

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Fernanda Leme Silva Bastos Varzim



“Esterilização de ovos de moscas varejeiras *Chrysomya putoria*
(Wiedemann, 1830)(Diptera: Calliphoridae) para utilização em
Bioterapia”.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
FERNANDA LEME SILVA BASTOS VARZIM
: Angelo Pires do Prado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas, SP,
para obtenção do título de Mestre em
Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado

Campinas SP

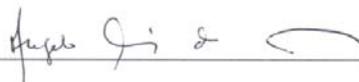
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

- V439e **Varzim, Fernanda Leme Silva Bastos**
Esterilização de ovos de moscas (*Chrysomya putoria*) (Diptera:
Calliphoridae) para utilização em Bioterapia / Fernanda Leme Silva Bastos
Varzim. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.
- Orientador: Ângelo Pires do Prado.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.
1. Esterilização. 2. *Chrysomya putoria*. 3. Bioterapia.
I. Ângelo Pires do Prado. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 23 de fevereiro de 2005

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado (Orientador)



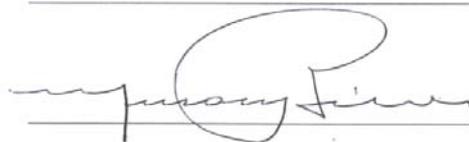
Prof. Dr. Arício Xavier Linhares



Prof. Dr. Newton Goulart Madeira

Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro

Prof. Dr. Muracy Bélo



- *A Deus, minha força superior;*
- *Aos meus pais pelo apoio, ajuda e incentivo em todos os momentos;*
- *Ao Tarcísio pela paciência, compreensão e companheirismo;*
- *A Mariana minha querida filha pelas horas e dias em que fiquei ausente;*
- *Aos amigos do Hovet*

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado oportunidade e forças em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Ângelo Pires do Prado pela oportunidade, paciência, orientação e amizade.

A UNIFEQB pela liberação, colaboração e apoio em todas as etapas.

A todos os colegas que com grande atenção e boa vontade ajudaram e tornaram possível chegar até aqui; vocês foram fundamentais e maravilhosos:

- Aos professores que participaram da pré-banca da tese: Prof. Dr. Odair Benedito Ribeiro, Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, Prof. Dr. Newton Goulart Madeira e Prof. Dr. Muracy Bélo, pela disponibilidade e valiosas contribuições;
- A todos funcionários e professores do Departamento de Parasitologia da Biologia da Unicamp;
- A todos os colegas da Pós-graduação, principalmente Ângela, Ivanilde, Tatiana, Marisa, David pela força e contribuição;
- Ao João Flávio por permitir a realização do projeto na UNIFEQB;
- Ao Júlio e Priscila que foram fundamentais na realização desta tese e ajuda na estatística, agradeço de coração;

- A Maria Lúcia minha grande e inesquecível companheira de todas as horas, pela ajuda na realização dessa tese e companhia durante esses anos. Obrigada pela sua paciência e amizade. Sentirei saudades dos bons momentos e também das horas de conversa; Agradeço você minha amiga de estar presente e por ter me dado forças até o último momento;
- Aos meus amigos Daniela, Jefferson, Teco e Maria Cândida pela amizade força e incentivo durante esses anos;
- A Silvia, Maria Emília e prof. Adriana e Hérica, pela compreensão em minhas horas ausentes e também pela ajuda, preocupação e explicações que somente acrescentaram e contribuíram muito para a realização desta tese;
- Ao Marquinhos, Marcos, D. Aninha, Sr. Vieira e em especial a minha amiga Prof. Raquel, pela ajuda e paciência, vocês foram fundamentais;
- Aos alunos da FIFEOB pela colaboração durante os procedimentos do experimento;
- Ao pessoal da limpeza, e demais funcionários do Hovet, OBRIGADO DE CORAÇÃO A TODOS!
- A todos meus familiares e pessoas que fazem parte da minha vida e que me incentivaram em todos os momentos. Em especial aos meus pais Ayrton e Shirley, a minha irmã Fábria e meus sogros Tarcisio e Celina.
- A todos que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*Existem apenas duas maneiras de
ver a vida.*

*Uma é pensar que não existem
milagres e outra é que tudo é um
milagre.*

Albert Einstein

RESUMO

A bioterapia com larvas consiste na aplicação de larvas vivas de moscas em ferimentos de difícil cicatrização, apresentado como finalidade desbridar o tecido necrosado e promover o crescimento de novos tecidos. A bioterapia poderá ser seguramente utilizada, quando larvas estéreis, são obtidas com a criação e manutenção das moscas em laboratório. A esterilização dos ovos são fatores significantes na obtenção de larvas estéreis para utilização na bioterapia. No presente estudo moscas *Chrysomya putoria* (Calliphoridae), foram capturadas, criadas e mantidas em laboratório sob condições apropriadas para esterilização dos ovos. Foi avaliada a viabilidade das larvas de *C. putoria*, utilizando oito substâncias químicas esterilizantes que foram previamente diluídas em concentrações variadas, onde ovos de *C. putoria* foram testados em variados tempos de exposição. Os esterilizantes testados foram Formoldeído, Hipoclorito de sódio Permanganato de potássio[®], Digluconato de Clorexidina, Farmasept 500[®], Farmasept 800[®], Farmasept-plus[®] e Ultrasept[®]. Todos esses esterilizantes testados com exceção do Digluconato de Clorexidina, resultaram larvas viáveis, com números de sobreviventes satisfatórios para bioterapia, mas somente o Hipoclorito de sódio 0,5%, Formaldeído 1% e Farmasept-plus na concentração de 1/4000 foram eficazes microbiologicamente e podem ser utilizadas com segurança.

Palavras-chave: bioterapia, esterilização, *Chrysomya putoria*

ABSTRACTS

The therapy with larvae on biotherapy, consists of applying live fly larvae to non-healing wounds for the purpose of unbridling the necrotic tissue and promoting the growth of healthy tissue. The biotherapy could surely be used, when larvae, are obtained by rearing and maintaining flies in the laboratory. The sterilization of eggs is a significant factor in the attaining larvae to be used in biotherapy. In the present study *Chrysomya putoria* flies (Diptera: Calliphoridae), are been captured, and kept in laboratory under appropriate conditions to obtain the eggs use in the experiments. The viability of the larvae of *Chrysomya putoria* was evaluated, using eight sterile chemical substances that had previously been diluted in different concentrations, the eggs of *Chrysomya putoria* were tested in different exposition times. The tested sterilizing substances whit Formaldehyde, Sodium hypochlorite, Potássium Permanganate, Chlorexidine Digluconate, Farmasept 500[®], Farmasept 800[®], Farmasept-plus[®] and Ultrasept[®]. All the tested substances with the exception of the of Chlorexidine Digluconate, had not affected the viability of the, resulting in satisfactory numbers of live larvae. However only sodium hypochlorite 0.5%, Formaldehyde 1% and Farmasept-plus[®] in the concentration of 1/4000 were efficient microbiologically and can be safety used.

Key words: biotherapy, sterilization, *Chrysomya putoria*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gaiolas de criação e manutenção de <i>Chrysomya putoria</i>	24
Figura 2	Ovos de <i>Chrysomya putoria</i> presentes no fígado	24
Figura 3	Materiais utilizados na esterilização dos ovos de <i>Chrysomya putoria</i>	27
Figura 4	Caixas de Isopor utilizadas para incubação dos ovos de <i>Chrysomya putoria</i>	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentrações (diluições) das substâncias esterilizantes e tempo de exposição nos ovos de <i>Chrysomya putoria</i>	28
Tabela 2- Concentrações (diluições) dos esterilizantes e tempo de exposição dos ovos de <i>Chrysomya putoria</i> , submetidos à análise microbiológica.....	34
Tabela 3- Resultado geral dos oito esterilizantes químicos nos ovos de <i>Chrysomya putoria</i>	36
Tabela 4- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Formaldeído.....	37
Tabela 5- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Hipoclorito de sódio.....	38
Tabela 6- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Permanganato de potássio.....	39

Tabela 7- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Digluconato de clorexidina.....	40
Tabela 8- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Farmasept 500.....	41
Tabela 9- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Farmasept 800.....	42
Tabela 10- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Farmasept-plus.....	43
Tabela 11- Sobrevivência média de larvas de <i>Chrysomya putoria</i> provenientes de ovos tratados por tempo diferentes em diluições de Ultrasept.....	44
Tabela 12- Análise microbiológica dos esterilizantes	45

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 A bioterapia e suas indicações.....	1
1.2 História da bioterapia.....	3
1.3 Ciclo estral.....	5
1.4 Propriedades terapêuticas.....	8
1.5 Esterilização dos ovos.....	10
1.6 Agentes antimicrobianos utilizados como esterilizantes na bioterapia.....	13
1.7 Aplicação terapêutica das larvas.....	18
2. Material e métodos.....	22
2.1 Seleção das moscas.....	22
2.2 Criação e manutenção das moscas.....	22
2.3 Esterilização dos ovos.....	25
2.4 Incubação dos ovos.....	29
2.5 Avaliação microbiológica.....	30
2.6 Avaliação estatística.....	34
3. Resultados.....	36
3.1 Análise das amostras em geral.....	36
3.2 Análises comparativas dentro dos grupos de esterilizantes.....	37

3.2.1 Formoldeído.....	37
3.2.2 Hipoclorito de sódio.....	38
3.2.3 Permanganato de potássio.....	39
3.2.4 Digluconato de clorexidine.....	40
3.2.5 Farmasept 500.....	41
3.2.6 Farmasept 800.....	42
3.2.7 Farmasept-plus.....	43
3.2.8 Ultrasept.....	44
3.3 Análise microbiológica dos esterilizantes.....	45
4. Discussão.....	46
Conclusão.....	58
Referências.....	60
Anexo.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 A BIOTERAPIA E SUAS INDICAÇÕES

A bioterapia, terapia larval ou biocirurgia consiste na utilização de larvas vivas de moscas para limpeza de feridas crônicas ou infectadas, removendo tecido necrosado e diminuindo o risco de infecção (LERCH et al., 2003). Dessa maneira, a principal vantagem da terapia larval inclui a eficácia em remover tecido morto ou necrótico. Estas e outras vantagens têm sido responsáveis pelo recente reaparecimento e crescimento no uso da terapia larval em muitos países do mundo (THORTON et al., 2002; SHERMAN et al., 2000).

O uso de larvas de moscas para a cura de feridas é relatado desde o início do século passado, onde foi observado que larvas desbridavam tecidos necróticos de feridas, melhorando o prognóstico da doença em alguns pacientes (ALDRIDGE, 2001; HINSHAW, 2000). Essa terapia iniciou-se durante a primeira grande guerra mundial em soldados que apresentavam feridas de pele (MERCOLA, 2000; HALL, 1999; SHERMAN, 1996). A principal utilização da terapia larval nas décadas de 30 e 40 era no tratamento de pacientes com osteomielite, mas atualmente ela também é indicada em feridas de pele, feridas pós-cirúrgicas, feridas crônicas de diabetes, ferimentos necrosados ou crônicos, processos exsudativos, úlceras de pressão, lesões traumáticas, alguns tumores e gangrenas intratáveis (MARTINI &

SHERMAN, 2003; SHERMAN, 2003; KNOWLES et al., 2001; SHERMAN et al., 2000; THOMAS et al., 1999; SHERMAN, 1996; MUMCUOGLU et al., 1997). O tratamento larval é contra-indicado em feridas que sangram com facilidade, feridas que têm comunicação com uma cavidade ou qualquer órgão interno e naquelas que estão muito próximas a grandes vasos sanguíneos (THOMAS, 2002).

De acordo com WOLFF & HANSSON (2003) o tratamento larval é eficaz em todos os tipos de feridas necrosadas, pois relatos de sucesso foram apresentados por MACDOUGALL & RODGERS (2004), SHERMAN (2003), em um paciente que apresentava ferida necrótica localizada na parte anterior da tíbia com dificuldade de cicatrização e dor. KITCHING (2004) descreve que inicialmente o tratamento com larvas era rejeitado pelos pacientes, e posteriormente a terapia foi aceita, uma vez que se iniciava e observava os resultados. A terapia larval ocasionalmente causa uma sensação de coceira ou cócegas, sendo que MUMCUOGLU (2001) relatou que aproximadamente 20 a 25% dos pacientes tratados com a bioterapia necessitam de aplicação de analgésicos.

Durante o tratamento larval além de ocorrer uma boa cicatrização da ferida, uma marcada atividade microbiana e secreção de enzimas proteolíticas podem ser detectadas (KLOTZBACH et al., 2002). Os efeitos da terapia larval foram observados por WOLF & HANSSON (2003) em 74 pacientes com feridas necrosadas crônicas de variadas etiologias, mostrando-se efetiva em 86% das feridas e uma única aplicação foi clinicamente benéfica em dois

terços dos pacientes. As outras feridas que não demonstraram boa resposta, foi atribuída a morte da larva. Estes mesmos autores notaram também uma redução do odor nessas feridas tratadas. SHERMAN et al. (1995) mencionaram que a cicatrização de uma ferida necrosada, com tratamento larval foi mais rápida e efetiva, quando comparada com outros métodos não cirúrgicos ou outras terapias convencionais.

