esta não aumentou a longevidade dos adultos, mas neste caso, houve crescimento das larvas de sua progênie.

Estes experimentos mostram que os efeitos dos antimicrobianos dependem também da espécie do inseto. SINGH e HOUSE (1970b) sugerem que os antimicrobianos sejam usados com cautela em dietas sintéticas de insetos, determinando-se o nível seguro para cada composto e cada espécie de

inseto, de modo que sejam minimizados os efeitos prejudiciais aos estágios imaturos.

BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN (2002) testaram os efeitos de 13 agentes antimicrobianos sobre a sobrevivência e desenvolvimento de larvas de *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae), um endoparasitóide utilizado no controle biológico de muitos lepidópteros, a fim de prevenir a contaminação microbiana na cultura deste inseto. Os agentes antimicrobianos testados foram: Tetraciclina, Cloranfenicol, Eritromicina, Trimetoprim, Penicilina, Estreptomicina, Rifampicina, Lincomicina, entre outros. Foram colocadas dez larvas em cada dieta, cada teste foi repetido três vezes e realizado um controle para cada teste. O experimento foi realizado sob as mesmas condições de laboratório utilizadas na cultura das linhagens de *P. turionellae* não testadas. Os efeitos foram mensurados pela determinação da taxa de desenvolvimento e sobrevivência das larvas.

Os agentes antimicrobianos testados não apresentaram efeitos regulares. A Estreptomicina por exemplo, na concentração mais alta (40 miligramas em 100 mililitros da dieta), retardou significativamente o desenvolvimento das larvas para o estágio de adulto, não afetando contudo a sobrevivência das mesmas. Por outro lado, na dieta com o nível mais baixo de Tetraciclina, ou seja, 15 miligramas em 100 mililitros da dieta, foi observado um ligeiro aumento na porcentagem de sobreviventes no estágio de pupas. De maneira geral, nenhum dos agentes testados foi tóxico para os insetos (BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN, 2002).

Outro fator que influencia a ação de agentes antimicrobianos sobre as larvas de insetos é que, a quantidade de antimicrobiano ingerido pode mudar o pH e a pressão osmótica do intestino do inseto; a pressão osmótica no intestino médio é muito mais baixa do que nas outras porções do canal alimentar da larva e o pH é muito próximo do neutro. Uma vez que o intestino médio é o principal responsável pela absorção de nutrientes, essas mudanças conseqüentemente irão afetar a absorção do próprio agente (BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN, 2002).

SHERMAN (1995b), um médico que utiliza terapia larval no tratamento de feridas de pele em humanos escreveu que, indivíduos que recebem a terapia de desbridamento larval freqüentemente recebem uma terapia antimicrobiana concomitantemente, seja para tratamento de infecções já estabelecidas ou para profilaxia contra bacteremias.

Sendo assim, juntamente com mais dois pesquisadores, WYLE e THRUPP, SHERMAN realizou um experimento a respeito da ação de sete antibióticos sobre o crescimento e desenvolvimento das larvas e pupas de *Lucilia sericata*, utilizadas em bioterapia. Os fármacos escolhidos foram os mais utilizados no tratamento de infecções de pele e tecidos moles em humanos, sendo estes pertencentes às classes das Penicilinas, Cefalosporinas e Aminoglicosídeos. Estes foram adicionados em meio agar-fígado em várias concentrações, onde foram colocadas as larvas de um dia e observados os resultados em relação a maturação das mesmas, número de pupas e adultos, duração de cada estágio e peso das pupas. Foram realizadas três replicatas e

um controle para cada antibiótico testado (SHERMAN et al., 1995b).

Os autores concluíram que, semelhante ao que ocorria na sua experiência clínica, quando não observaram interferência sobre a ação das larvas na ferida em pacientes que recebiam a terapia larval juntamente com antibióticos, nenhum dos antibióticos testados impediu o crescimento larval, nem tampouco a sua maturação *in vitro*.

Conforme citado anteriormente, alguns antibióticos foram testados no presente trabalho de maneira semelhante ao descrito por SHERMAN et al. (1995), com o objetivo de selecionar o fármaco e a dose mais adequados a serem utilizados em conjunto com a terapia larval em animais de companhia, isentos de efeitos prejudiciais sobre a ação das larvas na ferida.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Local da pesquisa:**

A pesquisa foi realizada no laboratório de Entomologia da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos - UNIFEOB em São João da Boa Vista, São Paulo.

### **2.2. Coleta de material**

Foram coletados exemplares de dípteros presentes na região, sendo estes isolados e criados em laboratório em condições de se reproduzirem de forma semelhante ao que ocorre em ambiente natural, dando origem à várias gerações.

Foram selecionadas espécies de moscas da família Calliphoridae para a produção de larvas, por apresentarem características de um desenvolvimento rápido para colonização em laboratório. Experimentos prévios demonstraram que, em nosso meio, as espécies *Lucilia cuprina* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) são as mais indicadas tanto por apresentarem as características acima, como por serem adequadas a utilização em bioterapia, uma vez que se alimentam de tecido necrosado. Segundo LINHARES (1981), os califorídeos são as espécies mais abundantes em nossa região e BAUMGARTNER e GREENBERG (1984) demonstraram a extensa distribuição de *C. putoria* entre os estados de São Paulo e Paraná.

Inicialmente foi realizada a captura de moscas no aterro sanitário de

São João da Boa Vista, estado de São Paulo, utilizando armadilhas cilíndricas com iscas à base de vísceras de frango putrefeitas. A armadilha utilizada encontra-se descrita por FERREIRA (1978), sendo relatado por LINHARES (1981) que a víscera de frango putrefeita foi a isca mais atrativa para os Califorídeos.

As duas espécies referidas foram separadas de acordo com sua morfologia externa. Entretanto, *Lucilia cuprina* provavelmente não se adaptou às condições do nosso laboratório, não ocorrendo a proliferação da cultura. Dessa forma, o experimento foi realizado utilizando-se apenas *Chrysomya putoria*.

### **2.3. Criação e manutenção das larvas e adultos**

A criação e manutenção dessa espécie em laboratório com o desenvolvimento em meios artificiais, visa simplificar o processo de manutenção das moscas, bem como tornar a atividade o mais elegante possível isto é, sem mau cheiro ou repugnância. As moscas foram mantidas em condições apropriadas para procriarem, a fim de propiciar a manutenção da colônia e a realização dos testes.

As colônias de moscas foram colocadas em gaiolas trapezoidais de ferro, revestidas com telas de “nylon”, semelhante ao modelo utilizado por SHERMAN e WYLE (1996), e também em gaiolas confeccionadas com recipientes plásticos de cuja tampa foi retirado um segmento com forma retangular e substituído por tela de “nylon”. Em uma das laterais foi colocado

um tecido em formato de “manga de camisa”, através de uma abertura realizada para este fim, com o objetivo de facilitar a manipulação dos recipientes de alimento e água, evitando a fuga das moscas durante quaisquer procedimentos realizados nas gaiolas (figura 1).



**Figura 1. Gaiolas utilizadas na criação de moscas**

As moscas foram alimentadas com uma mistura a base de leite em pó, açúcar e levedo de cerveja em partes iguais, dieta preconizada por LEAL et al. (1982), colocada em uma placa de Petri medindo de oito a dez centímetros de diâmetro, em uma quantidade de aproximadamente 15 gramas. A água foi colocada em recipiente plástico tampado, sendo feito um orifício no centro da tampa por onde foi introduzida uma gaze, que ficava com uma extremidade imersa na água e a outra externamente recobrimdo a tampa, de

forma que as moscas pudessem pousar sobre a tampa e ingerir a água embebida na gaze, com mais segurança (figura 2). Tanto a água quanto o alimento foram oferecidos à vontade e trocados a cada 48 a 72 horas dependendo da condição dos mesmos, sendo observado que nos períodos mais quentes, a deterioração do alimento e o ressecamento da gaze ocorreram mais rapidamente.



**Figura 2. Recipientes contendo alimento e água**

O material utilizado para oviposição foi fígado bovino fresco, conforme preconizado por MUMCUOGLU (2001b), na quantidade de aproximadamente 10 gramas por gaiola. Durante o processo de oviposição as moscas eram observadas diariamente. Após a postura, os ovos eram retirados do fígado e transferidos para papel filtro umedecido em água destilada

acondicionados em placas de Petri (5cm de diâmetro x 2cm de altura), conforme descrito por MILWARD-DE-AZEVEDO et al. (1995), facilitando a separação e retirada de resíduos dos mesmos. A eclosão das larvas era esperada após 12 a 24 horas.

As larvas eram então colocadas em meio apropriado, preconizado por LEAL et al. (1982), conforme abaixo:

Leite em pó	10,0 g
Levedo de cerveja	10,0 g
Caseína	0,5 g
Ágar	2,0 g
Nipagin	0,4 g
Água destilada	100,0 ml

O volume total do meio descrito acima era em torno de 100 ml, suficiente para dois recipientes (50 ml), sendo colocadas aproximadamente 60 larvas em cada um. De acordo com o indicado por MILWARD- DE-AZEVEDO et al. (1995), o recipiente contendo o meio com as larvas foi colocado em frascos plásticos contendo serragem para que as larvas maduras, após abandonarem espontaneamente a dieta, caíssem sobre a serragem que serve como substrato para a pupariação.

#### 2.4. Bioensaio com os antibióticos

Foi testada a ação de alguns antibióticos sobre o desenvolvimento das larvas de *Chrysomya putoria*, sendo que a seleção dos mesmos teve por base a frequência de utilização destes nos animais que apresentaram feridas de pele atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos - UNIFEOB, São João da Boa Vista, São Paulo. Foram avaliados os efeitos sobre a espécie citada dos seguintes antibióticos: Ampicilina (Purifarma®), Amoxicilina (Farmácia Extrato Natural), Cefalexina (Purifarma®) e Cefalotina (EMS®).

