

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
ANIMAL

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE NOVAS DIETAS E O EFEITO DA ADIÇÃO DE
ANTIBIÓTICOS NO DESENVOLVIMENTO DE *Chrysomya albiceps*
(WIEDEMANN, 1819) E *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1830)
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

ADRIANA CRISTINA PEDROSO FERRAZ

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

AVALIAÇÃO DE NOVAS DIETAS E O EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIBIÓTICOS NO DESENVOLVIMENTO DE *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819) E *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

ADRIANA CRISTINA PEDROSO FERRAZ

Sob a Orientação do Professor
Valéria Magalhães Aguiar Coelho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Entomologia

Seropédica, RJ
Maio de 2012

595.77

F381a

T

Ferraz, Adriana Cristina Pedroso, 1984-
Avaliação de novas dietas e o efeito da
adição de antibióticos no desenvolvimento
de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e
Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830)
(Diptera: Calliphoridae) / Adriana Cristina
Pedroso Ferraz - 2012.
99 f.: il.

Orientador: Valéria Magalhães Aguiar
Coelho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Biologia Animal.

Inclui bibliografia.

1. Mosca-varejeira - Alimentos - Teses.
2. Inseto - Alimentos - Teses. 3. Moela -
Teses. 4. Antibióticos - Teses. I. Coelho,
Valéria Magalhães Aguiar, 1962-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Biologia Animal. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

ADRIANA CRISTINA PEDROSO FERRAZ

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Entomologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 02/05/2012

Prof Dra. Valéria Magalhães Aguiar Coelho (UNIRIO)
(Orientador)

Prof. Dra Cláudia Soares Santos Lessa (UNIRIO)

Prof. Dr. Gonzalo Efrain Moya Borja (UFRRJ)

Prof Dra. Rosa Maria Tavares Haido (UNIRIO)

Prof. Dr. José Mario d'Almeida (UFF)

Suplentes:

Prof. Dr. Leandro Silva Barbosa (MN-UFRJ)

Prof. Dra. Maria de Lurdes de Azevedo Rodrigues (UFRRJ)

*Dedico a minha flor,
meu bebê Ana Clara!*

AGRADECIMENTOS

A prof^a Valéria M. Aguiar Coelho, minha orientadora, pelos ensinamentos, incentivo, apoio e por acreditar em meu potencial e não desistir de mim, mesmo diante de tantos percalços.

Aos meus colegas do Laboratório de Estudo de Dípteros: Rafaela, Débora, Barbara Proença e em especial a Dani que foi mais do que uma parceira de experimento e sim uma grande amiga. Sem ela esta tese não se concretizaria.

Ao prof. Renato Geraldo da Silva Filho (UNIRIO) que auxiliou profundamente na elaboração da dieta e na escolha dos antibióticos. Obrigada pela paciência!

Aos membros da minha banca de defesa pelas contribuições valiosas.

Ao Corpo Docente da Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) por todo ensinamento, contribuindo para a minha formação.

A Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) onde realizei toda minha pesquisa.

A FAPERJ, FINEP e a UNIRIO pelos fomentos recebidos e ao CNPq pela bolsa de doutorado recebida.

Ao meu marido Fabrício pelo incentivo, pela paciência, pelo carinho, pela felicidade que traz à minha vida, pelo nosso passado juntos e pelo futuro que planejamos.

Aos meus pais e meus irmãos pelo apoio, incentivo, ajuda em todos os momentos e paciência ao me ouvirem falar tanto de moscas, dietas e antibióticos.

A minhas avós que sempre torcem pelo meu sucesso e também aos avôs que não estão mais aqui.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente e possibilitaram a realização dessa tese.

RESUMO

FERRAZ, Adriana Cristina Pedroso. **Avaliação de novas dietas e o efeito da adição de antibióticos no desenvolvimento de califorídeos (Diptera)**. 2012. 99p. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

A pesquisa foi dividida em capítulos. O primeiro avaliou o desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya albiceps* (Widemann) em moela de frango (controle: carne bovina). Foram quatro repetições (100g de dieta cada, 40 larvas de 1º instar/2ª geração) por tratamento, cada recipiente inserido em outro maior contendo serragem e vedado. As larvas maduras foram pesadas e armazenadas em tubos de ensaio. A variação entre médias de massa de larvas maduras e durações dos estágios de larva, pupa e total foram analisadas por Teste t de Student ($\alpha=5\%$), as viabilidades por ANOVA, a razão sexual pelo qui-quadrado. Foram registradas temperatura média 25,6°C e umidade relativa do ar média 72,4%; duração média do período de larva a adulto 8,1 dias (carne) e 8,2 (moela); viabilidades de larva 71% e 87%; viabilidades de pupa 100% e 99%; viabilidades de larva a adulto 58% e 67%, respectivamente. Moela de frango se mostrou satisfatória como dieta para *C. albiceps*. O segundo capítulo avaliou desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Widemann) em moela e homogenato de moela de frango em agar 65% (controle: carne). Foram quatro repetições (60 mL de dieta, 40 larvas de 1º instar/5ª geração) por tratamento. O homogenato foi preparado em mixer (moela, água destilada e agar). Foram registradas temperatura média 20,6° C e umidade relativa do ar média 67,7%. A duração média do período de larva a adulto foi 8,868 dias (carne), 8,676 (moela) e 9,067 (homogenato); as viabilidades larvais 98%; 92% e 73%; as viabilidades de pupa 98%; 91% e 71%; as viabilidades de larva a adulto 93%; 83% e 64%, respectivamente. Houve diferença significativa na duração do período pupal entre carne e homogenato. Ambas dietas mostraram-se satisfatórias para *C. putoria*. O terceiro capítulo avaliou diferentes concentrações de ciprofloxacino (3,33 µg/mL; 6,66 µg/mL e 13,33 µg/mL em homogenato de moela/agar 65%) sobre desenvolvimento de *C. putoria* (controle recebeu água destilada). Foram replicados quatro vezes (60 gramas dieta, 40 larvas 1º instar/3ª geração) em câmara climatizada 30°C dia/28°C noite, 70±10% U.R. e 14 horas fotoperíodo. Não houve diferença significativa: massa individual médio das larvas, duração média da inoculação das larvas até abandono e estágios larval, pupal e total. Apenas tratamento 2 diferiu significativamente do controle nas viabilidades larval e total. Ciprofloxacino pareceu não alterar desenvolvimento de *C. putoria*. O quarto capítulo avaliou diferentes concentrações de gentamicina (4,44µg/mL; 13,33µg/mL e 66,66µg/mL) sobre *C. putoria*. Os materiais e métodos foram semelhantes ao do capítulo III. Não houve diferença significativa: massa individual média das larvas; duração média da inoculação das larvas até abandono e dos estágios larval, pupal e total. Apenas tratamento 2 diferiu significativamente do controle na viabilidade larval. Gentamicina pareceu não alterar o desenvolvimento de *C. putoria*. O quinto capítulo avaliou diferentes concentrações de ampicilina (66µg/mL; 81,33µg/mL e 166,66µg/mL) sobre *C. putoria*. Os materiais e métodos foram semelhantes ao capítulo III. Não houve diferença significativa: massa individual média das larvas, duração média da inoculação das larvas até abandono e estágios larval, pupal e total. Não houve diferença significativa: viabilidades larval e total, porém viabilidade pupal do T1 diferiu significativamente do controle e T2, e T3 diferiu do controle. Ampicilina pareceu não alterar desenvolvimento de *C. putoria*.

Palavras-chave: Ampicilina, Ciprofloxacino, Gentamicina, moela de frango, moscas varejeiras.

ABSTRACT

FERRAZ, Adriana Cristina Pedroso. **Assesment of new diets and the effect of adding antibiotics on calliphorid development (Diptera)**. 2012. 99p. Thesis (Ph.D. in Animal Biology). Institute of Biology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2012.