DUNN et al. (2002) descreveram um caso em que foi benéfico a aplicação de larvas em um paciente com fascite cervical necrosante, localizada na cabeça e pescoço e que já havia sido submetido ao desbridamento cirúrgico. Este relato mostra que as indicações da terapia larval nem sempre se limitam às feridas necróticas que envolvem membros inferiores, mas também em outras localidades e até mesmo feridas secundárias a tumores e aqueles resistentes à antibioticoterapia (SEALBY, 2004; THOMAS *et al.*, 1999).

1.2 HISTÓRIA DA BIOTERAPIA

Segundo, SHERMAN et al., (2000); CHURCH (1999); SHERMAN (1996); THOMAS et al. (1996); SHERMAN & PETCHER (1988); ERDMANN (1987); TEICH & MYERS (1987), há evidências que a bioterapia era utilizada por tribos aborígenes da Austrália e possivelmente os Maias na América Central. No exército de Napoleão em 1829 o cirurgião Dominic Larrey, descreveu que quando as larvas se desenvolviam em feridas de soldados em batalha, elas previniam o aparecimento de infecção e aceleravam a

cicatrização. Porém, não houve evidências que Larrey introduziu larvas em feridas de seus pacientes, sendo esses relatos não evoluíram para pesquisa e foram esquecidos. O cirurgião do exército confederado da guerra civil americana, J. Zacharias, pode ter sido o primeiro médico ocidental a introduzir intencionalmente larvas em feridas com o propósito de limpar e cicatrizar feridas, mas suas experiências não foram bem documentadas. O descobridor da bioterapia moderna a realizar o primeiro estudo científico, foi William Baer, professor clínico de cirurgia ortopédica da Faculdade de Medicina Johns Hopkins em Maryland. Nos campos de batalha da Primeira Guerra Mundial, William Baer observou dois soldados que sobreviveram com fraturas expostas de fêmur e a grandes ferimentos abertos no abdome e escroto. Estes soldados ficaram perdidos no campo de batalha por sete dias, sem alimentação e cuidados médicos. Embora as condições dos soldados fossem precárias, uma inspeção mostrou que seus ferimentos apresentavam granulações róseas, sem evidências de febre e infecção sistêmica e ainda nenhum osso à mostra, mas estavam infestados com milhares de larvas.

MARTINI & SHERMAN (2003), MULDER (1989) relataram que durante 10 anos Baer refletiu sobre essa experiência e, em 1927, colocou suas observações em prática no Hospital Johns Hopkins em Baltimore, dando início à terapia com larvas. De acordo com SHERMAN et al., (2000); SHERMAN (1996), o professor tratou 4 crianças com osteomielite no Hospital de Baltimore. Inicialmente a utilização de larvas não esterilizadas foi sucesso, sendo que as feridas cicatrizaram em 6 semanas. Baseando-se nesses

resultados, Baer utilizou essa técnica mais vezes. Entretanto, muitos pacientes desenvolveram tétano, e ele concluiu que seria necessário fazer a esterilização das larvas. Muitos artigos foram publicados na década de 1930 descrevendo como obter larvas esterilizadas, com a conclusão de que seria difícil ou mesmo impossível. Posteriormente os ovos foram esterilizados com sucesso, mas muitos métodos que destruíaam as bactérias também foram letais para ovos.

A utilização de larvas em feridas foi muito comum durante a década de 1930, particularmente nos Estados Unidos, onde larvas de *Lucilia sericata* (Meigen) foram produzidas comercialmente em grande número por uma companhia farmacêutica. Com o uso dos antibióticos, a prática da terapia larval declinou na década de 1940, mas desde aquele tempo anúncios isolados de resultados benéficos da contaminação acidental de feridas com larvas de moscas, tem aparecido em literatura. Com essas observações e os sérios problemas clínicos associados com a resistência aos antibióticos, alguns clínicos tem reconsiderado o uso da terapia larval (MARTINI & SHERMAN, 2003; JONES et al., 1998; SHERMAN et al., 2000; SHERMAN, 1996).

1.3 CICLO VITAL

Segundo MULDER (1989), o conhecimento sobre a biologia das moscas é muito importante para se obter larvas em um tempo correto durante o ciclo de vida.

As moscas são insetos holometábolos, ou seja, apresentam estágios de ovo, larvas, pupa, adulto. As moscas adultas depositam seus ovos nas partes de mamíferos e aves mortos tais como regiões membranosas de mucosas e olhos, em carne crua ou cozida, em ferimentos abertos e, ocasionalmente em fezes e frutas. As larvas eclodem dentre de 8 a 24 horas e as larvas recém-eclodidas entra na fonte nutritiva se alimentando da secreção de solução proteolítica que irá digerir o alimento fora do corpo. O alimento liquefeito será ingerido para o trato gastrointestinal. A alimentação continua por 3 a 7 dias e a larva abandona a fonte de comida e se enterra alguns centímetros de profundidade no solo, entrando no estágio de pupa, que dependendo da temperatura emerge entre 10 a 18 dias, a mosca adulta (ZUMPT, 1965). Entretanto, o período ativo segundo MULDER (1989) para utilização das larvas no tratamento larval é aproximadamente 5 dias após a eclosão da larva.

Segundo MARTINI & SHERMAN (2003); IVERSEN (1996); SHERMAN et al. (2000); HALL (1999), a terapia larval é uma forma controlada de miíase em humanos, ou seja, uma miíase induzida por espécies apropriadas de dípteros que são introduzidas no tecido necrótico provocando efeitos benéficos. Miíase é definida como uma “infestação por larvas de moscas em vertebrados vivos, que, ao menos por certo período, se alimentam de tecido morto ou vivo do hospedeiro, substâncias corpóreas líquidas ou da comida ingerida pelo hospedeiro”. (ZUMPT, 1965). Muitas espécies de moscas têm sido relatadas como causadoras de miíase humana, mas somente um pequeno número é conhecido para a utilização em medicinal, pois algumas

podem invadir os tecidos saudáveis adjacentes ao ferimento e expandí-lo ao invés de curá-lo, podendo, como a *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), causar até a morte do indivíduo. Segundo MARTINI & SHERMAN (2003) e ZUMPT (1965) a miíase é classificada em três tipos: obrigatória, ocorrendo somente em tecidos vivos; facultativa, em que os parasitas podem desenvolver em tecido morto de animais vivos, mas que são também capazes de se desenvolver em matéria orgânica em decomposição; e acidental, normalmente não causam miíase, mas podem, eventualmente, alimentar-se em um hospedeiro.

A terapia larval pode utilizar larvas provenientes de duas famílias de dípteros: Calliphoridae e Sarcophagidae. Os Calliphoridae são mais utilizados por serem considerados mais eficientes, com o desenvolvimento mais rápido das larvas, facilidade de criação “in vitro”, facilidade de esterilização dos seus ovos e geralmente não invadem órgãos internos, entretanto, o principal fator que determina a eficácia das moscas no tratamento é a habilidade para induzir “miíases secundárias” no tecido necrótico, sem danificar o tecido vivo da ferida em tratamento.

As espécies mais utilizadas na bioterapia pertencem à família Calliphoridae: *Lucilia sericata* (Meigen), *Lucilia illustris* (Meigen) e *Phormia Regina* (Meigen). Destas, a *Lucilia sericata* ocorre no Brasil, mas algumas espécies locais podem ser candidatas para esse tipo de utilização, sendo necessários mais estudos. Outras espécies como *Lucilia caesar* (Linnaeus), *Lucilia cuprina* (Wiedemann), *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy),

Chrysomya rufifacies (Macquart), *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) também podem ser utilizadas no tratamento larval. Entretanto, as espécies *Chrysomya bezziana* (Villeneuve) e *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), não são indicadas para o tratamento larval, porque elas se alimentam de tecido vivo (MARTINI & SHERMAN, 2003; LINHARES, 2000; SHERMAN et al., 2000).

1.4 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS

A terapia larval promove a cicatrização por vários mecanismos que são: remoção mecânica de bactérias causada pelo aumento acentuado do exsudato seroso, produzido pelo efeito irritativo das larvas sobre o tecido sadio; proliferação rápida do tecido de granulação resultante do estímulo constante produzido pela movimentação das larvas sobre o tecido sadio; liquefação enzimática do tecido necrosado; destruição de bactérias no tubo digestivo das larvas; presença de alantoína, uma substância antibacteriana produzida pelas larvas; alcalinização do meio devido à liberação de amônia e carbonato de cálcio, o que inibe a proliferação bacteriana (MUMCUOGLU et al., 2001; LINHARES, 2000; HALL, 1999; THOMAS et al., 1999; PRETE, 1997; TEICH & MYERS, 1986; SIMMONS, 1935; HOBSON, 1932 A). A alcalinização da ferida, também proporciona uma cicatrização mais rápida quando comparada com feridas com pH ácido (ROBINSON & BAKER, 1938). De acordo com WOLLINA et al. (2002) além desses mecanismos citados

anteriormente, ocorre um aumento da oxigenação tecidual o que também contribui para que a cicatrização seja efetiva durante o tratamento larval.

ERDMANN & KHALIL (1986) isolaram dois compostos antibacterianos produzidos pela cepa de *Proteus mirabilis* proveniente de larvas *Cochliomyia hominivorax* e identificados como ácido fenilacético (PAA) e fenilacetaldeído (PAL). Esses agentes agem inibindo ou matando a bactérias, prejudicando o transporte de algum aminoácido ou desacoplando a fosforilação oxidativa. Dessa maneira, estes mesmos autores demonstraram o efeito bactericida dessas substâncias nas larvas de *Calliphora vicina* que apresentavam bactérias gram positivas e gram negativas e que foram rapidamente eliminadas pela presença de *Proteus mirabilis*, chamando esta ação de “mirabilicida”.

ERDMAN (1987) demonstrou a ação bactericida dos compostos PAA e PAL, quando isolou bactérias e as incubou com uma solução contendo *Salmonella typhimurium*, observando a sua eliminação por esses compostos. Este mesmo autor relata que o *Proteus mirabilis* é um endosimbionte presente em várias espécies de moscas varejeiras, fazendo parte da microflora normal, controlando o microambiente interno e externo, inibindo o crescimento de outras bactérias que podem competir com as larvas ou tornar o ambiente da ferida desfavorável a elas.

1.5 ESTERILIZAÇÃO DOS OVOS

IVERSEN (1996); MACKERRAS & FRENEY, (1932) relataram a obtenção satisfatória de larvas esterilizadas com a criação e manutenção das moscas em laboratório. Para esta finalidade, os ovos devem ser lavados e esterilizados sob condições assépticas, usando equipamentos adequados, pois de acordo com JONES et al.(1998), a superfície externa dos ovos normalmente é muito contaminada com bactérias. Após a esterilização os ovos devem ser transferidos assepticamente para frascos estéreis contendo um substrato apropriado para eclosão e manutenção da viabilidade das larvas. Segundo THOMAS (2002) as larvas eclodidas podem ser estocadas entre 8 a 10 graus e utilizadas entre 12 horas. Cada grupo de ovos esterilizados pode ser testado previamente ao uso por testes microbiológicos. Dessa maneira várias substâncias anti-sépticas e técnicas de como esterilizar ovos de moscas foram descritas.

MACHERRAS & FRENEY (1932) utilizaram o Sulfato de sódio cristalino a 1% para separar os ovos de *Lucilia cuprina* e os esterilizaram com solução aquosa de Cloreto de mercúrio a 0,4%. HOBSON (1932 B) utilizou em ovos de *Lucilia sericata* os mesmos anti-sépticos, mas na concentração de 0,1%, sendo que esta mesma substância e concentração foram utilizadas por LUNAU et al.(1993) para esterilizar ovos de nematódeos de *Steinernema* sp. e *Heterorhabditis* sp. A esterilização sugerida por MACHERRAS & FRENEY (1932), foi satisfatória quando foram utilizadas pequenas quantidades de ovos, pois tentativas de esterilização de grandes quantidades foram desfavoráveis,

ou seja, apresentaram contaminação devido ao agrupamento dos ovos, que impediu o completo contato com o desinfetante ou esterilizante testado.

HINSHAW (2000) e CHILD *et al.* (1931), relataram o uso do Hipoclorito de sódio diluído e do Formaldeído 4% como satisfatórios. Essas substâncias são citadas por serem de fácil manuseio e de custo baixo. SHERMAN *et al.* (2000) sugerem as mesmas substâncias descritas acima, mas utilizando Hipoclorito de sódio puro e Cloreto de mercúrio ou Formaldeído. Entretanto IVERSEN (1996) realizou a desinfecção dos ovos com Hipoclorito de sódio a 5%.

MUMCUOGLU (2001) esterilizou os ovos com Hipoclorito de sódio 0,5% e Formaldeído a 0.5%. Após a esterilização os ovos foram lavados com água estéril, removidos e colocados em placa de petri com agar fígado, incubadas em temperatura de 25-30^oC de uma noite para outra. As placas com as larvas podem também ser usadas para manter as colônias, quando deixadas em temperatura de 30-35^oC por 2-3 dias, até as larvas estarem grandes o suficiente para serem repassadas para um recipiente de plástico contendo meio apropriado para o seu desenvolvimento.

As larvas quando refrigeradas podem ser usadas em até cinco dias. Depois disto, a taxa de mortalidade pode ultrapassar 50%. A esterilização das larvas para a utilização em bioterapia pode ser assegurada pelas amostras de cultura em ovo albumina estéril (IVERSEN, 1996; MUMCUOGLU, 2001; SHERMAN e WYLE, 1996).