O meio utilizado como substrato para as larvas foi uma modificação do meio proposto por LEAL et al. (1982), conforme apresentado a seguir:

Leite em pó	10,0 g
Levedo de cerveja	10,0 g
Caseína	1,0 g
Ágar	2,0 g
Nipagin	2,0 g
Fígado bovino cru	30,0 g
Água destilada	200,0 ml

As modificações realizadas foram no volume de água destilada que passou a ser de 200 mililitros, na quantidade de caseína que passou a ser de um grama e de Nipagin, aumentado para dois gramas. Além disso, foi também adicionado a estes ingredientes o fígado bovino cru na quantidade de 30

gramas. Estas modificações ocorreram em virtude de ter sido observado após alguns testes pilotos, ser este o meio ideal nas condições de temperatura e umidade do local da pesquisa.

Os ingredientes citados acima foram pesados previamente e estocados. O ágar foi colocado em recipiente separado em virtude de ser cozido antes de adicionado ao preparo. O fígado foi pesado, embalado em papel filme e após congelado na quantidade correta, de modo a ser descongelado antes da preparação de cada meio. O antibiótico também foi pesado separadamente, mas apenas na hora do preparo em virtude da melhor conservação das propriedades farmacológicas quando estocado na embalagem própria.

Os meios foram preparados misturando-se os ingredientes em liquidificador, conforme descrito abaixo:

- o fígado era batido em primeiro lugar com uma pequena quantidade da água destilada, coado e reservado; após o liquidificador era enxaguado para retirada dos resíduos, pois foi observado anteriormente pelo autor que estes resíduos, quando presentes no meio, prejudicavam a alimentação das larvas, além de causar a morte de algumas que ficavam presas ao se moverem entre eles;

- a mistura dos outros ingredientes, exceto o ágar, assim como o fármaco a ser testado eram adicionados ao fígado e batidos durante dois a três minutos;

- o ágar era diluído no restante da água, aquecido até dissolver e

adquirir consistência gelatinosa e então, adicionado à mistura, sendo tudo batido por aproximadamente 30 segundos.

A quantidade necessária do respectivo antibiótico foi diluída em água destilada e reservada antes de se iniciar o preparo, sendo descontado este volume do volume total de água utilizado na mistura do meio, a fim de que não ocorressem alterações em sua consistência que pudessem interferir no desenvolvimento das larvas e, conseqüentemente, nos resultados do experimento.

O antibiótico foi misturado ao meio em proporções que permitissem obter as concentrações a serem testadas, conforme descrito por SHERMAN et al. (1995b). Cada cota do meio referido anteriormente foi dividida igualmente em frascos plásticos, contendo cada um deles aproximadamente 50 mililitros do meio. Estes foram colocados em geladeira por algumas horas para se obter uma consistência mais firme, podendo ser armazenados por um período máximo de 24 horas. Cada cota foi suficiente para quatro alíquotas do meio, de forma que a quantidade do fármaco adicionada a uma cota de meio, foi multiplicada por quatro a fim de que cada frasco estivesse contendo o volume correto a ser testado do respectivo fármaco. Os meios de controle foram preparados de maneira idêntica, exceto pela omissão do antibiótico.

O volume de meio em cada frasco foi calculado de modo a formar uma camada de um centímetro (figura 3), sendo que o número ideal de larvas em cada um foi de 60 larvas ( $n= 60$ ), uma vez que uma quantidade muito grande de larvas numa área pequena poderia levar a fuga das mesmas para

fora do meio, conforme descrito por BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN (2000). Foram realizadas três replicatas e um controle para cada teste.

Simultaneamente à preparação dos meios, o material utilizado para oviposição foi colocado nas gaiolas contendo as moscas, sendo estas observadas para verificação em relação à presença de ovos. O fígado bovino cru foi armazenado sob congelamento, mas no dia anterior à sua utilização era colocado sob temperatura de refrigeração (8-10° C) e transferido para o meio ambiente duas a três horas antes de ser colocado nas gaiolas. De modo semelhante ao que foi descrito na manutenção da colônia, as massas de ovos foram recolhidas do fígado após a postura e transferidas para papel filtro umedecido em água destilada, alocados em placas de Petri.

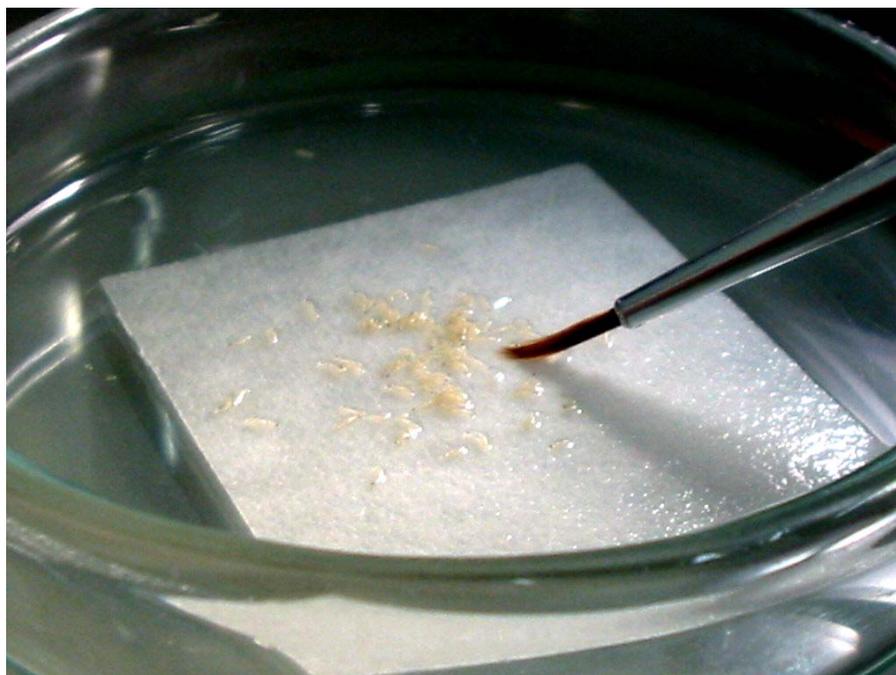


**Figura 3. Frascos de meio teste (Amoxicilina) e controle**

A eclosão das larvas era esperada após 12 a 24 horas, dependendo da temperatura ambiente. Nos dias ou horários de temperatura mais baixa, a placa foi colocada próxima a um aquecedor de ambiente para facilitar a eclosão das larvas. Após ser observado a eclosão das larvas, os meios foram retirados da geladeira e deixados até atingirem a temperatura ambiente.

Para o procedimento de contagem e observação das larvas a serem inoculadas, foi utilizado um retalho quadrado de papel filtro medindo aproximadamente três centímetros de lado, umedecido em água destilada e colocado em placa de Petri levada a uma lupa em aumento de dez vezes. Para cada frasco com meio a ser inoculado, as larvas foram separadas com pincel fino e delicadamente transferidas para o papel filtro a fim de serem contadas (n=60) e observadas quanto à sua viabilidade e vitalidade através da rapidez de movimentação (figura 4). Foram utilizadas as larvas de primeiro estágio.

Com o uso de uma pinça fina, pequenos sulcos foram feitos na superfície do meio a fim de quebrar a tensão superficial e facilitar a penetração das larvas (figura 5). Após isso o papel filtro foi então colocado sobre o meio, com a superfície contendo as larvas voltada para baixo. No dia seguinte esse papel foi retirado do meio.

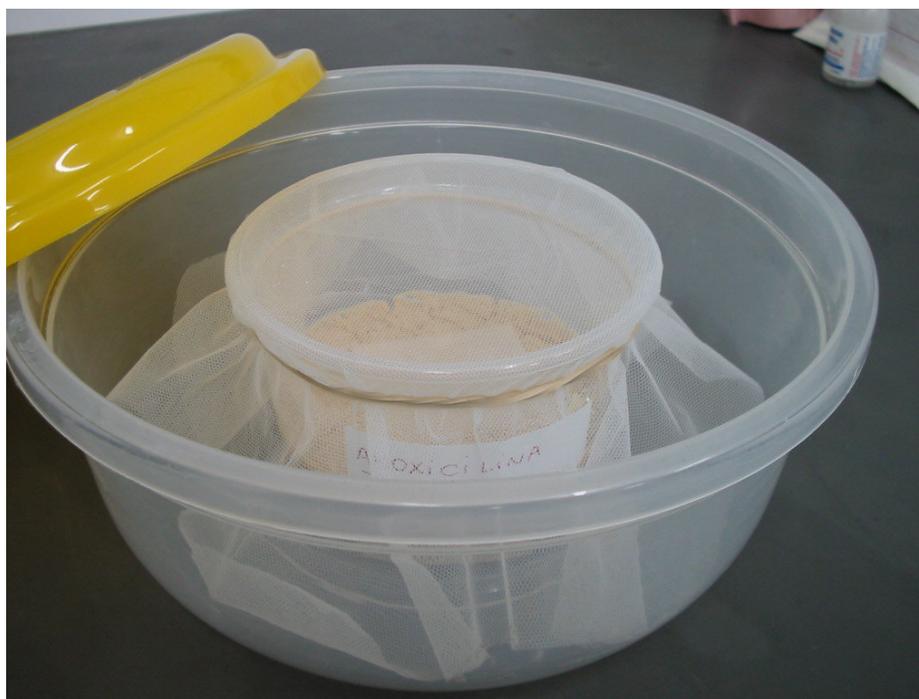


**Figura 4. Contagem e observação das larvas em placa de Petri**



**Figura 5. Sulcos na superfície do meio**

Os frascos contendo os meios inoculados foram cobertos com organza, fixado com elástico ao redor da borda e colocados em recipientes plásticos com tampa própria, na qual foram feitos pequenos orifícios para entrada de ar (figura 6). Todos os recipientes contendo os meios foram identificados com data, fármaco a ser testado, número e a marcação como controle ou teste. Estes foram acondicionados em isopor fechado com tampa e vedado com fita adesiva, equipado com lâmpadas, termostato regulado em temperatura de 26 a 28 graus e termômetro com registro de temperatura máxima e mínima (figura 7). Foi realizada a observação diária dos meios em relação ao desenvolvimento larval, quando anotava-se a temperatura ambiente interna do isopor, e a data de ocorrência da pupariação.