The research was divided into chapters. The first assessed the post-embryonic development of *Chrysomya albiceps* (Widemann) on chicken gizzard (control: beef). There were four replications (100g each diet, 40 1st instar/2nd generation larvae) per treatment, each recipient was placed in a larger one containing sawdust and then sealed. The mature larvae were weighed and stored in test tubes. The variation among mature larva weight means and the duration of the larva, pupa and total stages were analyzed by the Student t test ($\alpha=5\%$), the viabilities by ANOVA and the sex ratio by the chi-square test. The following were recorded: mean temperature 25.6°C and 72.4% relative air humidity, larva-adult period mean duration of 8.1 days (meat) and 8.2 days (gizzard); 71% to 87% larva viability; 100% and 99% pupa viability 58% and 67% larva and adult viabilities, respectively. Chicken gizzard was shown to be satisfactory as diet for *C. albiceps*. The second chapter assessed the post embryonic development of *Chysomya putoria* (Widemann) in chicken gizzard and homogenized chicken gizzard in 65% agar (control: meat). Four replications (60 mL diet, 40 1st instar/5th generation larvae) were made per treatment. The homogenate was prepared in a mixer (gizzard, distilled water and agar). A mean temperature of 20.6 °C and 67.7% relative air humidity were recorded. The mean duration of the larva-adult period was 8.868 days (meat), 8.676 days (gizzard) and 9.067 days (homogenate); the larva viability was 98%; 92% and 73%; the pupa viability was 98%; 91% and 71%; the larva and adult viabilities were 93%; 83% and 64%, respectively. There were significant difference in the duration of the pupa period between meat and the homogenate. Both diets were shown to be satisfactory for *C. putoria*. The third chapter assessed different ciprofloxacin concentrations (3.33 µg/mL; 6.66 µg/mL and 13.33 µg/mL in gizzard/65% agar homogenate) on *C. putoria* development (the control received distilled water). They were replicated four times (60 grams diet, 40 1st instar/3rd generation larvae) in an acclimatized chamber 30°C day/28 °C night, 70±10% relative air humidity and 14-hour photoperiod. There was no significant difference for: mean individual larva weight, mean duration of the larva inoculation until abandonment and the larva, pupa and total stages. Only treatment 2 differed significantly from the control in the larval and total viability. Ciprofloxacin seemed not to alter *C. putoria* development. The fourth chapter assessed different gentamicin concentrations (4.44µg/mL; 13.33µg/mL and 66.66µg/mL) on *C. putoria*. The materials and methods were similar to those of chapter III. There was no significant difference for: mean individual larva weight, mean duration of the larva inoculation until abandonment and the larva, pupa and total stages. Only treatment 2 differed significantly from the control for larva viability. Gentamicin seemed not to alter *C. putoria* development. The fifth chapter assessed different ampicillin concentrations (66µg/mL; 81.33µg/mL and 166.66µg/mL) on *C. putoria*. The materials and methods were similar to chapter III. There was no significant difference for: mean individual larva weight, mean duration of the larvae inoculation until abandonment and the larval, pupa and total stages. There was no significant difference for larva and total viability, but pupa viability in T1 differed significantly from the control and T2, and T3 differed from the control. Ampicillin seemed not to alter *C. putoria* development.

Key words: Ampicillin, Ciprofloxacin, Gentamicin, chicken gizzard, blow flies

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I- AVALIAÇÃO DE DIETA NATURAL PARA DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE <i>Chrysomya albiceps</i> (WIEDEMANN, 1819) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE).....	2
CAPÍTULO II- DIETAS ALTERNATIVAS PARA <i>Chrysomya putoria</i> , UMA MOSCA VAREJEIRA DO VELHO MUNDO.....	18
CAPÍTULO III- AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ANTIBIÓTICO CIPROFLOXACINO NO DESENVOLVIMENTO DA MOSCA VAREJEIRA DO VELHO MUNDO <i>Chrysomya putoria</i>	33
CAPÍTULO IV- EFEITO DO ANTIBIÓTICO GENTAMICINA NO DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE <i>Chrysomya putoria</i> (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE).....	47
CAPÍTULO V- DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE <i>Chrysomya putoria</i> (WIEDEMANN, 1830) COM FONTE ALIMENTAR CONTENDO AMPICILINA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	60
2 CONCLUSÕES GERAIS	73
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
4 ANEXOS	76

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os dípteros califorídeos possuem uma grande diversidade ecológica (Zumpt, 1965). *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) são espécies de califorídeos introduzidas no Brasil, vindas da África (Guimarães et al., 1978, 1979). O gênero *Chrysomya* é reconhecido mundialmente pela importância médico-sanitária e é acusado de aparentemente ter provocado o deslocamento de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775), uma espécie nativa das Américas (Guimarães et al., 1979; Prado & Guimarães, 1982; Greenberg & Szyska, 1984).

Chrysomya albiceps encontra-se distribuída em quase todo o território nacional, inclusive teria colonizado fortemente o município de Seropédica, Rio de Janeiro (Carraro 1995), apresentando preferência por áreas habitadas (Nuorteva, 1963; Ferreira & Barbola, 1998), mas presente em ambientes florestais como a Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro (Ferraz et al., 2010). Está associada a quadros de miíases (Guimarães et al., 1979), sendo uma das principais causadoras de miíases em ovinos na África do Sul (Soulsby, 1969) e Romênia (Ciolca & Zarzara, 1980), e também causadora de miíases em humanos, inclusive no Brasil (Ferraz et al., 2011). Esta espécie é considerada como especialista por utilizar apenas um tipo de substrato para criação de suas larvas: material de origem animal em decomposição (Guimarães et al., 1979).

Chrysomya putoria é considerada uma espécie de rápida dispersão (Prado & Guimarães 1982), encontrada no Brasil nos estados do Amazonas, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (Imbiriba et al. 1977; Guimarães et al. 1978, 1979; Ferreira 1983; Paraluppi & Castellón 1991). Existem registros da espécie causando miíases secundárias em animais e humanos na Guiné e Nigéria (Zumpt 1965; Ostesile & Dipeolu 1981). Atua também como vetor mecânico de organismos patogênicos (Greenberg 1971, 1973; Furlanetto et al 1984) principalmente por seus hábitos de procriar-se em matéria orgânica animal em decomposição (Guimarães et al. 1978, Baumgartner & Greenberg 1984). *C. putoria* destaca-se ainda pelo potencial para uso em bioterapia ou terapia larval, técnica que usa larvas para remoção de tecidos necrosados e auxiliar na cicatrização de feridas (Marcondes, 2006).

Ambas espécies ainda possuem grande potencial para uso como vestígio dentro das peças periciais, auxiliando nas estimativas de intervalo *post mortem*, pois os califorídeos geralmente são os primeiros a ocuparem um cadáver, cerca de poucas horas após a morte, e costumam ocupar inicialmente os locais de facada, tiro, ou outras perfurações (Carvalho et al. 2004). Podem também ser usadas na identificação de substâncias ou drogas, sendo as larvas consideradas como amostras alternativas nas análises toxicológicas, para isso necessita-se conhecer os efeitos dessas substâncias na taxa de desenvolvimento.

Nesta tese foram realizados estudos com as duas espécies que colaborassem com o uso destas na entomologia forense, terapia larval e ainda no tratamento de miíases. No primeiro capítulo foi testada a moela de frango como dieta alternativa para *C. albiceps*, o que colaboraria com criações de dípteros a custos mais baixos. No segundo capítulo buscou-se avaliar esta mesma dieta e ainda homogenato de moela em agar 65% para a espécie *C. putoria*, buscando uma opção de dieta que possibilitasse solubilização de substâncias, e ainda barata e eficiente fonte alimentar no desenvolvimento pós-embrionário de dípteros. No terceiro, quarto e quinto capítulos foram testados os antibióticos de amplo espectro e de uso difundido ciprofloxacino, gentamicina e ampicilina, respectivamente, a fim de observar os efeitos destes, acrescido na dieta para o desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria*.

**CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DE DIETA NATURAL PARA
DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Chrysomya albiceps*
(WIEDEMANN, 1819) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

Avaliação de dieta natural para desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae)

RESUMO

O presente trabalho procurou avaliar o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae) em moela de frango, utilizando como controle carne bovina. Foram realizadas quatro repetições por tratamento (100g de dieta cada). Cada repetição recebeu 40 larvas de *C. albiceps* (1^o instar/2^a geração). Cada recipiente com a dieta foi inserido em outro maior contendo serragem e vedado com tecido de náilon e elástico. Foram realizadas observações diárias. A massa corporal das larvas maduras foi registrada e as larvas armazenadas em tubos de ensaio vedados com tecido de náilon e elástico. Termohigrógrafo registrou uma temperatura média de 26,3° C e a umidade relativa do ar média de 68,5%. A variação entre as médias de massa de larvas maduras e as durações dos estágios de larva, pupa e totais (neolarvas a adultos) foram analisadas por Teste t de Student ($\alpha=5\%$) e as viabilidades comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada pelo qui-quadrado. As massas encontradas não diferiram significativamente (carne bovina=0,281g, moela de frango=0,257g) e com início do abandono pós-alimentar a partir do terceiro dia de experimento. A duração média do período de larva a adulto foi 8,1 dias para carne e 8,2 para moela; as viabilidades de larva foram 71% e 87%, respectivamente; as viabilidades de pupa foram 100% e 99%, respectivamente; as viabilidades de larva a adulto foram 58% e 67%, respectivamente, não ocorrendo diferenças significativas em nenhum destes parâmetros. Moela de frango se mostrou satisfatória como dieta alternativa para criação de *C. albiceps*.