Os esterilizantes utilizados por FINE & ALEXANDER (1934) foram solução de Formalina a 10% seguida de solução de Cloreto de sódio a 0,85%. A desinfecção também foi satisfatória em Formalina a 5%, com prévia imersão em Hidróxido de sódio ou potássio 4% (WHITE, 1932). Técnicas similares foram sugeridas por SHERMAN & PECHTER (1988) e SIMMONS (1934), com Formaldeído 5% e Hipoclorito de sódio ou Peróxido de hidrogênio. BUNKINS et al. (1985) utilizaram solução de Bicloreto, porém quando testaram Peróxido de hidrogênio não obtiveram sucesso.

A solução de White foi efetiva com ovos de 12 espécies de moscas. Os ovos foram separados e lavados com água destilada e em seguida esterilizados com Formalina a 5%, Hipoclorito de sódio 1:1000 e solução de White. Outros métodos também apresentaram igual eficácia de assepsia, como o Mertiolate 1:20.000 e 10% de Formalina neutra a 0.05%. Uma mistura de Formalina 5% e KOH 1% foi também efetiva. A utilização de Lysol[®] 3% ou Cloreto de benzalcônio 0,1%, em ovos de moscas mostraram-se eficazes (SHERMAN & WYLE, 1996; SHERMAN & TRAN, 1995; GREENBERG, 1973; GREENBERG, 1970; GREENBERG, 1954).

Assim como o Formaldeído é utilizado para esterilizar ovos de moscas, este também foi utilizado por BASS & BARNES (1969) na concentração de 0,05%, para controle microbiano de dietas artificiais para *Graphohnathus* sp.

Variadas técnicas e substâncias esterilizantes foram descritas por GREENBERG & GEORGE (1985) para ovos de moscas tais como: Clorox[®], Solução de White (Cloreto de mercúrio, Cloreto de sódio, HCL, Etanol, e água destilada), Cloreto de benzalcônio, Lysol[®], Formalina e Mertiolate. Estes mesmos autores relatam que desinfetantes como o Cloro livre dependendo da concentração e tempo de exposição, podem afetar a sobrevivência dos ovos. A esterilização com ovos de *Musca domestica* utilizando Clorox[®] foi satisfatório quando realizado por BROOKES & FRAENKEL (1958).

A utilização de larvas assépticas previne sérias complicações durante a realização da terapia larval, evitando a infecção por microorganismos, pois há relatos de existirem aproximadamente 250 espécies diferentes de bactérias encontradas na superfície de uma única mosca (NUESCH et al., 2002; SHERMAN & PETCHER, 1988).

1.6 AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS COMO ESTERILIZANTES NA BIOTERAPIA

São chamados agentes antimicrobianos as substâncias químicas utilizadas para matar ou inibir o crescimento de microorganismos. Há centenas de diferentes produtos químicos disponíveis para o controle dos microorganismos, sendo que alguns compostos químicos antimicrobianos matam os microorganismos enquanto outros inibem o crescimento. Alguns podem inibir ou matar, dependendo da concentração utilizada. Alguns são

ativos contra um grande número de espécies e são caracterizados como de amplo espectro de atividade, enquanto outros podem afetar somente poucas espécies, não existindo um único composto químico que seja ideal para todos os propósitos. Desta maneira, é necessário determinar as vantagens que o agente apresenta quando utilizado em determinadas situações, assim como o modo de ação e suas atividades (PELCZAR JR. et al., 1980).

As principais características que seriam encontradas em um agente químico antimicrobiano “ideal” são: atividade antimicrobiana, solubilidade, estabilidade, ausência de toxicidade, homogeneidade, inativação mínima por material estranho, atividade em temperaturas ambiente ou corporal, poder de penetração, ausência de poderes corrosivos e tintoriais, poder desodorizante, capacidade detergente, disponibilidade e baixo custo. Os agentes químicos antimicrobianos podem ser: esterilizantes, desinfetantes, germicidas, anti-séptico, saneador (PELCZAR JR et al., 1980).

A assepsia é o conjunto de medidas empregadas que visa impedir a penetração e o crescimento de germes num determinado ambiente ou estrutura, tornando-os livres de agentes infectantes, com ou sem o uso de substâncias anti-sépticas ou desinfetantes. Por outro lado, os desinfetantes são substâncias utilizadas para destruir todas as formas vegetativas de microorganismos em superfícies ou objetos inanimados, não promovendo necessariamente a esterilização do material. Os anti-sépticos são utilizados no tratamento e profilaxia antimicrobiana em tecidos do organismo, pele e mucosas, inibindo a reprodução ou a velocidade de crescimento dos microorganismos nestes locais

(PELCZAR JR. et al. 1980; PAULINO, 1999). Os esterilizantes são compostos químicos que destroem ou removem todas as formas de vida microscópica de um objeto ou espécime. Germicida é um agente químico que mata as formas vegetativas de microrganismos não patogênicos ou patogênicos, mas não necessariamente suas formas esporuladas. O Saneador é um agente que mata 99,9% dos microrganismos contaminantes de uma área e é aplicado em objetos inanimados tais como utensílios em restaurantes, equipamentos de laticínios e indústrias de alimentos (PELCZAR JR. et al., 1980).

O Digluconato de clorexidina é uma substância com atividade anti-séptica e desinfetante mais conhecida das biguanidas e muito utilizada em Medicina Veterinária; tem ação contra bactérias gram negativas e gram positivas, leveduras e fungos, não agindo sobre esporos bacterianos e fungos filamentosos, a ação viricida é fraca. É formulado em distintas concentrações em função da ação esperada, sendo um bom antilevedúrico entre 2 a 4%. Nas concentrações entre 1 a 4% é comercializado como sais de diacetato sob as formas de xampu, unguento ou solução, sendo que a concentração mais efetiva como antiséptico é a 3%. Desse modo o Digluconato de clorexidina é utilizado como solução para irrigação de feridas, mostrando-se muito eficaz na prevenção de infecções em feridas contaminadas com *Staphylococcus aureus*, quando comparada com outros anti-sépticos. Segundo este mesmo autor a Clorexidina tem como vantagens baixa capacidade de provocar irritações nos tecidos e mucosas; é menos inativada por matéria orgânica que os compostos halogenados (iodo e cloro); não é absorvida através da pele intacta ou mucosa

e tem importante ação residual por mais de 24 horas, se deixada em contato com o local contaminado por um determinado período de tempo (PAULINO, 1999; LARSON et al., 2002).

O Permanganato de potássio é um agente oxidante, que em contato com os tecidos, libera moléculas de oxigênio nascente, com alto poder oxidante, levando a uma breve ação anti-séptica, desodorizante e fungicida. Apresenta a vantagem de ser de baixo custo e mesmo quando empregado na diluição correta, pode manchar a pele e as mucosas, além de poder ser irritante para a pele e mucosas. Como fator limitante de seu emprego, tem-se sua inativação pela presença de matéria orgânica (PAULINO, 1999; LARSON et al., 2002).

O Cloreto de benzalcônio, presente no Farmasept 500[®], Farmasept 800[®], Farmasept-plus[®] e Ultrasept[®], são compostos quaternário de amônia ou surfactantes catiônicos, que apresentam espectro de ação efetiva contra uma variedade de bactérias gram positivas e gram negativas, mas não são eficazes contra esporos bacterianos e vírus que não apresentam envelope lipídico. Esses agentes são desinfetantes de superfícies, materiais inanimados, utensílios e equipamentos para processamento de alimentos e para higienização de ovos para o controle da Salmonelose. Este químico apresenta em geral vantagens de não ser irritante para a pele e tecidos, baixa toxicidade, são inodoros, podem ser utilizados em soluções com água e álcool; têm ação residual; podem ser usados em temperaturas altas e têm boa atividade germicida em pH alcalino (PAULINO, 1999).

O Glutaraldeído presente nos químicos Farmasept- plus[®] e Ultrasept[®], é eficaz contra todos os tipos de microorganismos, inclusive vírus e esporos bacterianos, é um desinfetante e esterilizante, sendo de fácil penetração e mais ativo na presença de matéria orgânica e de espectro bactericida mais amplo. Este composto é preparado comercialmente na concentração de 2% e apresenta como desvantagem à alta mortalidade quando utilizado na desinfecção de ovos para incubação (PAULINO, 1999).

O antimicrobiano Hipoclorito de sódio é derivado do cloro inorgânico que apresenta com espectro de ação boa ação fungicida, algicida, protozoocida, viricida e contra formas vegetativas de bactérias, mas não é tão efetivo contra esporos bacterianos, mas tem rápida ação bactericida. As soluções de hipoclorito de sódio variam de 1 a 15% e liberam entre 1 a 5% de cloro livre; estas soluções podem ser anti-sépticas, desinfetantes e esterilizantes. A solução de Hipoclorito de sódio na concentração de 0,5%, chamada também de líquido ou solução de Dakin é muito utilizada em Medicina Veterinária para irrigação de abscessos ou feridas, com a finalidade de promover a sua limpeza e anti-sepsia, apresentando poder bactericida e liquefaz o tecido necrótico das feridas. O Hipoclorito de sódio em geral, apresenta como vantagem o custo que é relativamente barato, tem ação rápida; é efetivo em altas diluições contra ampla variedade de microorganismos; há facilidade na sua preparação e aplicação; sua concentração é facilmente determinada e pode ser usado até mesmo no tratamento da água; suas soluções são pouco tóxicas, pouco irritantes e de baixo custo. As desvantagens do

Hipoclorito de sódio é que o cloro é corrosivo para metais e parcialmente inativadas na presença de matéria orgânica (PAULINO, 1999).

PAULINO (1999) descreve que o Formaldeído é bacteriostático e em soluções mais fortes é bactericida, esporicida e fungicida. É um germicida eficiente, mas de ação lenta contra bactérias, fungos e vírus. Sua principal utilização atualmente é para desinfecção de aparelhagem e áreas contaminadas. O formaldeído apresenta a vantagem de ter baixa toxicidade sistêmica e baixo custo. A desvantagem é que o formaldeído tem ação muito lenta contra esporos bacterianos; é menos eficiente na presença de matéria orgânica e é irritante para a pele e mucosas.

O conhecimento dos antimicrobianos é necessário, uma vez que a sua utilização possa ser realizada de maneira adequada, segura e eficaz na bioterapia (PELCZAR JR. et al., 1980).

1.7 APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DAS LARVAS

Segundo MARTINI & SHERMAN (2003), as larvas esterilizadas são colocadas em uma gaze úmida e aplicadas diretamente sobre o ferimento. O curativo utilizado consiste de duas camadas: a inferior, cujo propósito é manter as larvas no ferimento, enquanto permite a entrada de oxigênio e drenagem do tecido necrótico liquefeito, é fixada à pele intacta ao redor da lesão, e a superior, feita de gaze seca, é colocada sobre a outra para absorver as secreções. Quando a lesão está localizada nos membros inferiores, utiliza-se preferencialmente uma meia de nylon esterilizada, pois ela irá expandir

junto com o crescimento das larvas e movimento dos membros, impedindo a compressão e morte das mesmas, e permite uma excelente visão da lesão sem a necessidade de removê-la. A superior deve ser trocada a cada 3-4 horas, com a finalidade de manter uma boa drenagem e impedir a morte das larvas por afogamento.

Estes mesmos autores relataram que as larvas jovens, com cerca de 2 milímetros de comprimento, são aplicadas nos ferimentos em períodos de 48 a 72 horas, uma ou duas vezes por semana. Quando estão totalmente desenvolvidas, migram para a superfície, de onde são facilmente removidas com a ajuda de soro fisiológico. O tempo total de tratamento depende do tamanho e característica da lesão, da resposta clínica e dos objetivos da terapia. Há relatos que os antibióticos não influem no desenvolvimento e crescimento das larvas, mantendo sem alteração a sua ação terapêutica.

Segundo FINE & ALEXANDER (1934) a terapia larval apresenta algumas dificuldades e vantagens tais como: espécie adequada da mosca, a constante produção de grande quantidade de ovos, a esterilização de ovos e um resultado satisfatório das larvas na ferida.

Segundo HINSHAW (2000), como a Medicina moderna continua procurar por formas alternativas para substituir drogas ineficazes e tratamentos ineficientes na cura de feridas, parece que a terapia larval continuará a ser modificada e possivelmente tenha a tendência de ser uma opção de tratamento. O sucesso deste tratamento tem implicações para a

Medicina não tradicional na Medicina moderna e no reconhecimento da bioterapia para o uso na Medicina Veterinária.

A literatura veterinária contém poucos artigos sobre terapia larval, alguns casos de insucesso foram segundo HINSHAW (2000), com a utilização de ovos não esterilizados, contaminando a ferida com mais bactérias, embora o uso de larvas sépticas por DICKE (1953) para tratar um bovino com *Actinomyces bovis* tenha sido um sucesso. Foi relatado por BELL & THOMAS (2001) a utilização da terapia larval em um muar idoso, que apresentava paniculite supurativa severa, secundária a uma ferida de pele contaminada por variadas bactérias tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Streptococcus* sp. A lesão não respondeu à medicação convencional e nem ao tratamento cirúrgico, mas obteve sucesso quando foi aplicado larvas esterilizadas de *Lucilla sericata*. A terapia larval pode ser usada em bovinos de corte e leite sem causar efeitos residuais, em feridas de eqüinos sem alterar a flora intestinal e em pequenos animais, principalmente quando os proprietários não têm recursos para realizar a cirurgia. Muitos outros benefícios da terapia larval têm sido documentado com sucesso (HINSHAW, 2000).