**Figura 6. Frasco coberto com organza**



**Figura 7. Isopor contendo os recipientes com os meios**

Entre o quarto e sexto dias, o tecido que recobria os frascos foi retirado e colocada então a serragem no fundo dos recipientes plásticos, para que as larvas maduras pudessem deixar o meio e cair na serragem para pupariação. Esse procedimento foi assim realizado, pois observou-se nos testes piloto que algumas larvas conseguiam deixar o meio mesmo com o frasco recoberto e, ao caírem muito jovens na serragem, acabavam morrendo. Ao contrário, com o recipiente limpo, foi possível reintroduzí-las no meio sem maiores complicações. A variação do período de retirada do tecido e colocação de serragem (quatro a seis dias) foi devido ao fato de algumas

larvas atingirem a maturação antes das outras, sendo isto observado mais freqüentemente nos meios controle.

Após todas as larvas empuparem, estas foram retiradas da serragem, contadas, pesadas para posterior análise estatística dos dados.

Inicialmente foi utilizada a dose mínima de cada fármaco preconizada para cães por ANDRADE (2002), relacionada a um peso vivo aleatório de 15 quilogramas, conforme descrito na Tabela 1.

**Tabela 1. Dose preconizada para cães e concentração inicial de fármaco adicionada ao meio**

<b>Fármaco</b>	<b>Dose em cães (mg/Kg)</b>		<b>Concentração adicionada em 50 ml do meio</b>
	<b>Mínima</b>	<b>Máxima</b>	
Ampicilina:	10	20	150mg
Amoxicilina:	6	20	90mg
Cefalexina:	10	30	150mg
Cefalotina:	50	100	750 mg

Nos testes onde a sobrevivência e desenvolvimento das larvas foram satisfatórios, a dose do antibiótico foi duplicada e repetidos os testes, e assim sucessivamente até encontrar uma dose letal. No caso da primeira amostra já ter apresentado um efeito indesejável sobre a sobrevivência das larvas, foram realizados testes diminuindo a dose do antibiótico até encontrar o limite mais baixo onde não houvesse interferência no desenvolvimento e sobrevivência das mesmas.

No protocolo da Ampicilina, a dose inicial (dose 1) foi de 150 mg, ou seja, 3 mg/ml do meio, sendo após duplicada para 300 mg (6 mg/ml) (dose 2), 600 mg (12 mg/ml) (dose 3) e posteriormente para 1200 mg (24 mg/ml) (dose 4) (Tabela 2).

Em relação ao protocolo da Amoxicilina, a dose inicial (dose 1) foi de 90 mg (1,8 mg/ml), sendo duplicada para 180 mg (3,6 mg/ml) (dose 2), 360 mg (7,2 mg/ml) (dose 3) e posteriormente para 720 mg (14,4 mg/ml) (dose 4), conforme descrito na Tabela 3.

Em virtude de ter sido observado nos protocolos da Cefalexina e Cefalotina que a mortalidade entre uma dose e outra (duplicada) apresentou uma diferença muito grande, foi instituído um protocolo com a média entre as respectivas doses. Sendo assim, para a Cefalexina a dose inicial (dose 1) foi de 150 mg (3 mg/ml), duplicada para 300 mg (6 mg/ml) (dose 2) e posteriormente para 600 mg (12mg/ml) (dose 4). A dose 3 foi de 450 mg (9 mg/ml), sendo a intermediária entre as doses 2 e 4 (Tabela 4).

Para o protocolo da Cefalotina a dose inicial foi de 750 mg (15 mg/ml) (dose 2). Entretanto nesta dose já foram observados efeitos indesejáveis sobre a sobrevivência e desenvolvimento das larvas. Desse modo, a dose foi reduzida à metade, ou seja, 375 mg (7,5 mg/ml) (dose 1), mas também foi duplicada para 1500 mg (30 mg/ml) (dose 4), a fim de se manter um padrão de quatro doses para cada tratamento. A dose 3, 1125 mg (22,5 mg/ml) foi a média entre as doses 2 e 4, conforme citado anteriormente (Tabela 5).

**Tabela 2. Concentrações de Ampicilina testadas**

<b>Dose</b>	<b>Concentração total (mg)</b>	<b>Concentração / ml</b>
1	150	3
2	300	6
3	600	12
4	1200	24

**Tabela 3. Concentrações de Amoxicilina testadas**

<b>Dose</b>	<b>Concentração total (mg)</b>	<b>Concentração / ml</b>
1	90	1,8
2	180	3,6
3	360	7,2
4	720	14,4

**Tabela 4. Concentrações de Cefalexina testadas**

<b>Dose</b>	<b>Concentração total (mg)</b>	<b>Concentração / ml</b>
1	150	3
2	300	6
3	450	9
4	600	12

**Tabela 5. Concentrações de Cefalotina testadas**

<b>Dose</b>	<b>Concentração total (mg)</b>	<b>Concentração / ml</b>
1	375	7,5
2	750	15
3	1125	22,5
4	1500	30

Os dados foram submetidos à análise estatística, realizando-se uma ANOVA de dois fatores. As variáveis independentes foram o tipo de antibiótico e a concentração utilizada. A resposta foi a sobrevivência das larvas.

As médias de cada protocolo de dose de um mesmo antibiótico e as médias entre os quatro antibióticos foram comparadas por meio do teste de comparações múltiplas de DUNCAN. O experimento foi padronizado em quatro doses para cada fármaco, a fim de que cada dose fosse comparada à outra entre os diversos tratamentos.

Foram feitas ANOVAs de um fator para cada tipo de antibiótico. A variável independente foi a dose e a resposta foi a sobrevivência das larvas até a fase de pupa. Para cada concentração foi realizada também uma análise de variância de um fator. A variável independente foi o tipo de antibiótico e a resposta foi a sobrevivência das larvas. Nos dois casos, as médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de DUNCAN.

Todos os testes estatísticos foram feitos utilizando-se o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS® (SAS Institute Inc., 1996).

A variação entre as médias de peso de pupas foi analisada por meio do Teste t de Student.

### 3. Resultados

A análise estatística dos dados revelou, em relação a Ampicilina, que a maior sobrevivência, ou seja, a maior porcentagem de pupariação, foi observada na dose 1 (3 mg/ml), uma vez que esta estatisticamente não apresentou diferença em relação ao grupo controle. Na dose 2 (6 mg/ml) foi observada uma sobrevivência um pouco menor, entretanto a mortalidade não foi significativa, embora já tenha apresentado diferença estatística em relação ao controle ( $F= 314,27$ ;  $p < 0,01$ ). A mortalidade das larvas sofreu um aumento proporcional ao aumento da dose do fármaco, sendo que na dose 3 (12 mg/ml) foi de 55,42% e na dose 4 (24 mg/ml) de 69,17%. A Tabela 6 mostra a variação da sobrevivência das larvas entre as diferentes doses de Ampicilina, assim como entre o peso das pupas.

**Tabela 6. Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Ampicilina**

Dose	Concentração (mg/ml)	Nº de pupas média $\pm$ dp	Peso de pupa média $\pm$ dp	% de pupariação
1	3	59,75 $\pm$ 0,50 (A)	32,94 $\pm$ 3,08	99,58
C	0	57,93 $\pm$ 2,43 (A)	29,04 $\pm$ 3,33	96,55
2	6	54,25 $\pm$ 1,25 (B)	26,62 $\pm$ 6,84	90,41
3	12	26,75 $\pm$ 2,75 (C)	30,12 $\pm$ 1,88	44,58
4	24	18,50 $\pm$ 3,87 (D)	24,48 $\pm$ 2,65	30,83

**C = controle; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente**

Em relação a Amoxicilina, as doses 1 (1,8 mg/ml), 2 (3,6 mg/ml) e 3 (7,2 mg/ml) apresentaram ótimos resultados, sendo que a sobrevivência observada nestas três não diferiu estatisticamente do grupo controle.

Entretanto a dose 4 (14,4 mg/ml) já causou a mortalidade de 58,75% das larvas, apresentando diferença estatística significativa ( $F= 337,11$ ;  $p<0,01$ ). Estes resultados, assim como o peso das pupas nos testes com a Amoxicilina podem ser observados na Tabela 7.

**Tabela 7. Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Amoxicilina.**

Dose	Concentração (mg/ml)	Nº de pupas média $\pm$ dp	Peso de pupa média $\pm$ dp	% de pupariação
3	7,2	60,00 $\pm$ 0,00 (A)	30,40 $\pm$ 1,90	100,00
C	0	59,25 $\pm$ 1,23 (A)	30,63 $\pm$ 3,15	98,75
2	3,6	58,50 $\pm$ 1,29 (A)	30,59 $\pm$ 3,86	97,50
1	1,8	58,00 $\pm$ 3,36 (A)	27,26 $\pm$ 1,41	96,66
4	14,4	24,75 $\pm$ 2,62 (B)	29,26 $\pm$ 3,36	41,25

**C = controle; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente**

Nos testes com a Cefalexina apenas a dose 1 (3 mg/ml) não interferiu na sobrevivência das larvas, sendo os resultados desta semelhantes aos do grupo controle. Na dose 2 (6 mg/ml) já pôde ser observada uma mortalidade de 30,42% das larvas, na dose 3 (9 mg/ml) de 57,50% e na dose 4 (12 mg/ml) de 97,92%, sendo essa proporcional ao aumento da dose do fármaco (Tabela 8). Nas doses 2, 3 e 4 a variação na sobrevivência das larvas até o estágio de pupa foi considerada significativa ( $F= 183,30$ ;  $p<0,01$ ).

Dos quatro fármacos testados, a Cefalotina foi o que apresentou os piores resultados em relação à porcentagem de pupariação, ou seja, sobrevivência das larvas, como se observa na Tabela 9. Apenas a dose mais baixa, ou seja, a dose 1 (7,5 mg/ml) não apresentou diferença estatística em

relação ao controle, ou seja não promoveu a mortalidade das larvas tratadas. A dose 2 (15 mg/ml) não exibiu resultados satisfatórios, ocorrendo mortalidade de 44,59% das larvas e este resultado já apresentou diferença significativa em relação ao controle ( $F= 635,58$ ;  $p<0,05$ ). Além disso, na dose 3 (22,5 mg/ml) a mortalidade das larvas foi de 98,34% das larvas, não diferindo estatisticamente da dose 4 (30 mg/ml) onde ocorreu a morte de todas as larvas.