PALAVRAS-CHAVE: armadilha para captura de dípteros, biologia de califorídeos, criação de dípteros, dietas alternativas

ABSTRACT

This study sought to evaluate the post-embryonic development of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae) in chicken gizzard using bovine meat as a control. There were four replicates per treatment (100g of each diet). Each replicate received 40 neolarvae *C. albiceps* (2nd generation). Each container with diet was inserted into another larger containing sawdust and sealed with cloth of nylon and elastic. Observations were carried out daily. The body mass of mature larvae were recorded and stored in these test tubes sealed with nylon fabric and elastic. Thermohygrograph recorded an average temperature of 26.3°C and an average relative humidity of 68.5%. The variation between the mean weight of mature larvae and the duration of the larval stages, pupal and total (neolarvae to adults) were analyzed by Student t test ($\alpha = 5\%$) and the viability compared by ANOVA. The sex ratio was tested by chi-square. The weights found did not differ significantly (bovine meat= 0.281g, chicken gizzard= 0.257g) and early post-drop food from the third day of the experiment. The average length of the larva-adult period was 8.1 days for meat and 8.2 for gizzard; the larval survivals were 71% and 87% respectively; Pupal viability were 100% and 99% respectively, the viability of larva to adult were 58% and 67% respectively, and there were no significant differences in any of these parameters. Chicken gizzard was found satisfactory as an alternative diet for rearing *C. albiceps*.

KEYWORDS: trap for catching flies, biology of Calliphoridae, creation of Diptera, alternative diets

INTRODUÇÃO

Nos anos 70 foram detectadas no Brasil três espécies de califorídeos do gênero *Chrysomya*: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) que se disseminaram em diversas regiões do país (GUIMARÃES et al., 1979). Atualmente, *C. albiceps* encontra-se em diversos biótopos: rural, urbano e florestal, prevalecendo sobre as outras espécies de califorídeos em algumas regiões do país (SOUZA & LINHARES 1997, GUIMARÃES et al. 1978, CARRARO & MILWARD-DE-AZEVEDO 1999, FERRAZ et al. 2010). Por pousar em lixos, fezes humanas e resíduos em decomposição, esta espécie tem potencial para transportar em suas patas microorganismos, atuando desta forma como vetor mecânico de agentes patogênicos como: enterovírus, bactérias entéricas, esporos de fungos, cistos de protozoários de ovos e larvas de helmintos (GREENBERG, 1973; FURLANETO *et al.*, 1984; QUEIROZ et al., 1999). Pode estar associada também a miíases secundárias (FERRAZ et al. 2011) ou atuar como hospedeiro forético de ovos de *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (GRISI et al. 2002).

Para o controle biológico, incluído dentro do controle integrado de pragas, devido aos prejuízos sócio-econômicos e médico-sanitários, é de grande importância a manutenção de vasta quantidade de dípteros necrófagos em laboratório para estudo de sua biologia, dando suporte a pesquisas elucidativas sobre seu controle no ambiente (MELLO & AGUIAR-COELHO, 2009; BARBOSA et al., 2010). Além disso atuam como indicadores forenses na medicina legal e são usados na identificação de substâncias e drogas, sendo as larvas consideradas como amostras alternativas nas análises toxicológicas na ausência de tecidos e fluidos coletados habitualmente para este fim. Portanto, é de grande importância a manutenção em vasta quantidade de dípteros necrófagos. Para a criação em larga escala de dípteros, é necessária uma dieta alternativa eficiente que além de possuir os aspectos nutricionais que supram as necessidades do inseto, também possua características físicas, químicas e biológicas que capacitem o processo alimentar, resultando em indivíduos com a mesma ou maior longevidade e/ou capacidade reprodutiva em relação aos oriundos da dieta natural (PARRA, 2001). Alguns estudos com Calliphoridae já foram desenvolvidos (BARBOSA et al 2004, SOUSA et al 2011, FERRAZ et al., 2012)

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da moela de frango como dieta para larvas, no desenvolvimento pós-embrionário de *C. albiceps*.

MATERIAL E MÉTODOS

A colônia de *Chrysomya albiceps* foi formada por espécimes coletados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro, localizado no bairro de São Cristovão, e tendo como seu plantel o foco em peixes, répteis, aves e mamíferos. As armadilhas para captura dos insetos foram confeccionadas a partir de frascos plásticos cilíndricos transparentes de refrigerantes de dois litros (35cm de comprimento x 10 cm de diâmetro), cortados a uma altura de 18 cm a partir da base e pintados com tinta esmalte preto fosco da marca Star. Foram feitas quatro aberturas de 2x2cm, a 8 cm da base, espaçadas com a mesma metragem entre si para permitir a entrada dos dípteros. Na parte superior foi acoplada a outra porção da garrafa com forma de funil de plástico, após cortes verticais na borda, sendo envolvido por um saco plástico transparente preso com tiras de borrachas na parte externa da armadilha, cuja remoção permite a captura dos insetos. As armadilhas ficaram suspensas a 1,5m do solo por fios de nylon e apoiadas em hastes de madeira, expostas por cinco horas. Em seu interior foram inseridos como isca moela de frango e sardinha com dois dias sem refrigeração (Figura 1).

Os insetos foram encaminhados para o Laboratório de Estudo de Dípteros (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico da Universidade Federal

do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). Os indivíduos adultos foram identificados através da chave taxonômica de MELLO (2003) e transferidos para gaiolas de madeira com as laterais em nylon, sendo alimentados diariamente com mel (50%), água e como substrato para oviposição foi oferecido carne bovina e moela de frango. A metodologia de criação seguiu descrição de BARBOSA et al. (2004) e FERRAZ et al. (2011).

Quarenta larvas de primeiro ínstar oriundas de fêmeas da 2^o geração em laboratório foram transferidas para 100 gramas de dieta. Foram realizadas quatro repetições por tratamento: no primeiro, foi utilizado carne bovina como controle e no segundo testou-se como dieta alternativa moela de frango. Em cada tratamento, a respectiva dieta foi acondicionada em potes plásticos (500 gramas) e colocados em recipientes maiores (2000 gramas), contendo serragem esterilizada e tampados com tecido de nailon. A carne bovina foi cortada em cubos de aproximadamente 2 cm³ e a moela foi utilizada em sua forma íntegra. Ambas foram utilizadas sem serem submetidas ao congelamento no LED e compradas resfriadas.

O registro da massa corporal da larva de *C. albiceps* foi realizado em lotes de cinco larvas, após o abandono da dieta, em balança semi-analítica. Os espécimes foram armazenados em tubos de ensaio devidamente rotulados contendo serragem como substrato de pupariação e vedados com tecido de algodão preso com elástico. As observações foram diárias e realizadas sempre no mesmo horário até a emergência dos adultos. A temperatura e a umidade relativa do ar foram registradas diariamente por um termohigrógrafo (Figura 2).

Para a análise bruta dos dados e elaboração dos gráficos utilizou-se o programa Microsoft Excel. Os resultados obtidos relativos à duração do desenvolvimento pós embrionário foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas através do pós-teste Tukey, ao nível de 5% de significância utilizando o Instat 2. As viabilidades foram comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

Em relação ao ritmo de abandono de larvas maduras da dieta verificou-se que em ambos os substratos o início do abandono no mesmo dia (3^o dia), com um pico de abandono neste dia para larvas criadas em carne, já nas larvas criadas em moela observou-se pico posterior (4^o dia) se entendendo até o sexto dia (0,7%) (Figura 3). Porém as durações médias dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* criadas em dieta moela de frango e carne não diferiram significativamente entre as dietas testadas: estágio de larva (p= 0,584), estágio de pupa (p= 0,730) e de neo-larvas a emergência (p= 0,488) (Tabela 2).

Não houve diferença significativa observada para a massa corporal média de larvas maduras criadas em dieta moela e carne (p= 0,425) (Tabela 1).

O pico de pupariação das larvas seguiu o mesmo padrão do ritmo de abandono, com pico posterior para a larvas criadas na moela (5^o dia, 64%), já o da carne foi no 4^o e 5^o dias (43% em ambos) (Figura 4).

Foi observada semelhança no pico de emergência de *C. albiceps* entre os dois tratamentos, com o início e o pico de emergência no oitavo dia e se estendendo até o décimo dia na dieta carne e décimo primeiro dia para a moela (Figura 5).