Frente a esses aspectos, este trabalho tem os seguintes objetivos:

- Descrever e avaliar a técnica de esterilização de ovos de *Chrysomya putoria* pelo uso de esterilizantes, observando a viabilidade e taxa de eclosão das larvas.

- Testar e avaliar a qualidade dos tipos de esterilizantes, que poderão ser mais comumente utilizados, por meio de testes microbiológicos.

- Introduzir na bioterapia a técnica de esterilização dos ovos, permitindo a sua utilização e possibilitando maior eficácia no tratamento dos animais, reduzindo o número de infecções com um procedimento fácil e barato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS MOSCAS

Exemplares de *Chrysomya putoria* (Wiedemann)(Díptera: Calliphoridae), foram capturados no aterro sanitário de São João da Boa Vista, utilizando armadilhas cilíndricas contendo como iscas vísceras de frango putrefeitas, como sugerida por LINHARES (1981) e FERREIRA (1978).

Os testes foram realizados no Laboratório de Entomologia do Centro Universitário da Fundação de Ensino “Octávio Bastos”, situada na cidade de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo (22°01.824’ de latitude Sul, 46° 48.488’ de longitude Oeste).

2.2 CRIAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS MOSCAS

A criação e manutenção das moscas em laboratório visaram reproduzi-las em condições semelhantes o ambiente natural, originando várias gerações para obtenção dos ovos e realização dos testes de esterilização.

As moscas foram criadas e mantidas em laboratório, tanto em gaiolas trapezoidais de plástico (33x33x25cm) como de metal (30x30x45cm). As gaiolas de metal foram revestidas inteiramente com telas de “nylon”, enquanto que as gaiolas de plásticos apresentavam aberturas na superfície superior recobertas com tela de “nylon”, para permitir aeração (Fig.1). Em uma das laterais foi colocado um tecido em formato de “manga de camisa”, com a finalidade de facilitar a manipulação dos recipientes de alimento, água

das moscas e realizar outros procedimentos necessários. Nestas gaiolas, as moscas receberam água por um recipiente plástico, em que foi feito um orifício no centro da tampa por onde foi introduzida uma gaze, onde a mesma ficava com a extremidade imersa na água e a outra externamente recobrendo a tampa (SHERMAN & WYLE, 1996). As moscas adultas foram alimentadas com uma formulação apresentando proporções iguais de leite em pó, levêdo e açúcar colocado em placas de petri como sugerido por LEAL et al. (1982). Água e alimento eram oferecidos e mantidos em abundância dentro das gaiolas (SHERMAN & WYLE, 1996).

A reprodução das moscas foi obtida utilizando-se pedaços de fígado cru (10 grama aproximadamente) em placas de petri (Fig.2) e colocadas nas gaiolas em dias alternados, onde as moscas desovavam seus ovos. De acordo com IVERSEN (2002); MUMCUOGLU (2001); FINE & ALEXANDER (1934); MACKERRAS & FRENEY (1932, após um período de 4 a 6 horas os ovos eram removidos da superfície do fígado por um pincel com cerdas finas e transferidos para uma placa de petri, contendo papel filtro umedecido com água destilada. As larvas eclodiram em aproximadamente 12-24 horas, quando eram coletadas e transferidas para um meio de crescimento contendo 100 ml de água destilada, 10 gramas de leite em pó, 10 gramas de levedura, 10 gramas de caseína, 2 gramas de agar, 0,4 gramas de nipagin (LEAL et al., 1992). Este meio foi colocado em copo plástico, contendo embaixo deste uma placa de Petri de vidro com serragem para que as larvas descessem e empupassem. A temperatura foi mantida entre 24^oC a 32^oC proporcionando um bom

desenvolvimento das larvas (LEAL et al., 1992). A partir da terceira geração (F3), os ovos foram selecionados para o início dos testes e ao mesmo tempo para a manutenção da colônia (THOMAS et al., 1999)



Figura 1- Gaiolas de criação e manutenção de *Chrysomya putoria*

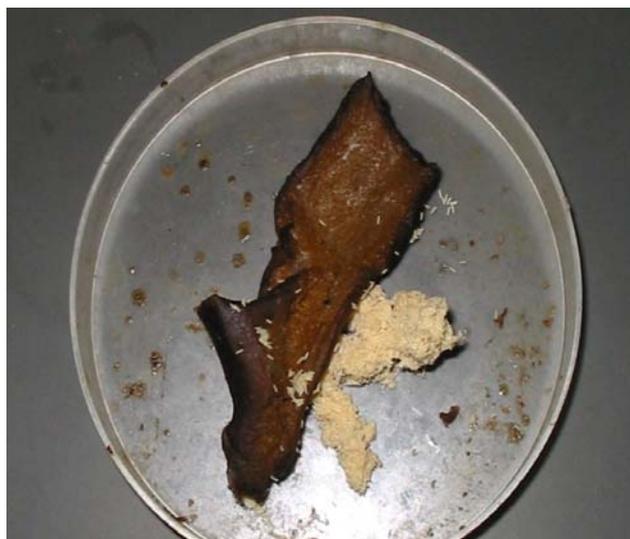


Figura 2- Ovos de *Chrysomya putoria* presentes no fígado

2.3 ESTERILIZAÇÃO DOS OVOS

Após a coleta dos ovos, estes foram colocados em placa de petri contendo papel filtro umedecido com água destilada e com a utilização de um pincel fino, foram separados por uma cuidadosa pressão mecânica (Fig.3). A separação dos ovos, segundo MACKERRAS & FRENEY (1932) e IVERSEN (2002) é importante, porque facilita a separação e ação dos químicos, eliminando as bactérias.

Para cada esterilizante os ovos foram separados em 4 grupos controle e 4 grupos teste, cada grupo contendo 60 ovos, acondicionados em papel filtro. Utilizando-se uma pinça anatômica os ovos do grupo controle em papel filtro, foram imersos em água destilada e acondicionados em frascos plásticos, enquanto que os ovos do grupo teste foram imersos em substâncias esterilizantes nas diferentes concentrações. Os grupos esterilizados nas diluições citadas abaixo apresentaram variações no tempo (tabela 1), de acordo com a eclosão das larvas e sua viabilidade sob a ação dos mesmos.

Digluconato de clorexidina (Riohex[®]) – Os grupos testes foram esterilizados nas concentrações 0,1%, 0,25%, 0,5% e 1% Cada concentração foi obtida diluindo-se Clorexidine 10% em concentrações menores com água destilada.

Hipoclorito de sódio – Os grupos testes foram esterilizados nas concentrações 0.5%, 1% e 3% Cada concentração foi obtida diluindo-se

Hipoclorito de sódio 12% (Chemco) para concentrações menores com água destilada.

Formaldeído 40% - Os grupos testes foram esterilizados nas concentrações 1%, 3%, 5% e 7,5%. Cada concentração foi obtida diluindo-se Hipoclorito de sódio 40% em concentrações menores com água destilada.

Permanganato de potássio –Os grupos testes foram esterilizados nas variadas diluições 1:50, 1:100 e 1:200. Cada diluição foi obtida, com uma pastilha de Permanganato de potássio 100mg com água destilada nas diluições acima descritas.

Farmasept 500[®] (Cloreto de benzalcônio 50%) Os grupos testes, foram esterilizados nas diluições 1:1000 e 1:4000. Cada diluição foi obtida, diluindo-se Farmasept 500[®] (Farmabase) com água destilada, segundo as recomendações do fabricante.

Farmasept 800[®] (Cloreto de benzalcônio 80%) – Os grupos testes, foram esterilizados nas diluições 1:1000 e 1:4000. Cada diluição foi obtida, diluindo-se Farmasept 800[®] (Farmabase) com água destilada segundo as recomendações do fabricante.

Farmasept-plus[®] (glutaraldeído 42,5%, Cloreto de benzalcônio 7,5%) Os grupos testes foram esterilizados em variadas diluições de 1:1000 e 1:4000. Cada diluição foi obtida, diluindo-se Farmasept-plus[®] (Farmabase) com água destilada, seguindo as recomendações do fabricante..

Ultrasept[®] (Cloro de benzalcônio 28%, aldeído oxálico 10% e glutaraldeído 4%).– Os grupos testes foram esterilizados nas diluições 1:1000 e 1:4000. Cada diluição foi obtida, diluindo-se Ultrasept[®] (Farmabase) com água destilada, segundo as recomendações do fabricante.

Após os tratamentos, as amostras foram imersas em água estéril durante 5 minutos e acondicionadas em frascos plásticos, onde posteriormente foram lacradas.



Figura 3- Materiais utilizados na esterilização dos ovos de *Chrysomya putoria*

Tabela 1- Concentração (diluições) das substâncias esterilizantes e tempo de exposição dos ovos de *Chrysomya putoria*

Esterilizante	Concentração	Tempo (Minutos)
Digluconato clorexidine	de 0.1%	1,3 e 5
	0.25%	1, 3 e 5
	0.5%	1, 3 e 5
	1%	1,3 e 5
Hipoclorito de sódio	0.5%	1, 3, 5, 10, 15 e 20
	1%	1, 3, 5, 10, 15 e 20
	3%	1, 3, 5 e 10
Formoldeído 40%	1%	1, 3, 5, 10, 15 e 30
	3%	1, 3, 5, 10, 15 e 30
	5%	1, 3, 5, 10 e 15
	7,5%	1, 3, 5 e 10
Permanganato de Potássio	1:200	1, 3, 5, 10, 15 e 20
	1:100	1, 3, 5, 10, 15 e 20
	1:50	1, 3, 5, 10, 15 e 20
Farmasept 500[®]	1:1000	3, 5, 10 e 15
	1:4000	3, 5, 10 e 15
Farmasept 800[®]	1:1000	3, 5, 10 e 15
	1:4000	3, 5, 10 e 15
Farmasept- plus[®]	1:1000	3, 5, 10 e 15
	1:4000	3, 5, 10, 15, 20, 30 e 45
Ultrasept[®]	1:1000	3, 5, 10 e 15
	1:4000	3, 5, 10, 15, 20 e 30

2.4 INCUBAÇÃO DOS OVOS

Tanto os frascos do grupo controle como os frascos do grupo teste foram colocados em caixa de isopor pequena (11,0 x 8,5 x 8,0), contendo termostato de aquário interligado com uma lâmpada 15watt (com finalidade de manter a temperatura entre 26-28^oC para eclosão das larvas), termômetro e um frasco de água para umidade. O isopor foi armazenado em geladeira (Fig.4) para evitar variações da temperatura ambiental externa.



Figura 4 - Caixas de isopor utilizadas no processo de incubação dos ovos de *Chrysomya putoria*

Após um período de 18-20 horas, os frascos foram retirados do isopor e o grupo controle e grupo teste (que passaram por tratamento químico) foram contadas e os resultados anotados para posterior análise.

2.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

O controle microbiológico das larvas foi realizado com a finalidade de testar o grau de desinfecção, quando estas foram submetidas aos tratamentos esterilizantes (MUMCUOGLU, et al., 2001; IVERSEN, 1996; SHERMAN & WYLE, 1996; FINE & ALEXANDER, 1934; SIMMONS, 1934).

Imediatamente após a eclosão das larvas tratadas quimicamente, 50 larvas de cada grupo, foram transferidas para 1 tubo de ensaio contendo 4 ml de água peptonada estéril, homogeneizadas em “vortex” e alíquotas de 0,1 ml e 1,0 ml foram inoculadas, em duplicata, por superfície, em placas de petri contendo meio Plate Count Agar (PCA). As placas foram incubadas à 25^oC e 37^oC e as leituras realizadas em 24 e 48 horas. A avaliação microbiológica foi realizada com larvas testadas nas soluções esterilizantes tais como.

Hipoclorito de sódio – foram testados microbiologicamente 2 grupos testes de larvas, contendo 50 larvas em cada grupo, que tiveram seus ovos previamente esterilizados neste químico na concentração 0,5%, sendo 1 grupo de ovos esterilizados durante 1 minuto e 1 grupo por 3 minutos. Após a eclosão essas larvas foram submetidas aos testes microbiológicas como descrito anteriormente. Devido à ausência de bactérias nas 8 placas com PCA,

não foi necessário realizar outros testes microbiológicos com amostras acima de 3 minutos e em concentrações maiores.

Formaldeído – foram testados microbiologicamente 2 grupos testes de larvas, contendo 50 larvas em cada grupo, que tiveram seus ovos previamente esterilizados neste químico na concentração 1%, sendo 1 grupo de ovos esterilizados durante 1 minuto e 1 grupo por 3 minutos. Após a eclosão, essas larvas foram submetidas aos testes microbiológicos como descrito anteriormente. Devido à ausência de bactérias não foi necessário realizar outros testes microbiológicos acima de 3 minutos e em concentrações maiores.

Permanganato de potássio - foram testados microbiologicamente 3 grupos testes de larvas, contendo 50 larvas em cada grupo, que tiveram seus ovos previamente esterilizados neste químico nas concentração de 1:200, sendo que 1 grupo de ovos esterilizados durante 1 minuto, 1 grupo esterilizado durante 5 minutos e 1 grupo por 20 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado nas concentrações de 1:100 e 1:50, utilizando 3 grupos testes para cada concentração por 1, 5 e 20 minutos. Após a eclosão, essas larvas foram submetidas aos testes microbiológicos como descrito anteriormente. Devido à presença de bactérias acima de 300 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)) em todas placas inoculadas, não se procederam outros testes microbiológicos em outras concentrações.