**Tabela 8. Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Cefalexina.**

Dose	Concentração (mg/ml)	Nº de pupas média $\pm$ dp	Peso de pupa média $\pm$ dp	% de pupariação
C	0	58,37 $\pm$ 1,85 (A)	31,97 $\pm$ 1,88	97,28
1	3	57,25 $\pm$ 3,77 (A)	30,18 $\pm$ 1,73	95,41
2	6	41,75 $\pm$ 4,19 (B)	31,94 $\pm$ 1,12	69,58
3	9	25,50 $\pm$ 10,14 (C)	26,72 $\pm$ 1,15	42,50
4	12	1,25 $\pm$ 1,89 (D)	4,95 $\pm$ 8,03	2,08

**C = controle; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente**

**Tabela 9. Sobrevivência das larvas e peso de pupas no tratamento com Cefalotina.**

Dose	Concentração (mg/ml)	Nº de pupas Média $\pm$ dp	Peso de pupa Média $\pm$ dp	% de pupariação
1	7,5	58,00 $\pm$ 4,00 (A)	32,21 $\pm$ 2,31	96,66
C	0	57,87 $\pm$ 1,89 (A)	27,4 $\pm$ 1,94	96,41
2	15	33,25 $\pm$ 5,61 (B)	18,29 $\pm$ 0,83	55,41
3	22,5	1,00 $\pm$ 1,41 (C)	8,41 $\pm$ 10,05	1,66
4	30	00,00 $\pm$ 0,00 (C)	0,00 $\pm$ 0,00	0

**C = controle; médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente**

Comparando-se as médias de sobrevivência entre as quatro doses e o

controle dos quatro tratamentos, foi observado que a dose 1 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, em nenhum dos quatro antibióticos testados (Tabela 10).

Na dose 2 os resultados da Ampicilina e Amoxicilina não apresentaram diferença significativa em relação ao controle, enquanto que na Cefalexina e Cefalotina houve diminuição do número de larvas que atingiram o estágio de pupas, sendo esta última o pior resultado entre os quatro. Os resultados encontrados na dose 2 da Cefalexina e Cefalotina apresentaram diferença estatística significativa em relação ao controle e entre ambos ( $F=40,48$ ;  $p<0,01$ ), como pode ser observado na tabela 10.

Os resultados observados na dose 3 da Amoxicilina foram idênticos aos do grupo controle, vindo em seguida os da Ampicilina e Cefalexina, nos quais foi verificada a mortalidade de 73,25% e 74,50% da amostra respectivamente, diferindo estatisticamente em relação ao controle ( $F=83,40$ ;  $p<0,01$ ). A dose 3 da Cefalotina foi o pior resultado quando comparada aos outros, uma vez que nesta dose houve 99% de mortalidade.

A dose 4 foi a primeira onde se observou mortalidade das larvas tratadas com Amoxicilina, sendo observado diferença significativa entre esta e o controle ( $F=96,48$ ;  $p<0,01$ ). A mortalidade na dose 4 da Ampicilina foi um pouco maior entretanto não diferiu estatisticamente dos resultados da Amoxicilina. A Cefalexina e a Cefalotina foram os piores resultados da dose 4, sendo a mortalidade da primeira de 98,75% e na segunda, não houve sobrevivência. Os resultados destas duas últimas não diferem estatisticamente

entre si, mas diferem em relação à Amoxicilina e a Ampicilina, sendo estes dados observados na tabela 10.

**Tabela 10. Variação no nº de larvas que atingiram o estágio de pupas entre as doses testadas.**

Dose	Antibiótico	N	Nº de pupas média ± dp	Média do nº de pupas/ dose
1	Ampicilina	4	59,75 ± 0,50 (A)	58,25
	Amoxicilina	4	58,00 ± 3,36 (A)	
	Cefalotina	4	58,00 ± 4,00 (A)	
	Cefalexina	4	57,25 ± 3,77 (A)	
2	Amoxicilina	4	58,50 ± 1,29 (A)	46,93
	Ampicilina	4	54,25 ± 1,25 (A)	
	Cefalexina	4	41,75 ± 4,19 (B)	
	Cefalotina	4	33,25 ± 5,61 (C)	
3	Amoxicilina	4	60,00 ± 0,00 (A)	28,31
	Ampicilina	4	26,75 ± 2,75 (B)	
	Cefalexina	4	25,50 ± 10,14 (B)	
	Cefalotina	4	1,00 ± 1,41 (C)	
4	Amoxicilina	4	24,75 ± 2,62 (B)	11,12
	Ampicilina	4	18,50 ± 3,87 (B)	
	Cefalexina	4	1,25 ± 1,89 (C)	
	Cefalotina	4	0,00 ± 0,00 (C)	
C	Amoxicilina	16	59,25 ± 1,23 (A)	58,35
	Cefalexina	16	58,37 ± 1,85 (A)	
	Ampicilina	16	57,93 ± 2,43 (A)	
	Cefalotina	16	57,87 ± 1,89 (A)	

**C = controle; N = nº de repetições. Para cada dose, médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente, a taxa basal de erro p= 0,05, pelo teste de DUNCAN.**

Na Tabela 11 pode ser observada a variação entre as médias gerais de sobrevivência das larvas em cada fármaco testado. Na média geral, os melhores resultados encontrados foram os da Amoxicilina, sendo diferente estatisticamente em relação aos demais ( $F= 86,88$ ;  $p<0,01$ ). Embora os resultados gerais da Ampicilina não tenham apresentado diferença significativa em relação aos da Cefalexina, quando se observa a média de cada dose, a Ampicilina difere estatisticamente em relação à Cefalexina nas doses 2 e 4 (Tabela 10).

**Tabela 11. Comparação entre as médias gerais de sobrevivência das larvas nos quatro tratamentos.**

Antibiótico	N	Média do nº de pupas
Amoxicilina	32	54,78 (A)
Ampicilina	32	48,87 (B)
Cefalexina	32	44,90 (B)
Cefalotina	32	40,46 (C)

**N = nº de repetições. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística.**

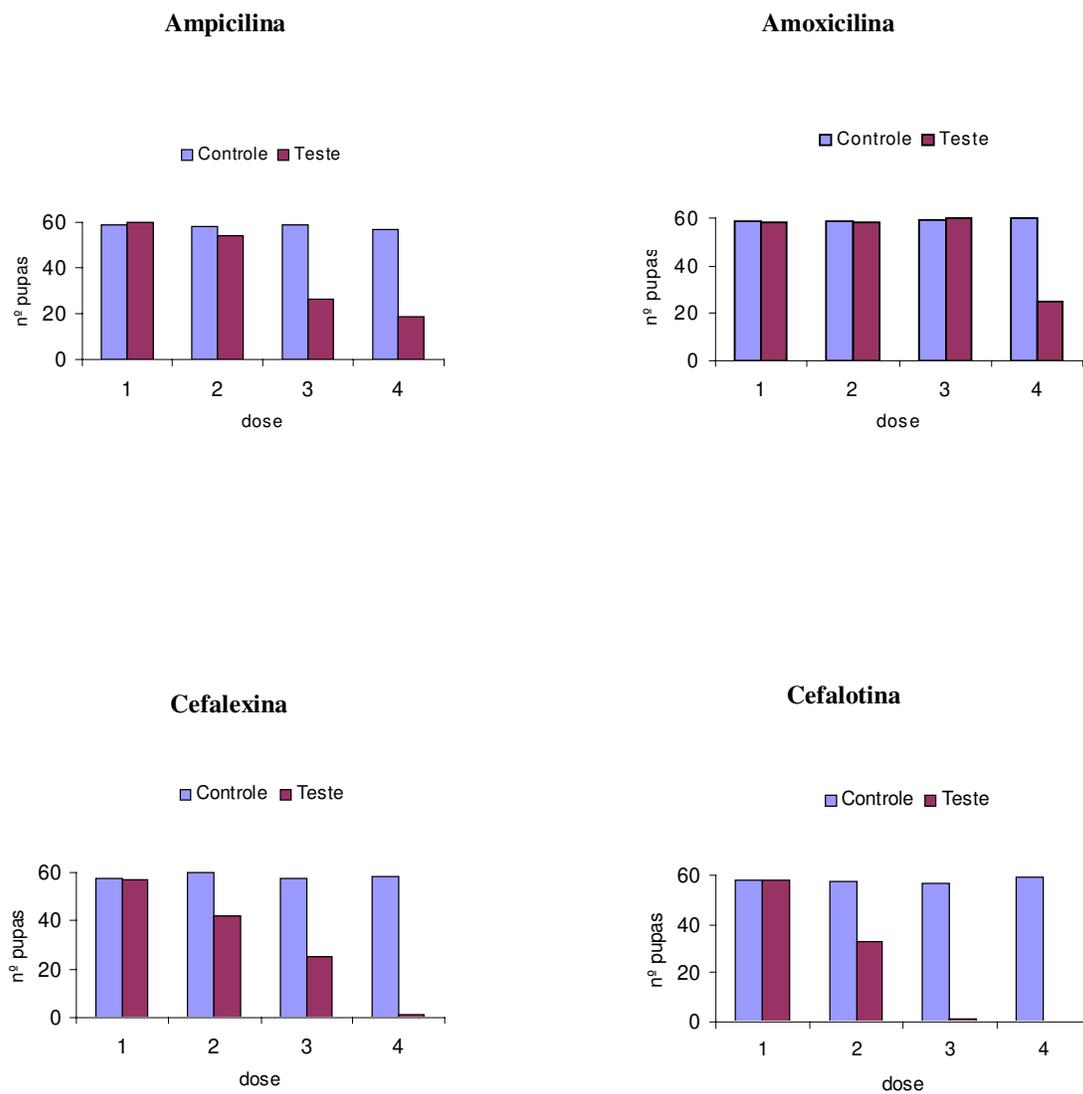
Comparando-se as médias gerais de sobrevivência das larvas entre as doses 1, 2, 3, 4 e controle, foi observado diferença estatística entre as quatro doses e entre as doses 2, 3 e 4 e o controle. Apenas a dose 1 não apresentou diferença significativa em relação ao controle em todos os tratamentos, como pode ser observado na tabela 12.