As viabilidades dos estágios de larva (p= 0,087) e total (neo-larvas a emergência) (p=0,4646) não diferiram significativamente. Não foi possível fazer ANOVA para a viabilidade pupal, pois não houve variância (na carne, a viabilidade foi 100% nas quatro repetições).

Não houve desvio da razão sexual (carne=0,58; moela=0,46), porém houve maior número de fêmeas na dieta carne (58%) ($\chi^2= 2,472$, gl=1, χ^2 tabelado=3,84), enquanto que na dieta moela foi maior o número de machos (53%) ($\chi^2= 0,321$, gl=1, χ^2 tabelado=3,84). Ambas dietas apresentaram 100% de normalidade dos adultos emergidos.

DISCUSSÃO

A dieta natural para a criação de larvas de *Chrysomya albiceps* é a carne bovina (ULLYET, 1950; MARCKENKO, 1985), que é adquirida a custos elevados, onde atualmente 1 kg de carne acém custa em média 20% mais cara que 1 kg de moela de frango, sendo que uma boa dieta deve ter uma relação custo-benefício favorável (CHAUNDHURY *et al.* 2000). Além disso, a carne possui o inconveniente de precisar ser processada cortando-a em cubos de aproximadamente 2 cm³, demandando tempo e trabalho. A moela de frango utilizada como substrato para criação de larvas parece apresentar as condições necessárias ao desenvolvimento dos imaturos de califorídeos, não necessitando ser cortada, pois devido ao seu formato, já vem no tamanho ideal para o uso imediato.

A massa média individual das larvas criadas na carne e na moela foi semelhante. Isto se deve provavelmente às características nutricionais das duas dietas. Ambas possuem proteínas (21g e 16g, respectivamente), gorduras totais (6g e 2g, respectivamente) e saturadas (2g e 0,5g, respectivamente), colesterol (125mg e 97mg, respectivamente), cálcio (12mg e 8mg, respectivamente), ferro (3,2 mg e 1,95 mg, respectivamente) e sódio (130mg e 82mg, respectivamente), sendo na carne todos estes nutrientes em valor mais elevado, além de mais calórica (carne= 150 kcal, moela= 82kcal) (Informações retiradas das embalagens dos produtos). Larvas mais pesadas potencializam a capacidade reprodutiva do adulto (RIBEIRO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1997)

A moela possui ainda uma consistência similar à da carne e isso é um dos passos para uma dieta alternativa ser eficiente já que para se criar moscas em laboratório é preciso uma dieta que possua, não apenas os aspectos nutricionais que supram as necessidades do inseto, mas também características físicas, químicas e microbiológicas que capacitem o processo alimentar (PARRA, 2001)

Quanto ao ritmo de abandono da dieta pelas larvas maduras, houve uma extensão do período por parte das larvas criadas em moela, que abandonaram mais tardiamente a dieta. Segundo ULLYETT (1950) e KAMAL (1958), isto pode indicar uma estratégia para compensar a queda na qualidade nutricional do alimento consumido. Alguns autores consideram a maior rapidez no desenvolvimento das larvas uma vantagem para sua sobrevivência, pois a larva alcança sua maturidade mais rapidamente (AGUIAR-COELHO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1998). Apesar disso, a grande maioria abandonou em período semelhante às criadas em carne.

A duração média do período de larvas de *C. albiceps* na carne (4,7 dias) e na moela (4,9 dias) foi semelhante ao encontrado por AGUIAR-COELHO *et al* (1995) (5,2 dias) e QUEIROZ e MILWARD-DE-AZEVEDO (1991) (5,21 dias), ambos sob condições controladas utilizando carne equina. Já a duração média do estágio de pupa em nosso estudo (carne=3,4 dias, moela= 3,3 dias) se assemelhou mais ao de AGUIAR-COELHO *et al* (1995) (3,68 dias) do que de QUEIROZ e MILWARD-DE-AZEVEDO (1991) (4,53 dias). A duração total média em nosso estudo (carne=8,1 dias, moela=8,2 dias) também se assemelhou ao do primeiro autor (total = 7,73 dias) e diferiu do segundo (10,86 dias). As diferenças provavelmente se devem as oscilações de temperatura, pois segundo HIGLEY & HASKELL (2003) essas oscilações são as responsáveis pela variação do tempo de desenvolvimento.

QUEIROZ e MILWARD-DE-AZEVEDO (1991) utilizaram câmara climatizada a 27°C e umidade relativa 60±10% e 14 horas de fotofase, enquanto que AGUIAR-COELHO et al (1995) utilizaram câmara climatizada a 30°C e umidade relativa 60±10% e 14 horas de fotofase.

É importante perceber também que a duração de todos os estágios (larva, pupa e total – neolarvas a emergência) foi semelhante entre as duas dietas (carne e moela). Por outro lado, a viabilidade de larvas na carne (71%) foi menor que na moela (87%). A viabilidade de larvas na moela foi semelhante ao encontrada em estudo comparando duas dietas naturais de *C. albiceps*: carne equina e peixe (85% de viabilidade para ambas) (RIBEIRO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1997). Porém, ambas as dietas do presente estudo (carne e moela) tiveram viabilidades larvais inferiores ao estudo de QUEIROZ e MILWARD-DE-AZEVEDO (1991) criando *C. albiceps* em carne equina (95,75%).

A razão sexual na dieta testada ficou próxima de 50%, padrão considerado normal (ESSER, 1990), assim como não foram gerados indivíduos anormais em ambas as dietas, um fator positivo.

Os resultados deste estudo permitirão a produção em larga escala destes insetos, auxiliando cientistas, bem como, produzindo um produto a ser comercializado para outras áreas da ciência, como herpetólogos, entomólogos, aquarífilista, ranicultores, entre outros.

AGRADECIMENTOS

A Bruno Reis do Amaral pela elaboração do desenho da armadilha. Ao CNPq, UNIRIO, FINEP e FAPERJ pelo suporte financeiro a este trabalho.

REFERENCIAS

- AGUIAR-COELHO, V.M., M. M. C. QUEIROZ & E. M. V. MILWARD-DE-AZEVEDO, 1995. Associação entre larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoologia* 12: 983-990.
- AGUIAR-COELHO, V. M. & MILWARD-DE-AZEVEDO, E. M. V. 1998. Combined rearing of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) under laboratory conditios. *Journal Applied Entomology* 122: 551-554.
- BARBOSA, L. S., JESUS, D. M. L. & AGUIAR-COELHO, V. M. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Díptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências* 6: 207-217.
- BARBOSA LS, COURI MS, COELHO, VMA. 2010. Desempenho do parasitóide *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae) utilizando como hospedeiro *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae), sob diferentes tempos de exposição. *Revista Brasileira de Entomologia* 54 (1): 125-129.
- CARRARO, VM; MILWARD-DE-AZEVEDO, EMV. 1999. Quantitative descriptions of calliphorid dipterans captured on Campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro using sardine bait. *Revista Brasileira de Zoociências* I(1): 77-89.
- CHAUDHURY, M. F.; ALVAREZ, L.A.; VELASQUEZ, L.L. 2000. A new meatless diet for adult screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Economic Entomology* 93(4): 1398-1401.