Farmasept 500[®] - foram testados microbiologicamente 2 grupos testes contendo 50 larvas cada, que tiveram seus ovos previamente esterilizados neste químico na concentração 1:4000, sendo que 1 grupo de ovos esterilizados durante 3 minutos e 1 grupo esterilizado por 10 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado na concentração de 1:1000, utilizando mais 2 grupos testes. Após a eclosão, essas larvas foram submetidas aos testes microbiológicos como descrito anteriormente. Devido à presença de bactérias acima de 300 UFC em todas placas inoculadas, não foi necessário realizar outros testes microbiológicos.

Farmasept 800[®] - foram testados microbiologicamente 2 grupos testes contendo 50 larvas cada, que tiveram seus ovos previamente esterilizados neste químico na concentração 1:4000, sendo que 1 grupo de ovos foram esterilizados durante 3 minutos e 1 grupo esterilizados por 10 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado na concentração de 1:1000, utilizando mais 2 grupos testes. Após a eclosão, essas larvas foram submetidas aos testes microbiológicos como descrito anteriormente. Devido à presença de bactérias acima de 300 UFC em todas placas inoculadas, não foi necessário realizar outros testes microbiológicos.

Farmasept plus[®] - foram testados microbiologicamente 1 grupo teste contendo 50 larvas cada, que tiveram seus ovos previamente esterilizados neste químico na concentração 1:4000 durante 3 minutos. Após a eclosão, essas larvas foram submetidas aos testes microbiológicos como descrito

anteriormente. Devido à ausência de bactérias nas 4 placas inoculadas, não foi necessário realizar outros testes microbiológicos acima desta concentração.

Ultrassept® - foram testados microbiologicamente 2 grupos testes contendo 50 larvas cada, que tiveram seus ovos previamente esterilizados neste químico na concentração 1:4000, sendo que 1 grupo de ovos foram esterilizados durante 3 minutos e 1 grupo esterilizados por 15 minutos. Este mesmo procedimento foi realizado na concentração de 1:1000, utilizando mais 2 grupos testes esterilizados nestes mesmos tempos. Após a eclosão, essas larvas foram submetidas aos testes microbiológicos como descrito anteriormente. Devido à presença de bactérias acima de 300 UFC em todas placas inoculadas, não foi necessário realizar outros testes microbiológicos em outras concentrações.

Para o grupo controle foram utilizados ovos imersos somente em água destilada e utilizada a mesma metodologia. Após 24 horas as larvas eclodidas foram coletadas e transferidas para tubos contendo 4 ml de água peptonada, homogeneizadas em “vortex” e a seguir foi feita diluição seriada com 9 ml de água peptonada até 10^{-6} . Para cada diluição foram plaqueadas em duplicata 0,1 ml para o meio PCA e incubados à 37°C. A leitura foi realizada após 24 e 48 horas e estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração (diluição) dos esterilizantes e tempo de exposição dos ovos de *Chrysomya putoria*, submetidos à análise microbiológica

Esterilizantes	Concentrações	Tempo/Minutos
Hipoclorito de sódio	0.5%	1 e 3
Formoldeído	1%	1 e 3
Permanganato de potássio[®]	1:50, 1:100, 1:200	1, 5 e 20
Farmasept 500[®]	1:1000	3 e 10
	1:4000	3 e 10
Farmasept 800[®]	1:1000	3 e 10
	1:4000	3 e 10
Farmasept- plus[®]	1:4000	3
Ultrasept[®]	1:1000	3 e 15
	1:4000	3 e 15

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação dos efeitos das diferentes doses dos particulares princípios ativos e dos tempos de exposição sobre o número de larvas viáveis utilizou-se o procedimento PROC GLM, do programa SAS *Statistical Analysis System*, versão 8.02 (SAS, 1995), adotando-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + T_j + PT_{i(j)} + e_{ijk}$$

em que,

Y_{ijk} = número de larvas viáveis na i -ésima dose de princípio ativo em questão e no j -ésimo tempo de exposição;

μ = média geral;

D_i = efeito da i -ésima dose do princípio ativo em questão;

T_j = é o efeito do j -ésimo tempo (em minutos) de exposição ao princípio ativo;

$PT_{i(j)}$ = é o efeito j -ésimo tempo de exposição dentro da i -ésima dose do princípio ativo em questão;

e_{ijk} = é o erro aleatório inerente a cada observação, $NID \sim (0, \sigma^2_e)$.

Em caso de efeitos significativos ($P < 0,05$) nas análises de variância para os diferentes princípios ativos avaliados, utilizou-se o teste t de Student como procedimento para comparações múltiplas.

3. RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em amostragem geral e em grupos separadamente. Os gráficos de cada grupo, podem ser encontradas no Anexo.

3.1 ANÁLISES DESCRITIVAS DA AMOSTRA EM GERAL

O Sumário das estatísticas descritivas da amostra geral são apresentados na Tabela 3

Tabela 3 Resultado geral dos oito esterilizantes químicos testados nos ovos de moscas *Chrysomya putoria*.

Variáveis	N (larvas)	Médias ± Desvio Padrão (Larvas sobreviventes)	Coefficiente de Variação	Amplitude Mínimo/Máximo	
Formoldeído	168	51,10 ± 8,61	16,88	25,00	60,00
Hipoclorito de Sódio	128	48,41 ± 10,56	21,82	13,00	60,00
Digluconato de clorexidina	56	35,82 ± 22,43	62,63	0	60,0
Permanganato de potássio	144	50,91 ± 8,78	17,25	25,00	60,00
Farmasept 500[®]	64	50,95 ± 8,44	16,58	27,00	60,00
Farmasept 800[®]	64	48,10 ± 9,61	19,98	26,00	60,00
Farmasept -plus[®]	88	50,22 ± 9,34	18,60	27,00	60,00
Ultrasept[®]	80	50,82 ± 8,84	17,39	31,00	60,00

A amostragem geral dos efeitos dos esterilizantes sobre os ovos de *Chrysomya putoria*, apresentaram os seguintes resultados: o número de ovos viáveis, variou de 0 e 60,00, com média variando entre 35,82 e 51,10 e desvio padrão entre 8,44 e 22,43 com coeficiente de variação entre 16,58 a 62,63%.

Todos os esterilizantes químicos avaliados apresentaram resultados significativos ($P < 0,05$) para os efeitos de concentrações nos tempos testados.

3.2 ANÁLISES COMPARATIVAS DENTRO DOS GRUPOS DE ESTERILIZANTES

O Sumário das estatísticas comparativas de cada esterilizante são apresentados nas Tabelas abaixo:

3.2.1. FORMALDEÍDO

As médias para as concentrações de Formaldeído, em relação aos tempos de exposição dos ovos de *Chrysomya putoria*, encontram-se na Tabela 4

Tabela 4-Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Formaldeído

Minutos	Concentrações (diluições) (%)				
	Controle	1,0	3,0	5,0	7,5
1	56,06 A	59,75 A	56,25 A	53,50 A	47,50 A
3	57,06 A	53,50 B	49,75 B	49,75 A	43,00 B
5	58,00 A	51,75 B C	44,25 C	43,00 B	39,00 B
10	57,81 A	52,50 B C	41,25 C	39,00 B	34,00 C
15	56,67 A	50,25 B C	32,25 D	32,00 C	0,00
30	54,88 A	48,25 C	30,00 D	0,00	0,00

$F_{calc}=23,56$ ($P<0,0001$)

Para cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student.

Verifica-se que a média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Formaldeído, foi maior na concentração de 1% quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando médias que variaram de 59,75 a 48,25 com maiores estimativas

de média em 1 minuto. Contudo o efeito comparativo dos minutos, na concentração de 1% de Formaldeído, em relação ao controle demonstrou que elas difereriram entre si em 1 e 3 minutos, mas não diferem entre si em 3, 5, 10 e 15 minutos, (Tabela 4)

3.2.2 HIPOCLORITO DE SÓDIO

As médias para as diluições de Hipoclorito de sódio, em relação aos tempos de exposição nos ovos de *Chrysomya putoria*, encontra-se na Tabela 5

Tabela 5 - Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Hipoclorito de sódio

Minutos	Concentrações (diluições) (%)			
	Controle	0,5	1,0	3,0
1	56,25 A	58,75 A	53,75 A	46,25 A
3	54,83 A	53,75 B	50,25 A	41,00 B
5	55,08 A	52,25 B	42,75 B	34,00 C
10	56,42 A	43,00 C	39,25 BC	18,25 D
15	56,50 A	41,25 C	35,50 C	0,00
20	51,88 B	28,50 D	26,25 D	0,00

$F_{\text{calc}} 41,61$ ($P < 0,0001$)

Para cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student

Verifica-se que a média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Hipoclorito de sódio, foi maior na concentração de 0,5% quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando médias que variaram de 58,75 a 28,50 com maiores

estimativas de média em 1 minuto. Contudo o efeito comparativo dos minutos, na concentração de 0,5% de Hipoclorito de sódio, em relação ao controle demonstrou que elas diferiram entre si em 1 e 3 minutos, mas não diferem entre si em 3 e 5 minutos, 10 e 15 minutos(Tabela 5).

3.2.3 PERMANGANATO DE POTÁSSIO

As médias de quadrados mínimos para as diluições de Permanganato de potássio, em relação aos tempos de exposição nos ovos de *Chrysomya putoria*, encontra-se na Tabela 6

Tabela 6- Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Permanganato de potássio

Minutos	Diluições			
	Controle	1/200	1/100	1/50
1	56,83 A	56,00 A	53,50 A	52,25 A
3	56,50 A	55,50 A	52,25 A	50,75 A
5	57,00 A	53,75 A	50,25 A	48,50 A
10	55,67 A	53,00 A	44,00 B	42,50 B
15	56,00 A	46,25 B	33,50 C	31,25 C
20	56,25 A	34,50 C	33,25 C	27,25 C

$F_{\text{calc}} = 30,64$ ($P < 0,0001$)

Para cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student.

Observa-se que a média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Permanganato de potássio, foi maior na diluição de 1/200 quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando médias que variaram de 56,00 a 34,50 com maiores

estimativas de média em 1 minuto. Contudo o efeito comparativo dos minutos, na diluição de 1/200 de Permanganato de potássio, em relação ao controle demonstrou que elas não diferiram entre si em 1, 3, 5 e 10 minutos (Tabela 6).

3.2.4 DIGLUCONATO DE CLOREXIDINE

As médias para as concentrações de Digluconato de clorexidina, em relação aos tempos de exposição nos ovos de *Chrysomya putoria*, encontra-se na Tabela 7

Tabela 7 -Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Digluconato de clorexidine

Minutos	Concentrações (diluições) (%)				
	Controle	0,10	0,25	0,50	1,00
1	56,31 A a	29,75 b	22,25 c	20,50 c	9,75 d
3	56,13 A	0,00	0,00	0,00	0,00
5	58,75 A	0,00	0,00	0,00	0,00

$F_{calc} = 32,55$ ($P < 0,0001$)

Para cada coluna e cada linha, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student

Observa-se que a média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Digluconato de clorexidine, foi maior na concentração de 0,10% quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando média de 29,75. Contudo o efeito comparativo das concentrações de Digluconato de clorexidine em relação ao controle demonstrou que as concentrações de 0,10%, 0,25% e

1,00% diferiram entre si, mas não diferiram entre si nas diluições de 0,25 e 0.50%.

3.2.5 FARMASEPT 500[®]

As médias para as diluições de Farmasept 500[®], em relação aos tempos de exposição nos ovos de *Chrysomya putoria*, encontra-se na Tabela 8

Tabela 8- Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Farmasept 500

Minutos	Diluições		
	Controle	1/4000	1/1000
3	56,00 A	53,25 A	51,50 A
5	58,13 A	51,50 A	49,50 A
10	56,38 A	47,75 B	44,00 B
15	56,50 A	33,75 C	30,00 C

$F_{\text{calc}} = 45,04$ ($P < 0,0001$)

Para cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student

Verifica-se que a média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Farmasept 500[®] foi maior na diluição de 1/4000 quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando médias que variaram de 53,25 a 33,75 com maiores estimativas de média em 3 minutos. Contudo o efeito comparativo dos minutos na diluição de 1/4000 de Farmasept 500[®] demonstrou que elas não diferiram entre si em 3 e 5 minutos, mas diferem entre si em 10 e 15 minutos (Tabela 8).