**Tabela 12. Comparação entre as médias gerais de sobrevivência das larvas nas doses 1, 2 ,3 ,4 e controle dos quatro tratamentos.**

Dose	N	Média do n° de pupas
C	64	58,35 (A)
1	16	58,25 (A)
2	16	46,93 (B)
3	16	28,31 (C)
4	16	11,12 (D)

C = controle; N = n° de repetições. Médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença estatística.

Nos gráficos a seguir estão demonstradas as variações na sobrevivência das larvas entres os grupos controle e teste nas diferentes doses dos tratamentos com Ampicilina, Amoxicilina, Cefalexina e Cefalotina (Figuras 8).



**Figura 8.** Comparação entre o número de larvas que atingiram o estágio de pupa nas quatro doses e no controle, nos quatro antibióticos testados

Com base nestes resultados, foi observado que, entre os quatro antibióticos testados o que apresentou melhores resultados, ou seja, cuja interferência no desenvolvimento e pupariação das larvas em relação ao grupo controle foi menor, foi a Amoxicilina. A Ampicilina aparece em seguida, e após a Cefalexina com resultados menos satisfatórios que as duas anteriores. Já a Cefalotina foi o tratamento que exibiu os piores resultados, sendo que na primeira dose testada (dose 2) já houve uma mortalidade de quase 50% das larvas.

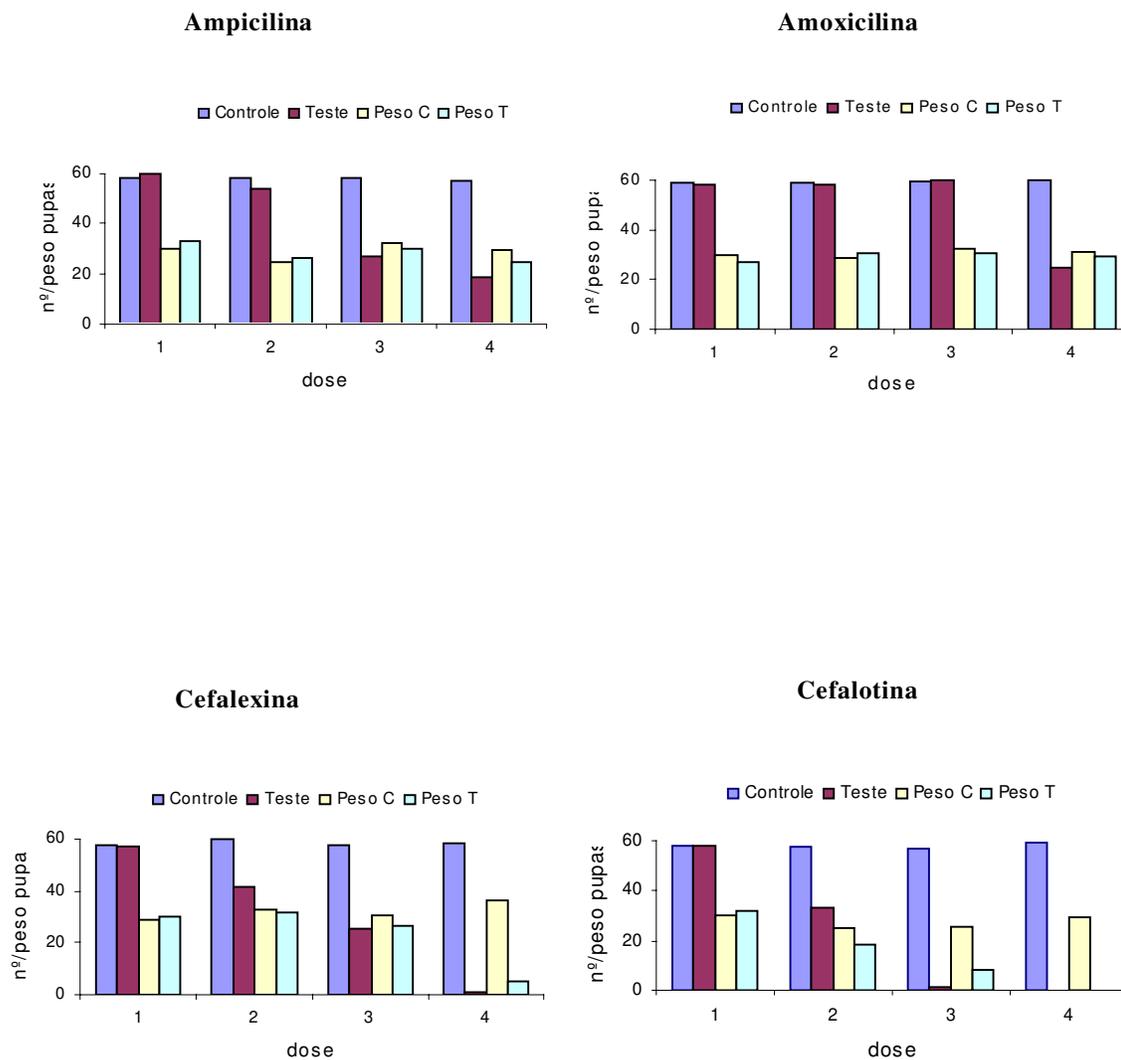
Eventuais diferenças entre as médias de peso de pupas foram analisadas por meio do Teste t de Student. Nos testes realizados com a Ampicilina, em nenhuma dose foi observado diferença significativa na média de peso entre as pupas do grupo tratado e as do grupo controle, embora as médias do controle tenham sido maiores que as dos testes. Apesar de ter sido observado uma diminuição significativa na sobrevivência das larvas na dose 3 (44,58%) o peso das pupas não foi influenciado.

No caso dos testes com a Amoxicilina os resultados observados foram semelhantes aos da Ampicilina, ou seja não houve diferença estatística significativa em relação aos pesos de pupas controle e teste.

Nas doses 1, 2 e 3 dos testes realizados com a Cefalexina a diferença entre as médias de peso das pupas não foi significativa. Entretanto na dose 4, a média de peso das pupas controle foi maior que a das pupas testadas e esta diferença foi considerada significativa na análise estatística ( $F= 20,27$ ;  $p < 0,01$ ).

Assim como a sobrevivência das larvas, o peso das pupas foi afetado de maneira mais evidente nos testes com a Cefalotina. A única dose cujas médias de peso entre pupas não apresentaram diferença significativa foi a dose 1. Nas doses 2 ( $F= 10,11$ ;  $p < 0,01$ ) e 3 ( $F= 21,47$ ;  $p < 0,01$ ) esta diferença foi considerada significativa e na dose 4 não foi possível a realização da análise estatística uma vez que a mortalidade das larvas foi de 100%.

Os dados referentes à variação do peso de pupas provenientes dos grupos controle e teste, assim como o número de pupas dos testes com os quatro antibióticos podem na Figura 9.



**Figura 9. Variação de peso de pupa nas quatro doses comparadas ao grupo controle, nos quatro antibióticos testados**

A discussão referente aos dados apresentados no presente capítulo se encontra no capítulo à seguir.

#### 4- Discussão

A Ampicilina e a Amoxicilina são antimicrobianos pertencentes ao grupo das aminopenicilinas, resultantes da fusão do ácido 1- $\alpha$ -aminofenilacético com o ácido 6-aminopenicilânico. As aminopenicilinas são bactericidas, inibem a parede celular bacteriana, resultando na lise celular. São ativas frente a bactérias gram-positivas e diversas bactérias gram-negativas. Difundem-se bem em todos os tecidos corpóreos, sendo úteis em cães nas infecções renais, gastroenterites, piodermites (infecções de pele), pneumonias e otites (ROSIN et al., 1998; ANDRADE, 2002). A Ampicilina não é ativa contra *Staphylococcus* produtores de beta-lactamase, *Pseudomonas* e *Klebsiella*. Aproximadamente 35% da dose administrada oralmente é absorvida (BARRAGRY, 1994).

Segundo BARRAGRY (1994), a Amoxicilina é formada pela adição na Ampicilina de um grupo hidroxila. De acordo com o autor, apesar de seu espectro de ação ser idêntico ao da Ampicilina, ela demonstra vantagens significativas em relação à absorção, pois após sua administração oral, atinge níveis sanguíneos 50 a 100% superiores aos da Ampicilina.

A Cefalexina e a Cefalotina pertencem ao grupo das Cefalosporinas de primeira geração, são antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que apresentam como núcleo central o ácido 7-aminocefalosporânico, sendo a primeira de absorção oral e a segunda parenteral. São obtidas a partir de culturas do fungo do gênero *Cephalosporium*. As Cefalosporinas são também bactericidas, alteram a formação da parede celular inibindo a ligação cruzada polipeptídica, de

modo semelhante as aminopenicilinas. Apresentam boa ação frente à maioria das bactérias gram-positivas e gram-negativas, ou seja, agem contra o *Staphylococcus intermedius* e outros patógenos cutâneos secundários como *Proteus mirabilis* e algumas espécies de *Pseudomonas*. Distribuem-se bem em todos os tecidos, mas especialmente as de primeira e segunda geração atingem boas concentrações em pele e tecido subcutâneo (IHRKE, 1984; ANDRADE, 2002).

BARRAGRY (1994) relata que, entre as Cefalosporinas de primeira geração, a Cefalexina e a Cefalotina são as que apresentam uma atividade antimicrobiana de amplo espectro. Em Medicina Veterinária as Cefalosporinas de primeira geração são as mais utilizadas, sendo que a Cefalexina está indicada principalmente em casos de piodermites dada à boa ação frente aos *Staphylococcus* spp e difusão em tecidos queratinizados (ANDRADE, 2002). Segundo IHRKE(1984), dentre os antibióticos de amplo espectro utilizados empiricamente no tratamento das infecções de pele, a Cefalexina se mostrou efetiva.