- ESSER.J.R. 1990. Factors influencing oviposition, larval growth and mortality in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), a pest of salted dried fish in south-east Ásia. *Bull. Entomol. Res.* 80 (4): 369-376.
- FERRAZ, ACP., GADELHA, BQ., QUEIROZ, MMC., MOYA-BORJA, GE., AGUIAR-COELHO, VM., COELHO, VALÉRIA M. A. 2010. Effects of forest fragmentation on dipterofauna (Calliphoridae) at the Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, RJ. *Brazilian Journal of Biology* 70: 55 – 63.
- FERRAZ ACP, ALMEIDA VRG, JESUS DM., NUNES RV, NASCIMENTO BP, COELHO VMA, LESSA CSS. 2011. Epidemiological Study of Myiasis in Hospital do Andaraí, Rio de Janeiro, with the Occurrence of an Exotic Etiological Agent. *Neotropical Entomology* 40: 393 - 397.
- FERRAZ ACP, DALLAVECCHIA DL, SILVA DC, CARVALHO RP, SOUZA FILHO, RG, AGUIAR-COELHO VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an old world screwworm fly. *Journal Of Insect Science*, no prelo.
- FURLANETTO, S.M.P.; CAMPOS, M.L.C. & HÁRSI, C.M., 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Rev. Microbiol.* 15 (3): 170-174.
- GREENBERG, B., 1973. Flies and Diseases: Biology and Disease Transmission. Vol II Princeton University Press, Princeton, NJ, 740 p.
- GRISI L, MASSARD CL, MOYA-BORJA GE, Pereira JB. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitas em bovinos no Brasil. *Hora Vet.* 21: 8-10.
- GUIMARÃES J. H.; PRADO, A. P. & LINHARES, A. X. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22(1): 53-60.
- GUIMARÃES, J.H.; PRADO, A.P.; BURALLI, G.M. 1979. Dispersal and Distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 23 (4): 245-255.
- HIGLEY, LG & HASKELL NH. 2003. Insect development na forensic entomology. In: Byrd JH & JL Castner (Eds). *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida, pp. 287-302.
- KAMAL, A. S. 1958. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous calliphorids and sarcophagids. *Annals of the Entomological Society of America* 51: 261-271.
- MARCKENKO, MI. Development of *Chrysomya albiceps* (Wd) (Diptera, Calliphoridae). *Ent. Obozr* 1: 79-84, 1991.
- MELLO RS, AGUIAR-COELHO VM. 2009. Durations of immature stage development period of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. *Parasitology Research* 104: 411 – 418.
- PARRA, J.R.P.2001. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico, 6. ed. São Paulo:ESALQ/FEALQ.
- QUEIROZ, M.M.C.; NORBERG, A.N.; MAURE, E.A.P.; TOLEDO, R.F.; GAZÊTA, G.S.; DUTRA, A.E.A. & RODRIGUES-GUIMARÃES, R., 1999. Veiculação de bactérias patogênicas por moscas sinantrópicas coletadas em restaurantes, hospitais e feiras da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. Anais do XIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia. Acapulco, Guerrero. México. 102 p.
- QUEIROZ, M.M.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. 1991. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 8 (2/3/4): 75-84.

- RIBEIRO, RC; MILWARD-DE-AZEVEDO, EMV. 1997. Dietas naturais na criação de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819; Diptera: Calliphoridae): estudo comparado. *Ciência Rural* 27(4): 641-644.
- SOUSA, A. G. P.; FERRAZ ACP; NASCIMENTO, ALO & AGUIAR-COELHO, V M. 2011. Alternative natural diet for creation of immature of the oriental latrine fly under controlled conditions. *Revista Brasileira de Zootecias* 12 (2): 133-140.
- SOUZA, A.M; LINHARES, A.X. 1997. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Med. Vet. Entomol* 11(1): 8-12.
- ULLYETT, GC. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Phil trans R Soc Lond* 234: 77-174.

Tabela 1: Massa corporal de larvas maduras (g)* de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) oriundas de duas dietas (carne bovina e moela de frango) (Temperatura Média: 26,3°C, mín. 24,8°C, máx. 27,7°C, Umidade Relativa do Ar média: 68,5%, mín.61,0%, máx. 75,45%).

	Massa individual das larvas	Desvio padrão	Massa mínima	Massa máxima
Carne	0,281 ^a	0,055	0,228	0,353
Moela	0,257 ^a	0,010	0,243	0,267

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

Tabela 2: Duração média dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) criadas em carne bovina e moela de frango* (Temperatura Média: 26,3°C, mín. 24,8°C, máx. 27,7°C, Umidade Relativa do Ar média: 68,5%, mín.61,0%, máx. 75,45%).

LARVA				
	Dias	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Carne	4,7a	0,5	4,2	4,2
Moela	4,9a	0,5	5,2	5,2
PUPA				
	Dias	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Carne	3,4a	0,3	3,1	3,8
Moela	3,3a	0,5	2,8	3,9
TOTAL				
	Dias	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Carne	8,1a	0,1	8	8,2
Moela	8,2a	0,2	8	8,5

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t ao nível de 5%.

Tabela 3: Viabilidade dos estágios de larva, pupa e total (de neolarvas a adulto) de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) criada em carne bovina e moela de frango * (Temperatura Média: 26,3°C, mín. 24,8°C, máx. 27,7°C, Umidade Relativa do Ar média: 68,5%, mín.61,0%, máx. 75,45%).

LARVA				
	%	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Carne	71a	0,113	57,5	80
Moela	87a	0,113	72,5	100
PUPA				
	%	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Carne	100a	0	100	100
Moela	99a	0,016	97	97,5
TOTAL				
	%	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Carne	58a	0,162	40	72,5
Moela	67a	0,177	55	92,5

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo ANOVA ao nível de 5%.

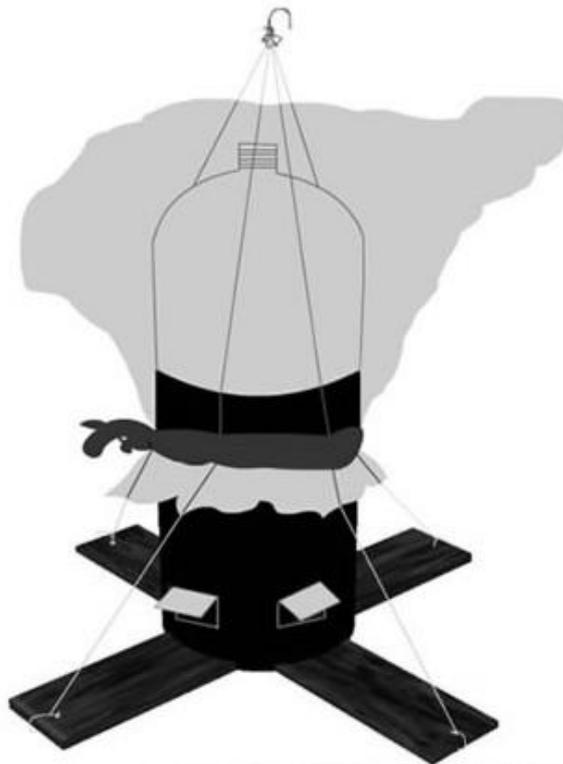


Figura 1: Armadilha para dípteros confeccionada com material alternativo (garrafa pet).
Medidas: 35 cm de comprimento x 10 cm de diâmetro

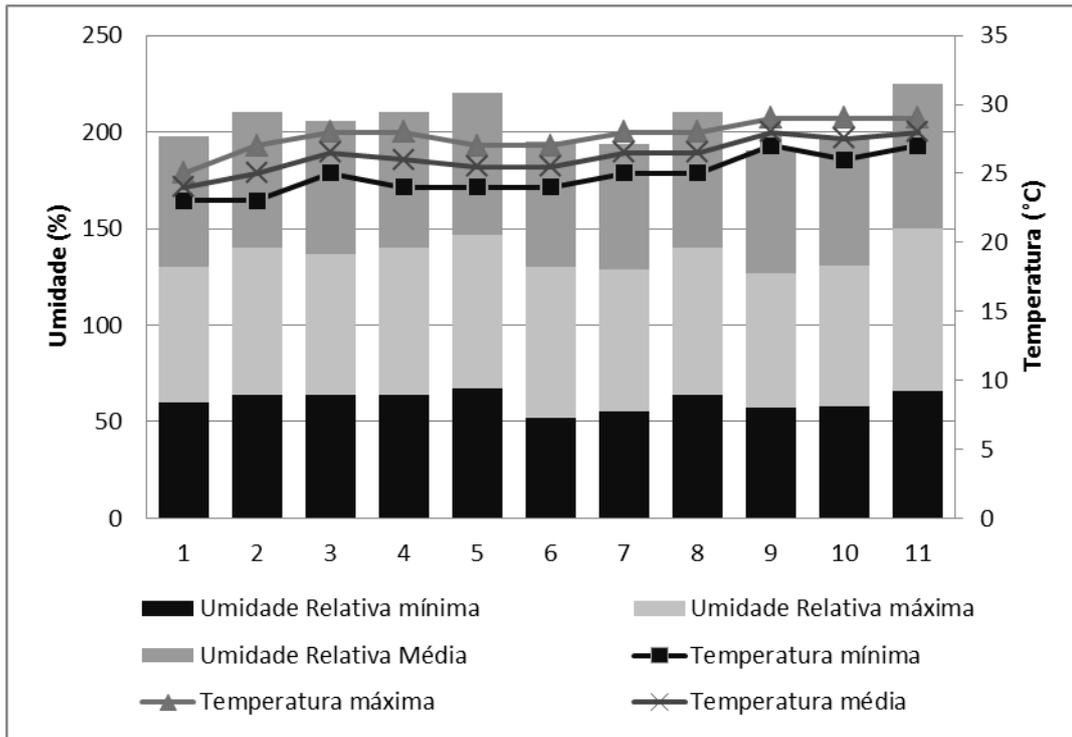


Figura 2: Temperatura e umidade relativa do ar registradas no Laboratório de Estudo de Dípteros da UNIRIO durante a fase experimental.