3.2.6 FARMASEPT 800[®]

As médias para as diluições de Farmasept 800[®], em relação aos tempos de exposição nos ovos de *Chrysomya putoria*, encontra-se na Tabela 9

Tabela 9- Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Farmasept 800[®]

Minutos	Diluições		
	Controle	1/4000	1/1000
3	55,63 A	47,50 A	45,25 A
5	56,38 A	48,25 A	40,75 B
10	56,25 A	42,00 B	33,25 C
15	56,25 A	36,50 C	27,25 D

$F_{\text{calc}}=26,29$ ($P<0,0001$)

Para cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student

A média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Farmasept 800[®] foi maior na diluição de 1/4000 quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando médias que variaram de 47,50 a 36,50 com maiores estimativas de média em 3 minutos. Contudo o efeito comparativo dos minutos na diluição de 1/4000 de Farmasept 800[®] demonstrou que elas não diferiram entre si em 3 e 5 minutos, mas diferem entre si em 10 e 15 minutos (Tabela 9)

3.2.7 FARMASEPT -PLUS®

As médias de quadrados mínimos para as diluições de Farmasept-plus®, em relação aos tempos de exposição nos ovos de *Chrysomya putoria*, encontra-se na Tabela 10

Tabela 10- Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Farmasept-plus®

Minutos	Diluições		
	Controle	1/4000	1/1000
3	56,50 A	57,25 A	52,50 A
5	57,13 A	50,25 B	45,50 B
10	58,38 A	49,25 BC	40,00 C
15	57,25 A	45,50 C	33,25 D
20	56,50 A	36,75 D	0,00
30	57,50 A	35,50 D	0,00
45	56,00 A	30,75 E	0,00

$F_{\text{calc}}=32,68$ ($P<0,0001$)

Para cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student

Observa-se que a média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Farmasept-plus®, foi maior na diluição de 1/4000 quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando médias que variaram de 57,25 a 30,75 com maiores estimativas de média em 3 minutos. Contudo o efeito comparativo dos minutos, na diluição de 1/4000 de Farmasept-plus® demonstrou que, elas diferiram entre si em 3 e 5 minutos, mas não diferem entre si em 5 e 10 minutos (Tabela 10)

3.2.8 ULTRASEPT®

As médias para as diluições de Ultrasept®, em relação aos tempos de exposição nos ovos de *Chrysomya putoria*, encontra-se na Tabela 11

Tabela 11- Sobrevivência média de larvas de *Chrysomya putoria* provenientes de ovos tratados por tempos diferentes em diferentes diluições de Ultrasept®

Minutos	Diluições		
	Controle	1/4000	1/1000
3	56,88 A	56,75 A	45,25 A
5	57,88 A	53,00 AB	39,00 B
10	57,50 A	51,50 B	39,00 C
15	56,00 A	50,50 B	32,75 A
20	59,00 A	40,50 C	0,00
30	58,00 A	34,75 D	0,00

$F_{\text{calc}}=31,18$ ($P<0,0001$)

Para cada coluna, médias seguidas por pelo menos uma letra, não diferem entre si de acordo com o Teste de *t* de Student

Observa-se que a média de larvas sobreviventes em relação aos minutos em cada diluição de Ultrasept® foi maior na diluição de 1/4000 quando comparada com as médias de larvas sobreviventes do grupo controle, apresentando médias que variaram de 56,75 a 34,75 com maiores estimativas de média em 3 minutos. Contudo o efeito comparativo dos minutos, na diluição de 1/4000 de Ultrasept® demonstrou que, elas não diferiram entre si em 3 e 5 minutos e 5, 10 e 15 minutos (Tabela 11)

4. DISCUSSÃO

A necessidade de se usar larvas esterilizadas foi citada por SHERMAN et al. (2000), quando foi relatado que Baer utilizou larvas não esterilizadas em seus pacientes, que conseqüentemente desenvolveram tétano. Segundo estes mesmos autores, a esterilização dos ovos tem como finalidade, destruir todas as bactérias sem afetar os ovos. Conforme SHERMAN & PETCHER (1988), cada lote de ovos esterilizados deve ter suas larvas testadas em meios microbiológicos. A infecção da ferida com organismos patogênicos resultantes de larvas não estéreis é um problema e risco para o paciente, em que pode ser eliminado pela esterilização prévia. Dessa maneira, a esterilização e análise microbiológica das larvas esterilizadas são muito importantes para se assegurar a assepsia e aplicação segura das larvas durante o tratamento.

Baseado-se nos resultados obtidos observou-se que a utilização do Digluconato de clorexidina para desinfecção dos ovos de *Chrysomya putoria* foram desfavoráveis, apresentando uma média total de larvas sobreviventes de 35,82, quando comparado com outros químicos. As variadas concentrações testadas nos ovos de *Chrysomya putoria* demonstraram resultados insatisfatórios, mesmo quando os ovos foram esterilizados em baixas concentrações, como 0,10 %. A concentração terapêutica de Digluconato de clorexidine, segundo recomendam PAULINO (1999) e LARSON et al. (2002) não foi testada, porque quando foi utilizado este químico nos ovos de

Chrysomya putoria na concentração 1% durante 1 minuto, a média de larvas sobreviventes foi de apenas 9,75.

Os testes microbiológicos não foram realizados, pois aos resultados demonstraram que este agente químico causou alta mortalidade de larvas, impossibilitando a sua utilização em ovos de *Chrysomya putoria* para bioterapia. A baixa taxa de eclosão das larvas talvez possa ser explicada pelas propriedades anti-sépticas citadas por PAULINO (1999) e LARSON et al. (2002), principalmente quando relatam que este químico apresenta ação residual por 24 horas, podendo dessa maneira estar prejudicando ou inibindo a eclosão das larvas. Apesar do Digluconato de clorexidine, apresentar boas propriedades terapêuticas como anti-séptico e desinfetante, como descrevem estes mesmos autores, e também muito utilizada em Medicina Veterinária, principalmente em feridas infectadas, não há relatos da utilização deste esterilizante na bioterapia.

O Permanganato de potássio nas diluições de 1/50, 1/100 e 1/200, sendo que a maior média de larvas sobreviventes foi de 56,00 na diluição de 1/200, durante 1 minuto. As diluições de 1/50 e 1/100, não foram diferentes entre si, mas as médias de larvas sobreviventes foram menores quando comparadas com a diluição de 1/200 e com o grupo controle. Embora o Permanganato de Potássio[®] tenha sido mais efetivo durante 1 minuto, não houve diferenças, quando utilizado durante 3 a 10 minutos. Quando este agente químico foi submetido em testes microbiológicos, o mesmo se mostrou

ineficaz, apresentando crescimento microbiano em todas as concentrações e tempos de exposição testados, o que impossibilita sua utilização na bioterapia.

Relatos da sua utilização na bioterapia não foram encontrados em nenhuma literatura, mas o Permanganato de potássio[®] foi relatado por GREENBERG (1970) ser benéfico, quando utilizado na concentração de 1:1000 para desinfetar ovos de Lepidóptera (*Bombyx*), porém este mesmo autor não obteve resultados benéficos com esta mesma concentração, quando esterilizou ovos de *Drosophila melanogaster* (Meigen).

Os testes realizados com Farmasept 500[®] mostraram uma média geral de 50,95 de larvas sobreviventes, quando os ovos foram desinfetados com essa solução, sendo que segundo as recomendações do fabricante (Farmabase), foram realizadas diluições de 1/4000 e 1/1000. Tanto a diluição de 1:4000 como a de: 1000, estatisticamente não apresentaram diferenças em relação ao número de larvas sobreviventes, quando os ovos foram desinfetados por 3 a 5 minutos. Acima de 10 minutos a sobrevivência das larvas ficou comprometida em ambas concentrações. Quando os ovos foram testados com Farmasept 800[®], na concentração 1/4000 durante 3 a 5 minutos, obteve-se média de larvas sobreviventes entre 47,50 e 48,25 respectivamente, sendo inferiores as do Farmasept 500[®] que na mesma diluição e tempo apresentou médias de 53,25 e 51,50.

O Farmasept 500[®] e o Farmasept 800[®] apresentam em sua composição Cloreto de benzalcônio 50% e 80% respectivamente, o que justifica as diferenças nos resultados obtidos nas concentrações e tempo de

exposição. Segundo PAULINO, (1999) o Cloreto de benzalcônio é um surfactante catiônico (compostos quaternário de amônia) que são bastante efetivos contra uma variedade de bactérias gram positivas e negativas. O Cloreto de benzalcônio foi utilizado por GREENBERG (1970) com a finalidade de reduzir ou eliminar contaminantes na criação de dípteros. Segundo GREENBERG (1970) a esterilização de ovos de *Musca domestica* (Linnaeus) foi efetiva utilizando cloreto de benzalcônio 0,1%, por 25 minutos. As mesmas concentrações e tempo de exposição foram também utilizadas por este autor em ovos de *Phaenicia cuprina* (Wiedemann), *Chrysomya rufifacies* (Macquart) e *Phormia regina* (Meigen). Segundo GREENBERG (1970), a esterilização de ovos é indicada em casos de patógenos transmitidos verticalmente via ovo, em que maioria destes estão situados na superfície do ovo e, portanto sujeitos a procedimentos de desinfecção.

Os testes microbiológicos das larvas que tiveram seus ovos tratados por Farmasept 500[®] e Farmasept 800[®] apresentaram crescimento microbiano em ambas concentrações, demonstrando que apesar dos resultados obtidos em relação às larvas sobreviventes (taxa de eclosão das larvas), esta não foi efetiva microbiologicamente. Estes resultados diferem das indicações de PAULINO (1999), em que o Cloreto de benzalcônio é um desinfetante bacteriostático em baixas concentrações e bactericida e fungicida em altas concentrações. Não houve informações adicionais por PAULINO (1999), quanto à concentração ideal indicada para essa ação bactericida e testes

microbiológicas, quando GREENBERG (1970) utilizou este desinfetante em baixas concentrações em que pudessem nos dar maiores esclarecimentos.

Os resultados com a utilização do Farmasept – plus[®] foram satisfatórios microbiologicamente e efetivos na concentração de 1/4000 durante 3 minutos ou de 5 a 10 minutos. O Farmasept-plus[®] é composto por 42,5% Glutaraldeído e 7,5% Cloreto de benzalcônio, não apresentado relatos quanto a utilização deste químico na desinfecção dos ovos de insetos ou mesmo na bioterapia. De acordo com PAULINO (1999), o Glutaraldeído é um aldeído que é eficaz contra todos os tipos de microorganismos, inclusive vírus e esporos bacterianos, apresentando um amplo espectro bactericida. O espectro de ação do Cloreto de benzalcônio e Glutaraldeído como citado por PAULINO (1999) apresentam boa atividade contra uma variedade de bactérias, é desinfetante e esterilizante e a utilização deste, na desinfecção de ovos para bioterapia, demonstrou segura.

A desinfecção dos ovos com Ultrasept que é composto por 28% Cloreto de benzalcônio, 10% Aldeído oxálico e 4% Glutaraldeído, foi realizada nas diluições de 1:4000, com sucesso, mas quando utilizada na concentração de 1/1000 o número de larvas sobreviventes diminuiu. O Glutaraldeído conforme PAULINO (1999) é de fácil penetração, com a vantagem de ser ativo pela matéria orgânica. Esse mesmo autor relata que a utilização desse composto, na desinfecção de ovos de granja para incubação pode levar a perdas econômicas, devido à alta mortalidade embrionária.

O Ultrasept[®] foi utilizado até 30 minutos na esterilização dos ovos, apresentando resultados mais efetivos quando utilizados por 3 a 15 minutos, onde a média de larvas sobreviventes variou de 56,75 a 50,50 e quando utilizada por 30 minutos, a média foi de 34,75 de larvas sobreviventes. Apesar desses resultados mostrarem ser satisfatórios para esterilização de ovos, microbiologicamente este químico não foi eficaz, como demonstrado anteriormente na tabela 11, em que ambas concentrações apresentaram crescimento microbiano maior de 300 UFC. Estes resultados podem ser explicados pela composição do Ultrasept utilizado, apresentando Cloreto de benzalcônio em maiores porcentagens e Glutaraldeído em baixas concentrações.

As análises microbiológicas dos três químicos, Farmasept 500[®], Farmasept 800[®] e Ultrasept[®] demonstraram crescimento microbiano maior de 300 UFC, o que não aconteceu com os resultados com Farmasept-plus[®] em que microbiologicamente foram benéficos. Isto pode ser explicado, porque a formulação do Farmasept-plus[®] contém 7,5% de Cloreto de benzalcônio e 42,5% de Glutaraldeído, diferindo da composição química do Farmasept 500[®] e Farmasept 800[®] em que apresentam na sua formulação 50 e 80% de Cloreto de benzalcônio e o Ultrasept[®] com 28% de Cloreto de benzalcônio e 4% de Glutaraldeído. Podemos concluir que, embora Cloreto de benzalcônio em altas concentrações não tenha prejudicado a eclosão dos ovos, este microbiologicamente não demonstrou ser eficaz, mas menores concentrações de Cloreto de benzalcônio em associação com altas concentrações de

Glutaraldeído (Farmasept-plus[®]), demonstraram resultados microbiológicos satisfatórios.

Os resultados relacionados com o Formaldeído foram benéficos em relação as médias, quando as concentrações de 1 a 7,5% foram testadas nos ovos de *Chrysomya putoria*. HINSHAW (2000) sugere para ovos de *Lucilia sericata*, a utilização de Formaldeído 4%, e MUMCUOGLU et al. (2001), SHERMAN & PECHTER (1988) e SIMMONS (1934) a utilização de Formaldeído 5% ou associado com Hipoclorito de sódio ou Peróxido de hidrogênio 4%. Neste trabalho a concentração de 5% durante 1 a 5 minutos foram satisfatórios, mas quando os ovos foram esterilizados durante acima de 10 minutos os resultados foram não foram efetivos. Os resultados deste trabalho descritos acima foram como demonstrados por MUMCUOGLU et al. (2001) e SIMMONS (1934), que utilizaram a Formalina 5% por 5 minutos, sendo que SIMMONS (1934) esterilizou 925 ovos de *Lucilia sericata*, obtendo 77,6 % de larvas e uma esterilização de 100%. Este mesmo autor esterilizou os ovos, utilizando outros químicos como Hipoclorito de cálcio, Cloreto de mercúrio, Fenol, Hidróxido de sódio, sendo que apesar destes resultarem baixa taxa de eclosão, apresentaram esterilização de 100% com exceção do Hipoclorito de cálcio em que a esterilidade foi de 58,1%.