A dosagem necessária para a manutenção de concentrações antibióticas adequadas na pele carece de informações disponíveis. Entretanto, é importante lembrar que a ação antibiótica mantém estreita relação com os níveis de distribuição tissular cutânea. Sabe-se que a pele é perfundida por apenas cerca de 4% do volume sangüíneo bombeado pelo coração, enquanto que os músculos por 33%, percentual oito vezes maior ( IHRKE 1984; LARSSON, 1999).

Segundo BOOTHE (1997), o acúmulo de debrís inflamatórios impede a movimentação de fármacos tanto na administração tópica quanto sistêmica. A distribuição na pele de antibióticos administrados sistemicamente é um pouco limitada mesmo em condições normais. Apesar de ser o maior órgão do corpo, o volume sanguíneo da pele representa 9% do débito cardíaco e isso torna a distribuição das drogas na pele mais difícil do que em outros órgãos com maior aporte sanguíneo. Além disso, o suprimento sanguíneo para a epiderme consiste de capilares que estão situados abaixo da mesma, e as drogas precisam se difundir passivamente dos capilares para a epiderme.

LARSSON (1999) escreve que, embora a pele seja relativamente vascularizada, a via sistêmica é preferível à via tópica, em consequência da barreira de impermeabilização imposta pela camada córnea, contudo as características fisiológicas dos carnívoros fazem da pele provavelmente o tecido mais inacessível a uma concentração antibiótica eficaz.

IHRKE (1984), ao discorrer sobre a terapia antimicrobiana na dermatologia em pequenos animais, cita que, os *Staphylococcus* coagulase-positivos são os agentes mais comumente isolados nas infecções bacterianas da pele. Dessa forma, a escolha de um antibiótico pode ser realizada empiricamente, além de baseada em uma cultura bacteriana e testes de sensibilidade. Segundo o autor, se forem realizadas culturas, os antibióticos devem ser escolhidos não apenas com base nos testes de sensibilidade, mas também na eficácia comprovada clinicamente.

No presente estudo, os quatro fármacos antibióticos citados

anteriormente, escolhidos com base na efetividade apresentada pela literatura e na frequência de utilização, foram testados em diferentes concentrações na dieta das larvas de *Chrysomya putoria*. Foi observado que a Amoxicilina apresentou menor interferência no desenvolvimento e pupariação das larvas em relação ao grupo controle. Entretanto, os resultados entre esta e a Ampicilina não diferiram estatisticamente nas doses 1 e 2, sendo portanto a Ampicilina também uma boa opção de tratamento. A Cefalexina aparece em seguida, com resultados menos satisfatórios que as duas anteriores. Já a Cefalotina foi o tratamento em que se observou os piores resultados, sendo que na primeira dose testada já houve uma mortalidade de quase 50% das larvas.

Embora na média geral Ampicilina e Cefalexina não apresentem diferença estatística significativa, ao se analisar isoladamente, a Ampicilina exibiu resultados melhores que a Cefalexina, uma vez que a porcentagem de sobrevivência para as doses 1 e 2 são de 99,58% e 90,41% respectivamente para a Ampicilina e 95,41% e 69,58% respectivamente para a Cefalexina.

Entretanto, é bom lembrar que segundo IHRKE (1984) e LARSSON (1999), apenas 4% do volume sanguíneo bombeado pelo coração perfunde a pele, logo apenas este percentual estaria atingindo diretamente as larvas presentes na ferida, ficando esta dose muito aquém daquela utilizada *in vitro*. No caso da Ampicilina, pode ser ressaltado também, que a absorção da dose administrada por via oral é de apenas 35% de acordo com BARRAGRY (1994), e portanto doses que *in vitro* influenciaram a sobrevivência das larvas

podem não ser prejudiciais as mesmas quando administradas oralmente ao animal.

Estas conclusões são semelhantes às encontradas por SHERMAN et al. (1995) quando pesquisaram o efeito de sete antibióticos sobre as larvas de *Lucilia sericata*. Os autores concluíram que apenas o meio contendo Gentamicina na concentração de 4.000 µg/ml, demonstrou uma redução significativa na sobrevivência das larvas em relação ao grupo controle (2,7% contra 80-88% no controle) e os meios contendo a Cefazolina nas concentrações de 800 e 8000 µg/ml, uma sobrevivência de 69-72% contra 80-88% do grupo controle; porém, essas concentrações estão acima daquelas utilizadas no tratamento das infecções humanas.

Em estudos anteriores, CHAMBERLAIN (1989) observou que, quando o Cloranfenicol foi adicionado em concentrações muito altas (2 mg/ml de meio) a dieta de *Hypoderma lineatum*, nenhuma mosca emergiu, enquanto que utilizando-se concentrações mais baixas do mesmo composto (0,1 mg/ml) não só os adultos emergiram como o tempo de emergência foi o mesmo tanto para os meios contendo o Cloranfenicol como para os meios sem o composto (CHAMBERLAIN e SCHOLL, 1991).

FYTIZAS e TZANAKAKIS (1966) adicionando um quinto da dose de Estreptomicina utilizada por HAGEN (1963, *apud* FYTIZAS e TZANAKAKIS, 1966) na dieta de *Dacus oleae*, observaram que embora a longevidade dos adultos não tenha sido aumentada, houve crescimento das larvas de sua progênie.

SINGH e HOUSE (1970b) utilizando a Estreptomicina em várias concentrações na dieta de larvas de *Agria affinis* relacionados a diferentes níveis de nutrientes, concluíram que os efeitos adversos do antimicrobiano sobre a taxa de crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das larvas foram aumentados de acordo com o aumento da concentração do mesmo na dieta, e que um mesmo antimicrobiano adicionado a dietas sintéticas em concentrações graduadas pode ser seguro, inibitório ou altamente prejudicial dependendo da sua concentração. A Penicilina G potássica por exemplo, adicionada na dose de 200 miligramas em 100 mililitros do meio foi classificada como segura, nas doses de 210 a 3000 miligramas, inibitória, e altamente tóxica acima de 3000 miligramas.

Estes dados estão em acordo com o que foi observado no presente estudo, de que a sobrevivência das larvas de insetos quando alimentadas com dietas contendo antimicrobianos, tende a ser menor quanto maior a concentração do agente, uma vez que para os quatro fármacos testados a taxa de mortalidade das larvas foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do respectivo fármaco.

No trabalho de SINGH e HOUSE (1970a), a taxa de desenvolvimento larval foi inversamente proporcional à concentração do composto antimicrobiano na dieta, afetando do mesmo modo o desenvolvimento larval, a pupariação e a emergência de adultos. Embora a emergência de adultos não tenha sido um dado analisado no presente trabalho, foi observado que nas doses mais elevadas onde a sobrevivência das larvas foi

menor, o desenvolvimento larval também foi influenciado, ocorrendo um prolongamento do período necessário para o início da pupariação em relação ao controle de cerca de dois a quatro dias.

BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN (2002) comparando o seu experimento com o de SINGH e HOUSE (1970b) concluíram que o sarcófagídeo parasitóide *Agria affinis* teve uma maior tolerância à ação dos antimicrobianos quando comparado a *Pimpla turionellae*, que pode ser atribuída às diferenças entre seus canais alimentares. Ao contrário da *A. affinis*, a larva da *P. turionellae* tem um estreito intestino médio em sua porção posterior e só consegue defecar o conteúdo do seu intestino no final da maturidade larval ou próximo a pupariação e portanto, a absorção dos componentes da dieta provavelmente seja maior. Esses fatos demonstram que a tolerância dos insetos aos níveis de agentes antimicrobianos varia de acordo com a espécie de inseto testada, bem como com o tipo e concentração do antimicrobiano na dieta. Essas variações podem ser atribuídas as diferentes condições fisiológicas da espécie de inseto (BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN, 2002).

Estas constatações estão de acordo com as encontradas comparando-se a pesquisa de SHERMAN et al. (1995b) ao presente trabalho. Naquele estudo, os autores obtiveram uma taxa de pupariação de 87% para a concentração máxima utilizada, que foi de 250 µg/ml. Entretanto as larvas de *C. putoria* apresentaram uma taxa de sobrevivência satisfatória em concentrações de Ampicilina bem acima destas, uma vez que, a porcentagem de pupariação foi de 90,41% na concentração de 6 mg/ml (6000 µg/ml).

Outro fator observado pelos autores, que pode contribuir para a irregularidade dos efeitos dos agentes antimicrobianos sobre os insetos, é que a concentração desse agente na dieta pode influenciar a quantidade de dieta consumida pelo inseto, podendo inibir ou reduzir a atividade alimentar das larvas (BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN, 2002). No caso da *P. turionellae*, de um total de 30 novas larvas inoculadas em uma dieta com altos níveis de Rifampicina, apenas 37,5% foram capazes de chegar ao 5º estágio e as outras morreram em 48 horas. Essa mortalidade inicial foi atribuída à mudança no sabor da dieta, bem como a coloração avermelhada, conferida a dieta e as larvas que dela se alimentaram, pela alta concentração de Rifampicina (BÜYÜKGÜZEL e YAZGAN, 2002).

Entretanto, nenhum dos antibióticos testados no presente trabalho promoveu alteração na cor da dieta das larvas de *C. putoria*, sendo este um fator que não interferiu nos resultados encontrados. Embora não tenha sido testado o sabor das dietas, foi observado neste experimento que as dietas contendo as concentrações mais altas de antibióticos apresentaram um odor marcante, característico do respectivo fármaco, e isso também pode ter influenciado a ingestão da dieta e conseqüentemente a sobrevivência das larvas. Essa observação parece concordar com o que foi sugerido por ZUCOLOTO (1987), de que um inseto pode ingerir ou não uma dieta baseado no sabor da mesma.

De acordo com SINGH e HOUSE (1970b), os microorganismos aossimbóticos presentes no intestino dos insetos desempenham importante

papel na digestão, seja como nutrientes suplementares ou para auxiliar nos processos digestivos, e a alteração no desenvolvimento das larvas quando tratadas com dietas contendo antimicrobianos, pode advir da eliminação de possíveis simbioses, e conseqüentemente prejuízo nutricional para a larva, e não propriamente da ação direta dos antimicrobianos. No experimento realizado por HAGEN (1963, *apud* FYTIZAS e TZANAKAKIS 1966), a progênie de *Dacus oleae* não era capaz de se desenvolver em larvas em conseqüência da ausência de bactérias simbióticas necessárias para a digestão da proteína da fruta, em virtude de terem sido alimentados com dietas contendo a Estreptomicina.