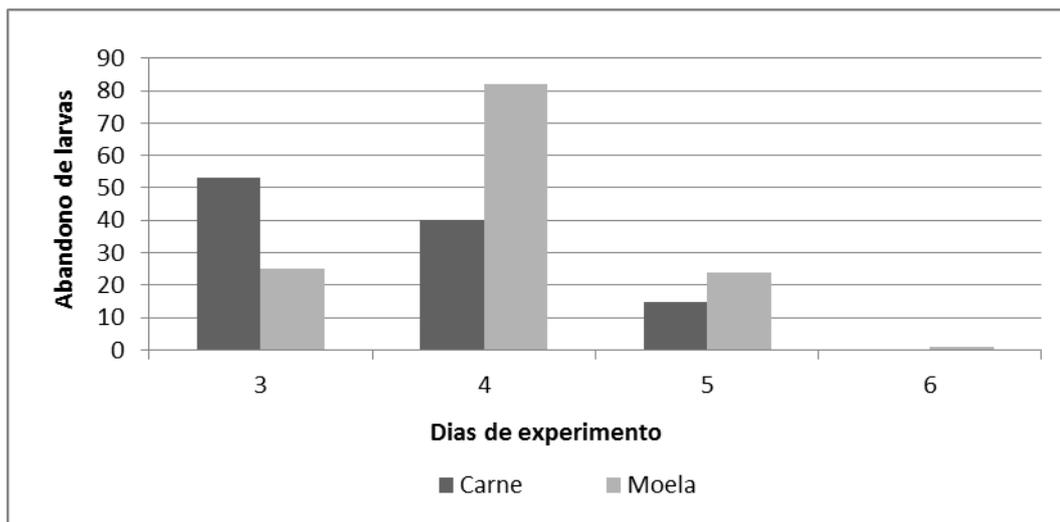


Figura 3: Ritmo de abandono de larvas maduras de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) criadas nas dietas carne bovina (controle) e moela de frango (Temperatura Média: 26,3°C, mín. 24,8°C, máx. 27,7°C, Umidade Relativa do Ar média: 68,5%, mín. 61,0%, máx. 75,45%).

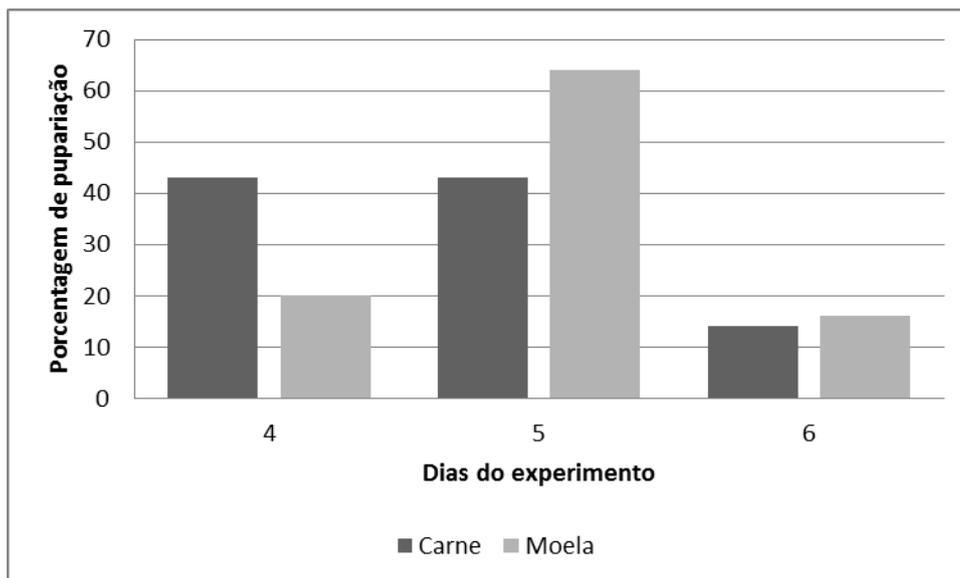


Figura 4: Taxa de pupariação de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) criadas em carne bovina (controle) e moela de frango (Temperatura Média: 26,3°C, mín. 24,8°C, máx. 27,7°C, Umidade Relativa do Ar média: 68,5%, mín.61,0%, máx. 75,45%).

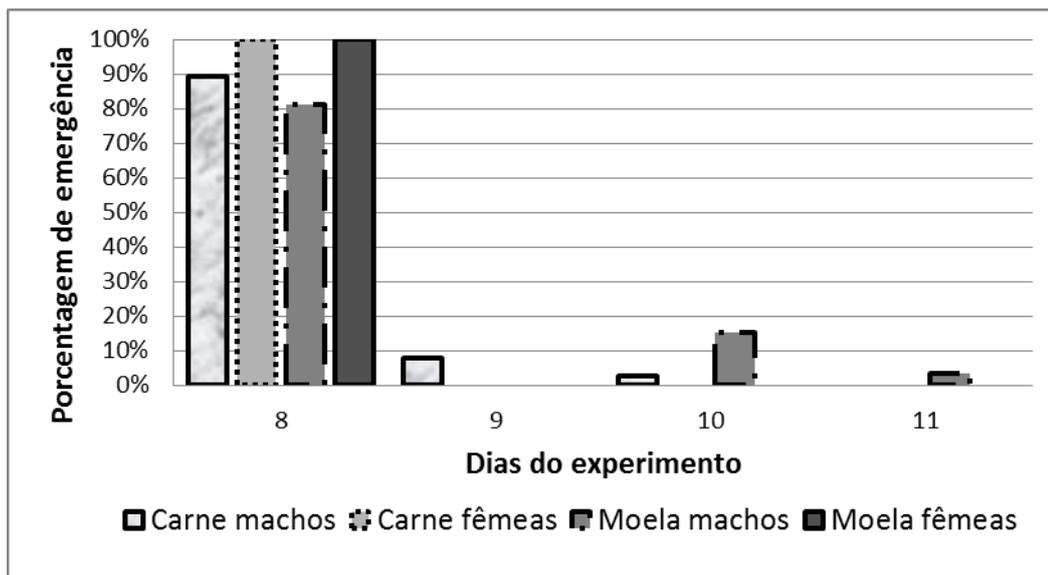


Figura 4: Taxa de emergência de machos e fêmeas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) criadas em carne bovina (controle) e moela de frango (Temperatura Média: 26,3°C, mín. 24,8°C, máx. 27,7°C, Umidade Relativa do Ar média: 68,5%, mín. 61,0%, máx. 75,45%).

**CAPÍTULO II – DIETAS ALTERNATIVAS PARA *Chrysomya putoria*, A
MOSCA VAREJEIRA DO VELHO MUNDO**

Dietas alternativas para *Chrysomya putoria*, a mosca varejeira do Velho Mundo

RESUMO

O presente trabalho procurou avaliar o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) em moela e em homogenato de moela em agar, utilizando como controle carne bovina. Foram realizadas quatro repetições por tratamento (60g de dieta cada). O homogenato foi preparado em mixer utilizando moela (60%), água destilada e agar. Cada repetição recebeu 40 neolarvas de *C. putoria* (5ª geração). Cada recipiente com dieta foi inserido em outro maior contendo serragem e vedado com tecido de náilon e elástico. Foram realizadas observações diárias. As larvas foram pesadas e armazenadas em tubos de ensaio. Termohigrógrafo registrou uma temperatura média de 20,6° C e a umidade relativa do ar média de 67,7%. A variação entre as médias de massa de larvas maduras e as durações dos estágios larvais, pupais e totais (neolarvas a adultos) foram analisadas por Teste t de Student ($\alpha=5\%$) e as viabilidades comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada pelo qui-quadrado. A duração média do período de larva a adulto foi 8,868 dias para carne; 8,676 para moela e 9,067 para homogenato de moela em agar; as viabilidades larvais foram 98%; 92% e 73%, respectivamente; as viabilidades de pupa foram 98%; 91% e 71%, respectivamente; as viabilidades de larva a adulto foram 93%; 83% e 64%, respectivamente. Houve diferença significativa na duração do período pupal entre a carne e homogenato de moela em agar. As duas dietas alternativas se mostraram satisfatórias para criação de *C. putoria*.

PALAVRAS CHAVE: Criação de moscas, Califorídeos, larvas, proteínas, pupas.