SHERMAN et al. (2000), relata que embora o Formaldeído 5% seja satisfatório, ele não foi eficiente microbiologicamente. Entretanto concentrações inferiores foram utilizadas por MUMCUOGLU (2001) esterilizando os ovos de *Lucilia sericata* com 0,5% de Hipoclorito de sódio

por 15 a 20 minutos para separação dos ovos e 0,5% de Formaldeído por 5 minutos para a esterilização. Após a esse procedimento, os ovos foram em seguida lavados com água estéril e incubadas em temperatura adequada.

Concentrações maiores de Formaldeído foram utilizadas por NUESCH et al. (2002) em ovos de *Lucilia sericata*, na diluição de 2,5% durante 20 minutos. FINE & ALEXANDER (1934) descreveram ser efetivas a esterilização dos ovos, utilizando 10% de Formaldeído seguido 0,85% de solução de Cloreto de sódio, atingindo 80% de larvas esterilizadas em 500 ovos. GREENBERG & GEORGE (1985) esterilizaram ovos de *Phormia regina* e *Phaenicia cuprina*, utilizando método de solução de White (Cloreto de mercúrio, Cloreto de sódio, Cloro, Etanol e água destilada) por 60 minutos, sendo que antes da imersão dos ovos nessa solução, eles foram previamente imersos em 5% Formaldeído durante 5 minutos e 0,2% Hipoclorito de sódio por 2 minutos.

A concentração de 0,5% de Formaldeído descrita por MUMCUOGLU (2001), foi próxima aos observados neste trabalho com a concentração 1%, por 1 minuto, embora resultados benéficos tenham sido obtidos também no tempo de 3 a 15 minutos. Estes resultados não foram somente efetivos em relação à concentração e tempo, mas microbiologicamente também foram satisfatórios.

No presente estudo, o Hipoclorito de sódio, foi testado sem associações com outros químicos e resultou ser também satisfatório, quando utilizada na diluição de 0,5% por 1 a 5 minutos, apresentando melhores resultados no tempo de 1 minuto, com média de larvas sobreviventes de 58,75

A concentração de 1% também demonstrou efetiva, mas somente no tempo de 1 e 3 minutos, em que as médias foram 53,75 e 50,25 respectivamente. Estes resultados foram semelhantes aos de IVERSEN (1996), que esterilizou ovos de *Phaenicia sp.* com Hipoclorito de sódio 0,5%. Este mesmo autor apesar de relatar o efetivo uso do Hipoclorito nessa concentração, não citou o tempo em que os ovos foram expostos e também os procedimentos microbiológicos. GREENBERG (1973) relatou satisfatória a concentração de 0,1% de Hipoclorito de sódio, durante 20 minutos ou 1% da solução por 10 minutos, para esterilizar ovos de *Musca domestica* (Linnaeus). Os resultados obtidos neste presente estudo com Hipoclorito de sódio, diferem dos apresentados por SHERMAN & MY-TIEN TRAN (1995), que utilizaram Lysol[®] (cloro) em ovos de *Lucilia sericata*, com uma concentração de 3% por 10 minutos, 5 a 6 minutos de acordo com SHERMAN & WYLE (1996) e 2 a 3 minutos conforme GREENBERG (1973). Neste estudo, quando foi testada a concentração de 3,0% utilizando o Hipoclorito de sódio, a sobrevivência das larvas ficou prejudicada, sendo que quando os ovos foram imersos nessa solução e concentração durante 15 minutos, não houve eclosão de larvas.

Apesar de alguns dados deste trabalho, se aproximarem aos descritos por IVERSEN (1996) e GREENBERG (1973) e se confrontarem com os resultados de SHERMAN & WYLE (1996) e SHERMAN & MY-TIEN TRAN (1995), microbiologicamente o Hipoclorito de sódio na concentração de 0,5%, mostrou-se efetivo.

Segundo GREENBERG & GEORGE (1985) e GREENBERG (1970), o Hipoclorito de sódio na concentração de 0,01 a 2% é muito utilizada para desinfetar ovos de insetos e tecidos, e também como um desinfetante no laboratório. Estes mesmos autores utilizaram o Hipoclorito de sódio na concentração de 2% por 15 minutos para esterilizar ovos de *Musca domestica* (Linnaeus) e a concentração de 2% ou 3% na esterilização dos ovos de *Phaenicia cuprina* (Wiedemann), *Chrysomya rufifacies* (Macquart) e *Phormia regina* (Meigen).

A mortalidade dos ovos causada pelos desinfetantes é um dos fatores que limitam a utilização das larvas, assim como o modo de separação do mesmo poderá interferir na eclosão das larvas. A separação dos ovos é necessária uma vez que estes estão dispostos juntos, ou seja, em massa contendo um muco que os cola uns aos outros e que os unem (SHERMAN & WYLE, 1996; GREENBERG, 1973; SIMMONS, 1934). SIMMONS (1934) relata que a separação dos ovos com soluções químicas provocam aglutinação destes, dificultando a ação do químico e também causam freqüentemente considerável mortalidade. Embora o método de separação mecânica seja recomendado, este consome muito tempo e também podem provocar perdas de alguns ovos, apesar de que esse mesmo autor tenha citado nenhuma injúria dos ovos após a separação. No presente trabalho a separação dos ovos foi realizada mecanicamente por leve e cuidadosa pressão do pincel sobre estes, sem dificuldades e grandes danos aos ovos, pois a separação dos ovos é um procedimento muito importante para permitir a ação dos esterilizantes.

Segundo SIMMONS (1934) os produtos químicos usados para esterilização dos ovos na bioterapia são incapazes de destruir todos esporos resistentes, o que limita a produção de larvas estéreis em grande número, porém um rigoroso método de desinfecção poderá comprometer a eclosão das larvas.

Os testes microbiológicos como citado por SHERMAN & PETCHER (1988) e NUESCH et al. (2002), é um procedimento importante para que a bioterapia possa ser utilizada de modo seguro. Relatos de DICKE (1953) na Medicina Veterinária, utilizando larvas não esterilizadas em um touro com *Actinimycetes bovis*, foram benéficos inicialmente, mas contribuíram para a contaminação bacteriana da ferida e disseminação da doença. Mediante ao relato de DICKE (1953), IVERSEN (1996), recomenda que o animal a ser submetido ao tratamento larval, seja imunizado previamente com vacina anti-tetânica.

FINE & ALEXANDER (1934) e SHERMAN & WYLE (1996), sugerem a utilização de testes microbiológicos com Agar sangue e GREENBERG (1954) e THOMAS et al. (1999) a utilização do Tiogliconato, mas a técnica não foi descrita por nenhum desses autores. MARTINI & SHERMAN (2003), não citam técnicas microbiológicas, mas relatam que essas análises são importantes e caso haja contaminação, toda a produção é descartada.

A finalidade dos testes microbiológicos neste trabalho foram os mesmos descritos por SHERMAN & PETCHER (1988), NUESCH et al. (2002)

e MARTINI & SHERMAN (2003), sendo que a técnica microbiológica descrita neste trabalho, visou utilizar meios microbiológicos de fácil manipulação e com um custo acessível.

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos com os oitos esterilizantes testados nos ovos de *Chrysomya putoria*, conclui-se que:

- Os resultados utilizando os esterilizantes Formaldeído, Hipoclorito de sódio, Permanganato de potássio, Farmasept 500[®], Farmasept 800[®], Farmasept-plus[®] e Ultrasept[®] demonstraram resultados efetivos com relação á taxa de eclosão das larvas e viabilidade das mesmas, com exceção do Digluconato de clorexidina que obteve média de larvas sobreviventes inferiores em relação aos químicos testados.

- A esterilização dos ovos foi efetiva microbiologicamente em três dos oito esterilizantes testados, demonstrando eficazes Hipoclorito de sódio, Formaldeído e Farmasept – plus[®] na utilização do tratamento larval.

- A esterilização dos ovos e os testes microbiológicos são necessários, para que a Bioterapia possa ser utilizado com segurança e sucesso nas feridas.

- Maiores esclarecimentos são necessários quanto a outras técnicas de esterilização química e testes microbiológicos adequados com baixo custo e fácil manuseio.

- A mosca *Chrysomya putoria*, mostrou-se favorável a testes de esterilização, embora seja necessária a realização de outros experimentos quanto a sua utilização na bioterapia

REFERÊNCIAS

ALDRIDGE, S. Maggots aid wound healing. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, [S.l], v.82, p.1226-1229, 2001.

BASS, M.H.; BARNES, E. Toxicities of antimicrobial agents to white-fringed beetle larvae and effectiveness of certain of these against microbial growth. **Scientific Notes**, Auburn, p.718-719, 1969.

BELL, N.J.; THOMAS, S. Use of sterile maggots to treat panniculitis in an aged donkey. **Veterinary Record**, [S.l], v.149, n.25, p.768-770, 2001.

BROOKES, V.J.; FRAENKEL, G. The nutrition of the larva of the Housefly, *Musca domestica*. **Physiological Zoology**, Illinois, v.31, p.208-223, 1958.

BUNKIS, J; GHERINI, S.; WALTON, R. Maggot Therapy Revisited. **Western Journal Medicine**, Hayward, v.142, p.554-556, apr.1985.

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

CHURCH, J.The role of fly larvae in human wounds. **Abstracts from the 1 st world conference on biosurgery**. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/wmprc/biosurgery/abstracts> 96 html>.Acesso em: 23 Jul.1999.

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

DUNN, C.;RAGHAVAN, U.;PFLEIDERER, A.G. The use of maggots in head and neck necrotizing fasciitis. **Journal Laryngology Otolology**, Peterborough, v.116, n.1, p.70-72, jan.2002.

ERDMANN, G. Antibacterial action of myiasis-causing flies. **Parasitology Today**, [S.1], v.3, n.17, p.214-216, 1987.

ERDMANN, G.R.; KHALIL, Isolation and identification of two antibacterial agents produced by a strain of *Proteus mirabilis* isolated from larvae of screw worm (*Cochliomyia hominivorax* – Diptera: Calliphoridae). **Journal Medical Entomology**, [S.1], v.23, n.2, p.208-211, mar.1986.

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

FINE, A., ALEXANDER, H. Maggot Therapy Technique and Clinical Application. **Journal Joint and Joint Surgery**, New Orleans, Louisiana, v.16, p.572-582, 1934.

GREENBERG, B. A method for the sterile culture of housefly larvae, *Musca doméstica*. **The Canadian Entomologist**, Illinois, p.527-528, dec.1954.

_____. **Flies and Disease vol.II**. New Jersey: Princeton, p. 447, 1973.

_____. Sterilizing Procedures and Agents, Antibiotics and Inhibitors in Mass Rearing of Insects. In: **Animal meeting of the Entomological Society of America Department of Biological Sciences**, 1969, Chicago. *Bulletin of the Entomological Society of America*, University of Illinois, Chicago: [s.n], 1970, v. 16, n.1, p. 31-36.

GREENBERG, B.; GEORGE, J. *Calliphora vicina*, *Phormia regina* and *Phaenicia cuprina*. **Handbook of Insect Rearing**, vol II, New York: Elsevier, p.25-33, 1985.

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

HINSHAW, J. Larval Therapy. A Review of Clinical Human and Veterinary Studies. **World Wide Wounds**, Oct. 2000. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/world-wide/2000/oct/janet-html>> Acesso em 2 Nov. 2000.

HOBSON, R. P. Studies on the Nutrition of Blow-Fly Larvae. II Rôle of the Intestinal flora in digestion. **Journal Experimental Biological**, London, v.9, p.128-138, apr.1932A.

_____Studies on the Nutrition of Blow - Fly Larvae. IV The Normal role of Micro - organisms in Larval Growth. **Journal Experimental Biological**, London, 1932, p.367-377, sep.1932B.

IVERSEN, E. Methods of Treating Injuries of Work Animals. **Buffalo Bulletin**, Davis, v.15, n.2, p.34-37, jun.1996.

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

KITCHING, M. Patients' perceptions and experiences of larval therapy. **Journal wound care**, Mount Vernon, v.13, n.1, p.25-29, jan.2004.

KLOTZBACH, H.; SCHRODER, H.; PUSCHEL, K. Three case examples of intravital maggot instations. **Archiv fuer Kriminologie**, Hamburg, v.210, n.1-2, p. 1-9, jul.2002.

KNOWLES, A.; FINDLOW, A.; JACKSON, N. Management of a Diabetic foot ulcer using larval therapy world wide wounds, **Nursing Standard Biosurgical Awards**, Manchester, v.16, n.6, p.73-76, oct.2001.

LARSON, C. E.; FARIAS, M. R.; ANDRADE, S. F.; BRITO, A. F. Terapêutica Tópica e Sistêmica: Pele, Ouvido e Olho. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002, p.115-178

LEAL, T. T. S.; PRADO, A. P.; ANTUNES, A. J. Rearing the larvae **Revista de Zoología**, São Paulo, v.1, n.1, p. 41-44, 1992.

LERCH, K.; LINDE, H.J.; LEHN, N.; GRIFKA, J. Bacteria ingestion by blowfly larvae: an in vitro study. **Dermatology**, Regensburg, v.207, n.4, p.362-366, 2003.