Por outro lado, HOBSON (1931) estudando alguns aspectos da digestão em moscas varejeiras, observou que a flora intestinal de larvas de *Lucilia sericata* consiste principalmente de bacilos aeróbicos não proteolíticos e que a ausência de flora natural proteolítica não influencia as reações digestivas no intestino. Ele concluiu que os microorganismos não fazem parte do processo de digestão normal do alimento no intestino da larva, uma vez que não houve diferença na taxa de crescimento entre as larvas alimentadas com dieta normal e as alimentadas com dieta esterilizada. Segundo o autor, as enzimas encontradas em larvas não esterilizadas de *Lucilia sericata* foram amilase na glândula salivar e triptase, peptidase e lípase no intestino médio, sendo que a triptase, a mais importante enzima digestiva, também foi encontrada nas larvas estéreis. Ele sugeriu que a presença de triptase em larvas estéreis mostrou que as células do intestino médio das larvas secretam

essa importante enzima em abundância, mesmo na ausência de bactérias.

Sendo assim, as evidências citadas por SINGH e HOUSE (1970b) e HAGEN (1963) não apresentam relevância no presente trabalho, uma vez que as larvas utilizadas foram de moscas varejeiras, semelhantes àquelas estudadas por HOBSON (1931). Assim, é possível concluir que a mortalidade das larvas de *Chrysomya putoria* pode ser atribuída unicamente à ação deletéria dos antimicrobianos sobre as mesmas, quando utilizados em sua dieta.

Essas constatações vêm concordar com o que foi citado por diversos autores de que o efeito dos antimicrobianos sobre as larvas quando adicionados a dieta de insetos, pode variar de acordo com a espécie de inseto utilizada, e suas particularidades fisiológicas, bem como o tipo de fármaco e a dose utilizados na composição da dieta destes insetos.

### III- CONCLUSÕES

Embora a terapia larval possa ser utilizada no manejo de feridas em animais, provavelmente muitas vezes a associação desta com a antibioticoterapia sistêmica se fará necessária e portanto um ou mais fármacos deverão ser capazes de diminuir a infecção da ferida mas ao mesmo tempo não impedir ou prejudicar a ação das larvas.

Com base nos antibióticos selecionados e testados neste trabalho, foi concluído que a Amoxicilina apresentou os melhores resultados em relação à sobrevivência das larvas, sendo o fármaco de eleição a ser administrado aos animais que estiverem recebendo a terapia larval. Ela poderá ser utilizada com segurança concomitantemente a bioterapia até uma dose de 360 miligramas e acima disso mediante observação *in vivo*, uma vez que a concentração que o fármaco atinge na pele, ou seja, local onde estão as larvas, é de 4 a 9% da dose administrada ao animal. Nas observações *in vitro*, doses acima desta foram deletérias ao desenvolvimento e sobrevivência das larvas. Do mesmo modo, a Ampicilina na dose de até 300 miligramas poderá ser utilizada como uma segunda opção, visto que sua eficácia contra os patógenos é menor que a da Amoxicilina.

A Cefalexina poderá ser utilizada somente até uma dose de 150 miligramas, pois doses acima desta promoveram mortalidade significativa das larvas *in vitro*. A Cefalotina é o antibiótico menos indicado para ser utilizado em conjunto com a terapia larval, uma vez que apenas na dose mais baixa não

influenciou o desenvolvimento e sobrevivência das larvas.

A espécie *Chrysomya putoria* apresentou facilidade e baixo custo na manutenção da colônia, todavia, outros estudos também são necessários antes de se estabelecer a sua utilização em bioterapia.

Os antibióticos e as doses testados foram apenas um primeiro passo em relação ao avanço que a terapia larval poderá ter na Medicina Veterinária. Outros fármacos em diferentes dosagens carecem de estudos e protocolos experimentais. Além disso, são necessários testes com a terapia larval associada aos antibióticos em animais, a fim de se observar *in vivo* a influência dos mesmos.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, S. F.; GIUFFRIDA, R.; RIBEIRO, M. G. Quimioterápicos Antimicrobianos e Antibióticos: Antibióticos. In: ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 31-34.

ARCHIE, F.; ALEXANDER, H. Maggot therapy. Technique and Clinical Application. **Journal of Bone and Joint Surgery**. New Orleans, v. 16, p. 572-582, 1934.

BAER, W. S. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). **Journal of Bone and Joint Surgery**. [S.I.], v. 13A, p. 438-474, 1931.

BARRAGRY, T. B. *Veterinary Drug Therapy*. Lea & Febiger. 1994. 1076 p.

BAUMGARTNER, D. L.; GREENBERG, B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the world. **Journal of Medical Entomology**. [S.I.], v. 21, n.1, p. 105-113, jan. 1984.

BOOTHE, D. M. Avoiding Antibiotic Failures in Skin Patients. Pathophysiology of Pyoderma: the impact of drugs on antimicrobial therapy. In: THE 1997 NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE. 1997. Selected Proceedings From Three Scientific Sessions Held at the 1997 North American Veterinary Conference. [S.I.], v. 19, n. 3, p. 101-112.

BÜYÜKGÜZEL, K.; YAZGAN, S. Effects of Antimicrobial agents on the Survival and Development of Larvae *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) Reared on an Artificial Diet. **Turk Journal of Zoology**. [S.I.], v. 26, p. 111-119, 2002.

CHAFFEY, R. Case study: Larval therapy for infected insect bite, 1997. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/WorldWounds/1997/october/LarvalTherapy/LarvalCaseStudy.html>>. Acesso em: 21 jul 1999.

CHAMBERLAIN, W. F. Survival of second and third instars of the cattle grubs, *Hypoderma lineatum* (Villers) and *Hypoderma bovis* (L.), in artificial media. **Southwestern Entomologist**. v. 14, n.3, p. 233-239, sep. 1989.

CHAMBERLAIN, W. F.; SCHOLL, P.J. New Procedures to Enhance Survival of Third-Instar *Hypoderma lineatum* (Villers) (Diptera: Oestridae) in Artificial Media. **Journal of Medical Entomology**. Kerrville. v. 28, n. 2, p. 266-269, mar. 1991.

CHILD, F. S.; ROBERTS, E. F. The treatment of chronic osteomyelitis with live maggots. **New York State Journal of Medicine**. New York, v. 31, n. 15, p. 937-943, aug. 1931.

COURTENAY, M. The use of larval therapy in wound management in the UK. **Journal of Wound Care**. [S.I.], v. 8, n. 4, p. 177-179, apr. 1999.

COURTENAY, M.; CHURCH, J. C.; RYAN, T. J. Larva therapy in wound management. **Journal of Royal Society of Medicine**. [S.I.], v. 93, n. 2, p. 72-74, feb. 2000.

DICKE, R. J. Maggot Therapy of Actinomycosis. **Journal of Economic Entomology**. [S.I.], v. 46, n. 4, p. 706-707, aug. 1953.

ERDMANN G. R. Antibacterial Action of Myiasis-causing Flies. **Parasitology Today**. Cambridge, v. 3, n. 7, p. 214-215, 1987.

ERDMANN, G. R; KHALIL, S.K.W. Isolation and Identification of two Antibacterial Agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of the screwworm (*Cochliomya hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**. [S.I.], v. 23, n. 2, p. 208-211, mar. 1986.

FERREIRA, M. J. M. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I: Calliphoridae. **Revista Brasileira de Biologia**. Rio de Janeiro, v. 38, n. 2, p. 445-454, maio, 1978.

FYTIZAS, E; TZANAKAKIS, M. E. Some Effects of Streptomycin, When Added to the Adult Food, on the Adults of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) and Their Progeny. **Annals of the Entomological Society of America**. [S.I.], v. 59, n. 2, p. 269-273, mar. 1966.

GREENBERG, B.; GEORGE, J. **Handbook of Insect Rearing. Volume 2**. Amsterdam: Pritam Singh and R F. Moore, 1971. 447 p.

\*HAGEN, K. S. Laboratory culture of the olive fly in relation to the "Olive Branch Enterprise" in Greece. 1963. In: FYTIZAS, E; TZANAKAKIS, M. E. Some Effects os Streptomycin, When Added to the Adult Food, on the Adults of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae) and Their Progeny. **Annals of the Entomological Society of America**. [S.I.], v. 59, n. 2, p. 269-273, mar. 1966.

HALL, M. J. R. Introduction to myiasis: the entomological origins of larva therapy. Abstracts from the 1<sup>st</sup> World Conference on Biosurgery, 1996. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/WMPRC/Biosurgery/Conference/abstracts96.html>>. Acesso em: 23 jul 1999.

HINSHAW, J. Larval Therapy. A Review of Clinical Human and Veterinary Studies, 2000. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/world-wide/2000/oct/janet-html>>. Acesso em: 02 nov 2000.

HOBSON, R. P. Studies on the nutrition of blow-fly larvae. II – Rôle of the intestinal flora in digestion. **Journal of Experimental Biology**. [S.I.], v. 9, p. 128-138, 1932.

HUSAIN, Z. S.; FALLAT, L. M. Maggot therapy for wound debridement in a traumatic foot-degloving injury: a case report. **Journal of Foot and Ankle Surgery**. [S.I.], v. 42, n. 6, p. 371-376, nov./dec. 2003.

IHRKE, P.J. Tratamento antibacteriano na dermatologia. In: KIRK, R. W. **Atualização Terapêutica Veterinária: Pequenos Animais**. São Paulo: Manole, 1984. p. 713-720.

IVERSEN, E. Methods of treating injuries of work animals. **Buffalo Bulletin**. [S.I.], v. 15, p. 34-37, 1996.

JONES, M.; ANDREWS, A.; THOMAS, S. A case history describing the use of sterile larvae (maggots) in a malignant wound, 1998. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/World-Wide-Wounds/1998/february/Larvae-Case-Study-Malignant-Wounds.html>>. Acesso em 16 out 2000.