ABSTRACT This study had as objective to evaluate the post-embryonic development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) in the diet of gizzard and gizzard homogenate in agar, using as control bovine meat. There were four replicates per treatment (60 g of each diet). The homogenate was prepared in mixer using gizzard (60%), distilled water and agar. Each replicate received 40 neolarae *C. putoria* (5th generation). Each glass flask with a diet was inserted into a larger one containing sawdust and sealed with cloth of nylon and elastic. Observations were made daily. Larvae were weighed and stored in test tubes sealed with cloth of nylon and elastic. Thermohygrograph recorded an average temperature of 20.6°C and an average relative humidity of 67.7%. The variation between the mean weight of mature larvae and the duration of the larval stages, pupal and total (neolarae to adults) were analyzed by Student t test ($\alpha = 5\%$) and the viability compared by ANOVA. The sex ratio was tested by chi-square. The average length of the larva-adult period was 8.868 days for meat, gizzards and 8.676 to 9.067 for gizzar homogenate in agar; the larval survivals were 98%, 92% and 73% respectively; pupal viability was 98%; 91% and 71% respectively, the larva-adult viabilities were 93%, 83% and 64% respectively. Significant difference in pupal period between the meat and gizzard homogenate in agar. The two diets were good alternatives for rearing *C. putoria*.

KEYWORDS: Creation of flies, blowflies, maggots, protein, pupae.

INTRODUÇÃO

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) é um díptero difundido pelo Brasil (Guimarães et al. 1978) após sua introdução através de navios oriundos da África. Importante por ser um potencial vetor mecânico de polivírus tipo I e III, vírus Coxsackie, *Shilella* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Giardia lamblia*, assim como outros patógenos entéricos e agentes irritantes e espoliantes (Greenberg 1971, 1973; Furlanetto et al. 1984). Suas larvas

podem produzir miíases secundárias (Zumpt 1965). São encontradas em granjas (Guimarães 1984) e desenvolvendo-se em esterco líquido com umidade acima de 75% (Bruno et al. 1993)

As larvas da família Calliphoridae são detritívoras, alimentando-se de fezes, em feridas, ou são parasitas (Brusca & Brusca 2007). Nos insetos necrófagos, a taxa de desenvolvimento pode ser afetada por substâncias introduzidas no seu organismo através da sua alimentação (Introna et al. 2001) e isso pode afetar estudos com estes insetos como os ligados a estimativa do intervalo pós-morte na entomologia forense, pois esta análise é baseada no período de desenvolvimento destes insetos (Estrada et al. 2009).

Dietas eficientes são essenciais para manutenção de grandes estoques de dípteros em laboratório, inclusive para a produção de pupas para criação do parasitóide *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836), promissor controlador biológico que vem sendo estudado (Barbosa et al. 2008; Marinho 2007; Mello & Aguiar-Coelho 2009).

A carne bovina é a dieta efetiva para a criação de larvas de dípteros necrófagos, porém depende odor desagradável característico de matéria orgânica em decomposição e torna maior a possibilidade de contaminação secundária por outros insetos atraídos (Estrada et al. 2009; Barbosa et al. 2004), além de trazer altos custos para os laboratórios. A moela também libera odores de putrefação, porém a facilidade na obtenção de moela em mercados e a redução de custos motivam estudos para avaliar o potencial deste substrato alimentar na manutenção de estoques de dípteros necrófagos como *C. putoria*. Já as dietas artificiais permitem maior controle dos efeitos de cada ingrediente presente e diminuem a liberação de odores e permitem ainda a homogeneização de substâncias para testes de toxicidade, por exemplo.

Neste bioensaio foi monitorado o desempenho de imaturos de *C. putoria* criados em duas dietas naturais (carne e moela) e em uma dieta artificial (homogenato de moela em agar).

MATERIAL E MÉTODOS

A criação dos dípteros utilizados e toda a parte experimental foram realizadas no Laboratório de Estudos de Dípteros (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). A colônia de *C. putoria* foi iniciada com adultos coletados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro localizado dentro do parque da Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, RJ. Foram utilizadas três armadilhas seguindo o modelo de Ferreira (1978), contendo sardinha como isca e expostas por aproximadamente cinco horas, na parte da manhã. Após a coleta dos adultos e das larvas de dípteros muscóides, os insetos foram levados para o LED, onde foi realizada a triagem e a identificação taxonômica dos mesmos de acordo com Mello (2003). As moscas foram criadas em gaiolas de plástico com abertura frontal revestida com tecido de náilon, sendo alimentadas com água, solução de mel e água (50%), e carne bovina e moela de frango como fonte de proteínas e substrato de oviposição e maturação de ovários.

Foram realizados três tratamentos com quatro repetições cada. O primeiro tratamento foi o controle (60 g de carne bovina do tipo acém em cada repetição), o segundo tratamento a ser testado foi moela de frango (60 g de moela por repetição) e o terceiro a dieta de homogenato de moela em solução de agar na concentração de 65% (60 mL para cada repetição).

O homogenato foi preparado em mixer utilizando a concentração de três partes de moela para uma de água destilada. A solução de agar foi preparada conforme as recomendações da embalagem (1,5%) em água destilada e aquecido a 100°C até a sua completa dissolução e então adicionada ao homogenato. O conteúdo foi misturado em tubos com tampa de rosca (20x150mm) em *vortex* por cerca de dois minutos, esterilizado na

autoclave por 15min / 121°C, e após o esfriamento dos tubos, estes foram novamente homogeneizados em *vortex* e então vertidos em béqueres de 100 mL.

Nos demais tratamentos (carne bovina e moela), houve descongelamento 24 horas antes do uso em refrigerador e realizada o corte em cubos de 1cm³ e estes adicionados então aos béqueres de 100 mL.

Cada repetição recebeu 40 larvas de primeiro ínstar de *C. putoria* da 5ª geração em laboratório com auxílio de um pincel. Cada béquer de 100mL de cada repetição foi inserido em outro béquer maior (400mL) contendo serragem esterilizada para permitir a pupariação das larvas quando maduras após o abandono da dieta e vedado com tecido de náilon e elástico.

Foi utilizada uma quantidade de dieta nas três repetições que proporcionasse mais de 1g de dieta por larva, pois esta foi verificada por Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo (1996) como a densidade ideal relativa ao emprego de carne em diferentes califórídeos. Esse foi um cuidado para que a densidade não atrapalhasse a avaliação da eficiência destas dietas causando estresse por competição explorativa por recursos ou por alterações químicas no substrato alimentar decorrentes do metabolismo larval (Khazaeli et al. 1993; Bubli et al. 1998).

Foram realizadas observações diárias sempre no mesmo horário (12h). O registro da massa corporal das larvas maduras foi realizado em lotes de cinco em balança analítica e estas armazenadas em tubos de ensaio vedados com escaline e elástico para observação da emergência dos adultos. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência dos adultos e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos. A temperatura e a umidade relativa do ar local foram registradas por termohigrógrafo (Figura 1).

Para a análise bruta dos dados utilizou-se o programa Microsoft Excel e para as demais análises o programa STAT. A variação entre as médias de massa de larvas e as durações dos estágios de larva, pupa e total (neolarva a adulto) foram analisadas por meio do Teste t de Student ($\alpha=5\%$). As viabilidades foram comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

Quanto a massa individual média das larvas, não houve diferença significativa entre os três tratamentos: $p= 0,233$ (Controle x T1), $p= 0,599$ (Controle x T2), $p= 0,152$ (T1 x T2) (Tabela 1).

Quanto à duração média do estágio larval (dias), não houve diferença significativa entre os três tratamentos: $p= 0,116$ (Controle x T1), $p= 0,082$ (Controle x T2), $p= 0,631$ (T1 x T2) (Tabela 2).

Quanto à duração média do estágio pupal (dias), não houve diferença significativa entre o controle e o tratamento 1 ($p= 0,371$) e entre o tratamento 1 e o tratamento 2 ($p= 0,059$), porém houve diferença significativa entre o controle e o tratamento 2 ($p= 0,018$) (Tabela 2).

Quanto à duração total média (neolarva a adulto em dias), não houve diferença significativa entre os três tratamentos: $p= 0,174$ (Controle x T1), $p= 0,179$ (Controle x T2), $p= 0,101$ (T1 x T2) (Tabela 2).

O ritmo de abandono de larvas maduras da dieta, de pupariação e emergência dos adultos de *Chrysomya putoria*, nas dietas carne (controle), moela (T1) e dieta de homogenato de moela em agar (T2) está representada na Figura 2. As dietas testadas T1 e T2 foram semelhantes ao controle em relação ao ritmo de emergência (pico no 11º dia) e foram

semelhantes entre si em relação ao abandono de larvas e pupariação. Os picos de abandono e pupariação de *C. putoria* em carne ocorreram um dia após os das demais dietas.

O ritmo de emergência de machos e fêmeas foi muito semelhante nas três dietas (carne, moela e homogenato de moela em agar) (Figura 3).