LINHARES, A. X. Miíases. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 10.ed. São Paulo: Atheneu, , 2000, p.350-358

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

LUNAU, S.; STOESSEL, S.; SCHMIDT-PEISKER, A.J.; EHLERS, R.U. Establishment of monoxenic inocula for scaling up in vitro cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema spp.* e *Heterorhabditis spp.* **Nematológica**, Ralsdorf, v.39, p.385-399, jul.1993.

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

MACHERRAS, M. J.; FRENEY, M. R. Observations on the nutrition of maggots of Australian blow - flies. **Journal of Experimental Biology**, Canberra, v.10, p.239-246, dec.1932.

MARTINI, R.,K.; SHERMAN, R.A. Terapia de Desbridamento com Larvas. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Porto Alegre, v.85, n.4, p.82-85, 2003.

MERCOLA, J. Maggot Therapy: An Alternative for Wound Infection. **Lancet**, [S.1,]v.356, p.1174-1178, sep.2000.

MULDER, J.B. The Medical Marvels of Maggot. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Santa Bárbara, v.195, n.11, p.1497-1499, dec.1989.

MUMCUOGLU, K. Y. **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 <kaostam@cc.huji.ac.il > em20 de junho 200,1 Jerusalem, Israel

MUMCUOGLU, K. Y., LIPO, M.; LOFFE-USPENSKY, I.; MILLER, J.; GALUN, R. Maggot Therapy for Gangrene and Osteomyelitis. **Harefuah**, Jerusalém, v.132, n.5, p.323-325, mar.1997.

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

NUESCH, R.; RAHM, G.; RUDIN, W.; STEFFEN, T.; FREI, R.; RUFLI, T.; ZIMMERLI, W. Clustering of blood-stream infections during maggot debridement therapy using contaminated larvae of *Protophormia terraenovae*. **Infection**, Basel, v.30, n.5, p.306-309, apr.2002

PAULINO, C.A. Anti - sépticos e desinfetantes. In: SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, , 1999.

PELCZAR JR., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIENG, N., R. **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2.ed. São Paulo: MacGraw-Hill, v.1, 1980, p.524

PRETE, P. Growth effects of *Phaenicia sericata* larvae extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. **Life Sciences**, Long Beach, v.60, n.8, p.505-510, dec.1997.

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

SAS. **USER'S GUIDE: basic and statistic**. Cary: SAS, p.1686, 1995.

SEALBY, N. The use of maggot therapy in the treatment of a malignant wound. **British Journal Community Nursing**, v.9, n.3, p.16-19, mar.2004.

SHERMAN, R. A. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. **Diabetes Care**, United States, v. 26, n.2, p.446-451, feb.2003.

_____. Maggot Therapy: the us experience. **Abstracts from the 1st world conference on biosurgery**, 1996. Disponível em: <http://www.smtl.co.uk/wmprc/biosurgery/abstracts_96.html>. Acesso em: 23 Jul. 1999.

SHERMAN, R. A.; PECHTER, E. A. Maggot therapy a review of therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. **Medical and Veterinary Entomology**, London, v.2, n.3, p.225-230, dec.1988.

SHERMAN, R. A.; TRAN, J. MT. A simple, sterile food source for rearing the larval of *Lucilia sericata* (Díptera: Calliphoridae). **Medical and Veterinary Entomology**, Irvine, p.393-398, dec.1995.

SHERMAN, R. A.; WYLE, F. A. Low- Cost, Low-Maintenance Rearing of Maggots in Hospitals, Clinics and Schools. **American Journal Tropical Medicine**, Irvine, v.54, n.1, p. 38-41, 1996.

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

SHERMAN, R. A.; HALL, M.J.R.; THOMAS, S. Medical Maggots: an Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. **Annual Reviews Entomology**. University of California, Irvine, v.45, p.55-81, 2000.

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

_____. Sterilization of Blowfly Eggs in the Culture of Surgical Maggots for Use in the Treatment of Pyogenic Infections. **American Journal Surgery**, Washington, v.25, p.140-147, jan.1934.

TEICH, S.; MYERS, R.A.M. Maggot therapy for severa skin infections. **Southern Medical Journal**, Washington, v.79, n.9, p. 1153-1155, sep.1986.

THOMAS, S.; ANDREWS, A.; JONES, M. Maggots are useful in treating infected or necrotic wounds. **British Medical Journal**, Bridgend, n. 318, v.807, marc.1999.

THOMAS, S.; ANDREWS, A.M.; HAY, N.P.; BOURGOISE, S. The anti-microbial activity of maggots: results of a preliminary study. **Journal of Tissue Viability** [S.1], v.9, p.127-132, oct.1999.

THOMAS, S.; JONES, M.; SHUTLER, S; ANDREWS, A. All you need to know about maggots. **Nursing Time**. [S.1], v.92, n.46, p.63-76, nov.1996.

THOMAS, S; JONES, M.; SHUTLER, S; JONES, S. Maggots in Wound Debridement - an introduction. Surgical Materials Testing Laboratory. **Journal of Wound Care**. Disponível em: <<http://www.smtl.co.uk/WMPRC/Maggots/maggots.html>>. Acesso em: 21 Jul. 1999.

THORNTON, D.; BERRY, M.; RALSTON, D. Case report: maggot therapy in an acute burn. **World Wide Wounds**. 2002. Disponível em: <<http://www.worldwidewounds.com>> . Acesso em 9 Ago. 2002.

WHITE, G.F. Production of sterile maggots for surgical use II. Desinfection white sodium hidroxide followed by formalin. In: **Eighth Annual Meeting**, 46, 1932, [S.1] *Journal of Parasitology*, Washington: [s.n.], 1932, v. 19, p.170.

WOLFF, H.; HANSSON, C. Larval therapy- an effective method of ulcer debridement. **Clinical Experimental Dermatology**, Goteborg, v.28, n.2, p.134-137, mar.2003.

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

ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 1965, p.267.

ANEXOS

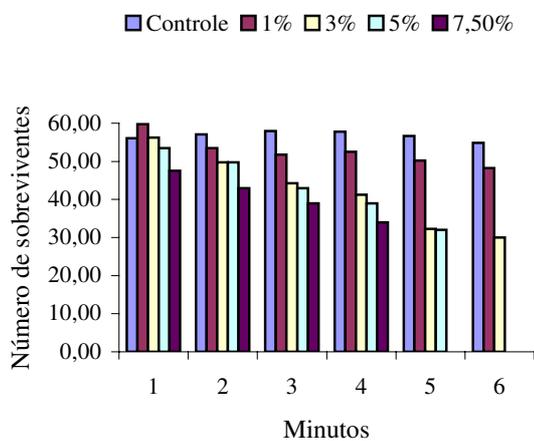


Figura1A. Médias para as concentrações de Formoldeído, em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*

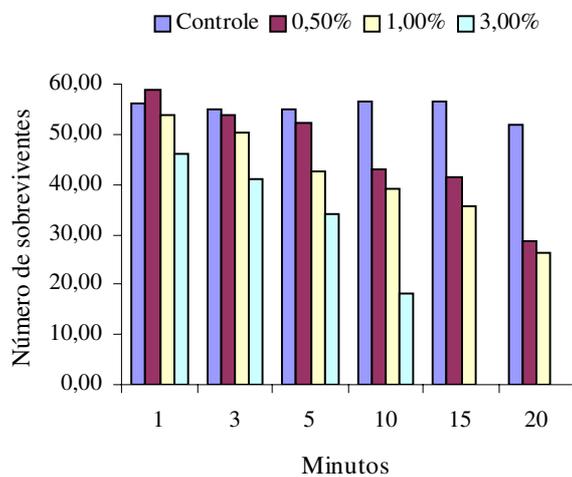


Figura2A. Médias para as concentrações de Hipoclorito de sódio, em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*

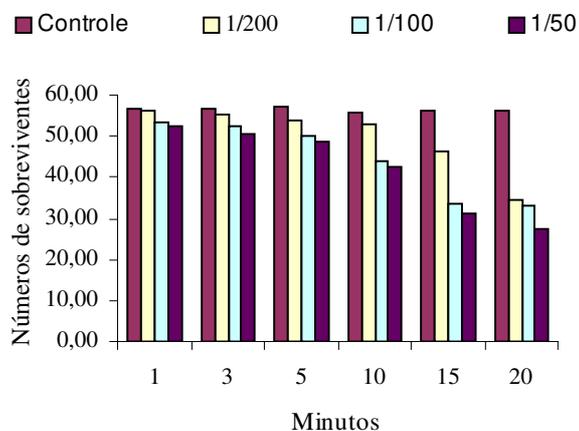


Figura3A. Médias para as concentrações de Permanganato de potássio, em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*

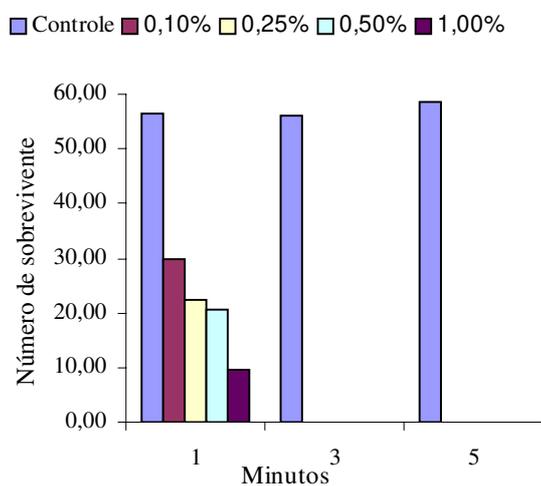


Figura4A. Médias para as concentrações de Digluconato de clorexidina, em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*

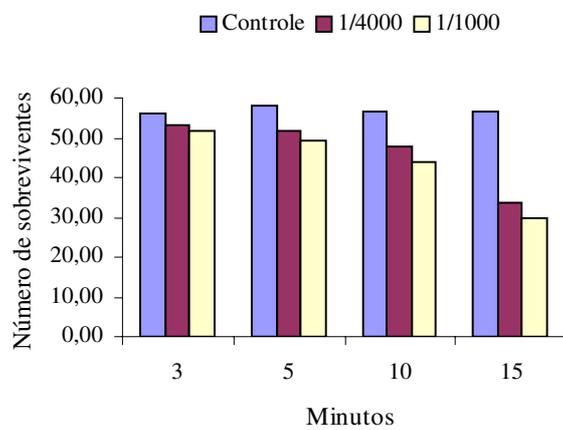


Figura5A. Médias para as concentrações de Farmasept 500[®], em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*

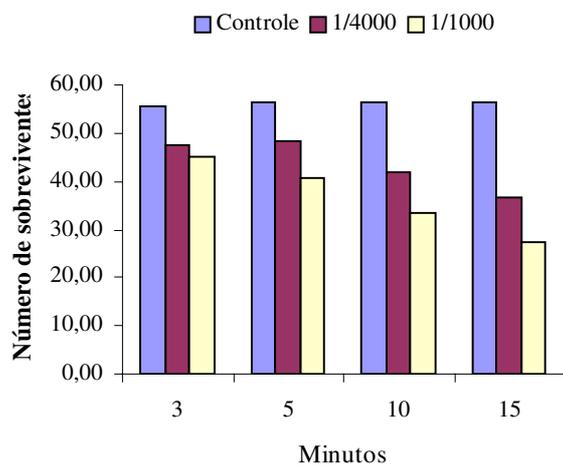


Figura6A. Médias para as concentrações de Farmasept 800[®], em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*

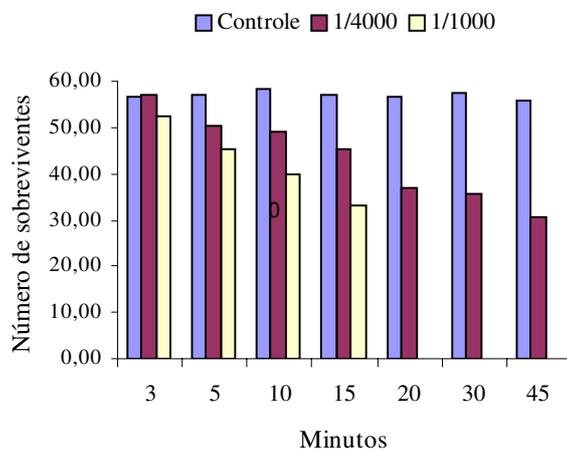


Figura7A. Médias para as concentrações de Farmasept-plus[®], em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*

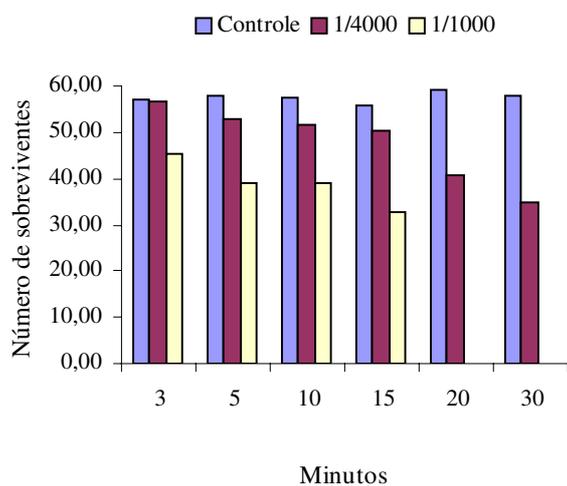


Figura8A. Médias para as concentrações de Ultrasept[®], em relação aos minutos, testados em ovos de *Chrysomya putoria*