KNOWLES, A.; FINDLOW, A.; JACKSON, N. Management of a Diabetic foot ulcer using larval therapy. **Nursing Standard**. [S.I.], v. 16, n. 6, p. 73-76, 2001.

LARSSON, C. E. Farmacologia Dermatológica: fundamentos da antibioticoterapia dermatológica. In: SPINOSA, S. S.; GORNIK, S. L.; BERNARDI, M. M.; **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 539-540.

LEAL, T. T. S.; PRADO, A. P.; ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (=putoria) (Wiedemann) (Diptera,

Calliphoridae) on oligidic diets. **Revista Brasileira de Zoologia**. São Paulo, v. 1, n. 1, p. 41-44, dez. 1982.

LINHARES, A. X. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**. [S.I.], v. 25, n. 3, p. 189-215, out. 1981.

MACDOUGALL, K. M.; RODGERS, F. R. A case study using larval therapy in the community setting. **British Journal Nursing**. [S.I.], v. 13, n. 5, p. 255-260, mar. 2004.

MARTINI, R. K; SHERMAN, R. A. Terapia de Desbridamento com larvas. **Jornal Brasileiro de Medicina**. [S.I.], v. 85, n. 4, p. 82-85, out. 2003.

McKELLAR, Q. A. Antimicrobial resistance: a veterinary perspective. **British Medical Journal**. [S.I.], v. 317, p. 610-611, sep. 1998.

MILWARD- DE- AZEVEDO, E. M. V.; HERZOG, J. D.; FREITAS, M. A. S.; FARIA, E. H. S. Desenvolvimento Ontogenético, Potencial Reprodutivo e Longevidade de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae), em Condições de Laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**. [S.I.], v. 39, n. 3, p. 623-632, sep. 1995.

MUMCUOGLU, K. Y. Clinical applications for maggots in wound care. **American Journal of Clinical Dermatology**. [S.I.], v. 2, n. 4, p. 219-227. 2001a.

\_\_\_\_\_. Protocols for maintenance of *Lucilia sericata* colony and sterile maggots in the laboratory. Department of Parasitology Hebrew University-Hadassah Medical School [mensagem pessoal] mensagem recebida de <kostam@cc.huji.ac.il>, Jerusalem, Israel, 2001b.

MUMCUOGLU, K. Y.; LIPO, M.; IOFFE-USPENSKY, I.; MILLER, J.; GALUN, R. Maggot therapy for gangrene and osteomyelitis. **Harefuah**. [S.I.], v. 132, n. 5, p. 323-325, 382, mar. 1997.

MUMCUOGLU, K. Y.; INGBER, A.; GILEAD, L.; STESSMAN, J.; FRIEDMANN, R.; SCHULMAN, H.; BICHUCHER, H.; IOFFE-USPENSKY, I.; MILLER, J.; GALUN, R.; RAZ, I. Maggot Therapy for the Treatment of Diabetic Foot Ulcers. **Diabetes Care**. [S.I.], v. 21, n. 11, p. 2030-2031, nov. 1998.

\_\_\_\_\_. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. **International Journal of Dermatology**. [S.I.], v. 38, n. 8, p. 623-627, aug. 1999.

PRETE, P. E. Growth effects of *Phaenicia sericata* extracts on fibroblasts: Mechanism for wound healing by maggot therapy. **Life Sciences**. [S.I.], v. 60, n. 8, p. 505-510, 1997.

ROBINSON, W. Ammonium bicarbonate secreted by surgical maggots stimulates healing in purulent wounds. **The American Journal of Surgery**. [S.I.], v. 47, n. 1, p. 111-115, jan. 1940.

ROBINSON, W.; BAKER, F. C. The enzyme urease and the occurrence of ammonia in maggot-infected wounds. **The Journal of Parasitology**. [S.I.], v. 25, p. 149-155, 1939.

ROSIN, E.; DOW, S.W.; DALY, W.R.; PETERSEN, S.W.; PENWICK, R.C. Infecção das feridas cirúrgicas e uso de antibióticos. In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais. Volume 1**, 2. ed. São Paulo: Manole, 1998. p. 105-117.

S.A.S. Institute Incorporation. 1996. **S.A.S. User's Guide: Statistics. Version 6.12.** Cary, North Carolina, USA.

SEALBY, N. The use of maggot therapy in treatment of a malignant foot wound. **British Journal of Community Nursing.** [S.I.], v. 9, n. 3, p. S16 – 19, mar. 2004.

SHERMAN, R. A. Maggot Therapy: the U.S. Experience. Abstracts from the 1<sup>st</sup> World Conference on Biosurgery, 1996. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/WMPRC/Biosurgery/Conference/abstracts96.html>>. Acesso em: 23 jul 1999.

\_\_\_\_\_. Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of pressure ulcers. **Wound Repair and Regeneration.** [S.I.], v. 10, n. 4, p. 208-214, jul/aug. 2002.

\_\_\_\_\_. Maggot therapy treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. **Diabetes Care.** [S.I.], v. 26, n. 2, p. 446-451, feb. 2003.

SHERMAN, R. A.; PECHTER, E. A. Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. **Medical and Veterinary Entomology.** [S.I.], v. 2, p. 225-230, 1988.

SHERMAN, R. A.; WYLE, F. A. Low-cost, low-maintenance rearing of maggots in hospitals, clinics, and schools. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** [S.I.], v. 54, n. 1, p. 38-41, 1996.

SHERMAN, R. A.; WYLE, F.; VULPE, M. Maggot therapy for treating pressure ulcers in spinal cord injur patients. **Journal of Spinal Cord Medicine**. [S.I.], v. 18, n. 2, p. 71-74, apr. 1995a.

SHERMAN, R. A.; WYLE, F. A.; THRUPP, L. Effects of Seven Antibiotics on the Growth and Development of *Phaenicia sericata* (Diptera: Calliphoridae) Larvae. **Journal of Medical Entomology**. [S.I.], v. 32, n. 5, p. 646-649, sep. 1995b.

SHERMAN, R. A.; HALL, M. J. R.; THOMAS, S. Medicinal Maggots: An Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. **Anual Review of Entomology**. [S.I.], v. 45, p. 55-81, 2000.

SHERMAN, R. A.; SHERMAN, J.; GILEAD, L.; LIPO, M.; MUNCUOGLU, K. Y. Maggot debridement therapy in outpatients. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**. [S.I.], v. 82, n. 9, p. 1226-1229, sep. 2001.

SIMMONS, S. W. A bactericidal principle in excretions of surgical maggots which destroys important etiological agents of pyogenic infections. **Journal of bacteriology**. Washington, v. 30, p. 253-267, 1935.

SINGH, P.; HOUSE, H. L. Effects of Streptomycin and Potassium Sorbate Levels in Relation to Nutrient Levels on the Larvae of *Agria affinis*. **Journal of Economic Entomology**. [S.I.], v. 63, n. 2, p. 449-454, apr. 1970a.

\_\_\_\_\_. Antimicrobials: 'Safe' levels in a synthetic diet of an insect, *Agria Affinis*. **Journal of Insect Physiology**. [S.I.], v. 16, p. 1769-1782, 1970b.

\_\_\_\_\_. Antimicrobials agents: their detrimental effects on size of an insect, *Agria Affinis*. **The Canadian Entomologist**. [S.I.], v. 102, p. 1340 -1344, oct. 1970c.

STEENVOORDE, P.; JUKEMA, G. N. Can laboratory investigations help us to decide when to descontinue larval therapy? **Journal of Wound Care**. [S.I.], v. 13, n.1, p. 38-40, jan. 2004.

THOMAS, S. Maggots; Sterile larvae. Biosurgical Research Unit, 1997. Disponível em: <<http://www.dressings.org/Dressings/larvae.html>>. Acesso em 21 jul 1999.

THOMAS, S.; JONES, M.; SHUTLER, S.; ANDREWS, A. All you need to know about maggots. **Nursing time**. [S.I.], v. 92, n. 46, p. 63-76, nov. 1996.

THOMAS, S.; ANDREWS, A.; JONES, M.; CHURCH, J. Maggots are useful in treating infected or necrotic wounds. **British Medical Journal**. [S.I.], v. 318, p. 807, mar. 1999a.

THOMAS, S.; JONES, M.; SHUTLER, S.; JONES, S. Maggots in Wound Debridement – an Introduction. Surgical Material Testing laboratory, 1999b. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/WMPRC/Maggots/maggots.html>>. Acesso em 08 mar 2002.

THOMAS, S.; JONES, M.; WYNN, K.; FOWLER, T. The current status of maggot therapy in wound healing. **British Journal of Nursing**. [S.I.], v. 10 (22 Suppl), p. S5-8, S10, S12, dec. 2001.

THORNTON, D.; BERRY, M.; RALSTON, D. Case report: maggot therapy in an acute burn. In: World Wide Wounds, 2002. Disponível em: <<http://www.worldwidewounds.com/2002/august/Thornton/Larval-Therapy-Acute-Burn.html>>. Acesso em 09 ago 2002.

WAYMAN, J.; NIROJOGI, V.; WALKER, A.; SOWINSKI, A.; WALKER, M. A. The cost effectiveness of larval therapy in venous ulcers. **Journal of Tissue Viability**. [S.I.], v. 10, n. 3, p. 91-94, jul. 2000.

WOLFF, H.; HANSSON, C. Larval therapy – an effective method of ulcer debridement. **Clinical & Experimental Dermatology**. [S.I.], v. 28, n. 2, p. 134-137, 2003.

WOLLINA, U.; LIEBOLD, K.; SCHMIDT, W. D.; HARTMANN, M.; FASSLER, D. Biosurgery supports granulation and debridement in chronic wounds-clinical data and remittance spectroscopy measurement. **International Journal of Dermatology**. [S.I.], v. 41, n. 10, p. 635-639, oct. 2002.

ZUCOLOTO, F. S. Feeding habits of *Ceratitis capitata* (Díptera: Tephritidae): can larvae recognize a nutritionally effective diet? **Journal of Insect Physiology**. [S.I.], v. 33, n. 5, p. 349-353, 1987.