As proporções e razões sexuais encontradas foram: controle (machos= 58%, fêmeas=42%, razão sexual=0,42), T1 (machos= 55%, fêmeas=45%, razão sexual=0,45) e T2 (machos= 56%, fêmeas=44%, razão sexual=0,44). Os testes qui-quadrado revelaram que as proporções sexuais encontradas nos três tratamentos não diferiram do esperado (Controle: $\chi^2=3,699$; T1: $\chi^2=1,271$; T2: $\chi^2=1,412$; χ^2 tabelado=3,84, gl=1, $\alpha=5\%$). Os três tratamentos apresentaram 100% de adultos normais.

As viabilidades de larvas, pupas e total do tratamento 2 (homogenato de moela em agar) diferiram significativamente do controle: larva (Controle x T1: $p=0,433$, Controle x T2: $p=0,039$, T1 x T2: $p=0,167$), pupa (Controle x T1: $p=0,373$, Controle x T2: $p=0,035$, T1 x T2: $p=0,149$) e total (Controle x T1: $p=0,428$, Controle x T2: $p=0,042$, T1 x T2: $p=0,202$). Porém não se observou diferença significativa entre os T1 e T2 (Tabela 3).

DISCUSSÃO

D'Almeida (1994) testou várias dietas para *C. putoria* e constatou que a carne moída e o peixe foram as dietas mais eficientes; Leal et al. (1982) relatou que *C. putoria* se desenvolveu melhor em carcaças de ratos quando comparado a dietas artificiais oligídicas, ressaltando ser a carne a dieta natural para esses califorídeos. Segundo Parra (2001), para uma dieta alternativa ser considerada eficiente esta deve não apenas possuir os aspectos nutricionais que supram as necessidades do inseto, mas também possuir as características físicas, químicas e microbiológicas que capacitem o processo alimentar. A massa média das larvas nas três dietas testadas não apresentou diferença significativa no presente estudo, o que pode indicar que as dietas alternativas (moela e homogenato de moela) mostraram-se eficientes, pois se equiparam a dieta natural (carne). Apesar disso, aparentemente, a dieta de homogenato de moela em agar foi mais facilmente solubilizada pelas larvas do que a carne e a moela. Porém isto não a tornou inadequada, pois as dietas pouco solúveis é que resultam em baixo peso da pupa pela dificuldade de digerir proteínas e outros elementos do meio (Chaudhury et al. 2000).

A duração dos estágios de desenvolvimento pós embrionário (larval, pupal e total) também foi equivalente nas três dietas, exceto na duração do estágio de pupa entre o controle (carne) e a dieta de homogenato de moela em agar. De acordo com D'Almeida et al. (2001), a avaliação das dietas deve ser feita considerando a duração do período de neolarvas a adultos, pois este seria o método mais eficiente pois evita as distorções entre os períodos larval e pupal. É possível com isso considerar que as dietas supriram as necessidades dos insetos, pois do contrário a alimentação destes é retardada ou até inibida quando há deficiência dos nutrientes essenciais (Chippendale 1978).

Em carcaças expostas de coelho, a duração média do desenvolvimento de *C. putoria* foi de 10 dias no verão de 2005, com temperatura média de 20°C, em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil (Kirst 2006), maior do que a duração encontrada no presente estudo que variou em média de oito a nove dias. Porém, como em ambos estudos as condições climáticas não foram controladas, é possível ter ocorrido oscilações durante os períodos de estudo. Segundo Higley & Haskell (2003) as oscilações de temperatura ditam a variação do tempo de desenvolvimento.

As taxas sexuais dos indivíduos criados nas três dietas testadas neste trabalho indicaram estabilidade na população conforme análise do qui-quadrado e segundo os preceitos

de Fisher (1930): somente quando a razão sexual for 1:1 haverá estabilidade na população; uma razão sexual com desvio não é evolutivamente estável, porque em gerações futuras ocorrerão aumentos graduais na proporção do sexo observado em menor número.

Considerando que se obteve 100% de dípteros normais, podemos considerar que a densidade de dípteros na dieta foi adequada ao desenvolvimento desses, pois esta influencia na determinação fenotípica de caracteres bionômicos e altera componentes determinantes do valor adaptativo dos organismos como já foi verificado por Ribeiro et al. (1993), Reis et al. (1994), Roper et al. (1996), Ribeiro (1998) em trabalhos com dípteros. Quando não há variações na simetria significa que não foram constituídos distúrbios suficientemente intensos, que não pudessem ser tamponados ou neutralizados com ajustes metabólicos capazes de garantir a estabilidade homeostática nos padrões de desenvolvimento (Lomonaco & Germanos, 2001).

Quanto a viabilidade de larva, sabe-se que algumas larvas se alimentam acima do mínimo necessário para a sobrevivência, outras apenas o mínimo, enquanto algumas não são capazes de atingir esse mínimo necessário para pupar e morrem (De Jong, 1976). Em nosso estudo, o controle e a moela obtiveram altas taxas de viabilidade de larva, pupa e total, enquanto que as da dieta de homogenato de moela em agar diferiram significativamente do controle apresentando menores viabilidades mesmo apresentando massas equivalentes as larvas das demais dietas. Larvas menores levam desvantagem na competição com as maiores, demorando mais para puparem e percorrendo distâncias maiores para tal ou para buscarem mais alimentos (Gomes et al. 2002). A taxa de viabilidade de larva na dieta de homogenato de moela foi de 73% (60g de dieta para 40 larvas = 1,5g de dieta por larva) e apresentou resultado semelhante ao trabalho de Godoy et al. (1996) utilizando a dieta artificial de Leal et al. (1982) de 73,25% na densidade de 50g de dieta para 100 larvas (0,5g de dieta por larva) e nas vinte demais densidades testadas com menor quantidade de dieta disponível para as larvas. Esta dieta de Leal et al. (1982) é muito utilizada por diversos autores (Estrada et al. 2009, Von Zuben 2000) e alcançar viabilidade semelhante significa um resultado satisfatório.

O uso da terapia larval exige conhecimentos a respeito do comportamento das larvas na presença de determinados medicamentos aos quais os pacientes que tem potencial para este tipo de tratamento podem estar fazendo uso, como antibióticos para evitar ou combater infecções. A dieta artificial testada possibilitaria a dissolução destes medicamentos a fim de observar potenciais reações dos dípteros à presença destes em seus substratos alimentares e ainda tem poucos ingredientes, uma vantagem quando se quer testar a influência de produtos químicos no desenvolvimento de insetos, pois quando adicionados a esta dieta o inseto sofrerá uma menor influência do meio. Da mesma forma, substâncias químicas como o uso de medicamentos também poderiam alterar o desenvolvimento de dípteros e trazer alterações em estimativas de intervalo pós-morte em estudos forenses. Torres (2005) destaca que experimentos tem sido realizados utilizando a adição de antimicrobianos nas dietas artificiais de larvas de insetos para prevenir a contaminação destas por microorganismos e para testar a ação desses fármacos no desenvolvimento e maturação das larvas.

A base agar utilizada em nossa dieta artificial já foi utilizada na criação de dietas para outros insetos, mas na sua maioria para insetos de importância agrícola (Panizzi & Parra 1991) e foi escolhida como componente pela sua densidade de gel firme em temperaturas próximas a 37°C (Insumos 2008), como tentativa de se assemelhar a consistência da carne. Além disso, o agar não é tóxico para a maioria dos microorganismos e humanos, não-absorvível, não-fermentável e possui em sua composição, principalmente, fibras e também sais minerais (P, Fe, K, Cl, I), celulose, anidrogactose e uma pequena quantidade de proteínas (Insumos 2008).

Dentre os autores que testaram dietas para califorídeos temos Paes & Milward-De-Azevedo (1998), Nespoli et al. (1998) e Paes et al. (2000) que examinaram o efeito de dietas naturais em diferentes estágios de decomposição sobre o período pós-embrionário dos dípteros e Cunha-e-Silva & Milward-de-Azevedo (1994), Leal et al. 1982, 1991; Von Zuben 1995; D'Almeida et al. 2000; Mendonça, 2009, que testaram dietas artificiais; estas dietas podem ser vantajosas pela possibilidade de maior uniformidade nutricional e biológica das colônias no decorrer do tempo (Parra 1990). A dieta testada a base de homogenato de moela em agar mostrou-se eficiente para este fim. Da mesma forma, dietas alternativas como a moela de frango também podem ser usadas devido seu menor custo em relação a carne facilitando o desenvolvimentos de projetos e pesquisas que exijam manutenção de grandes estoques de dípteros por longos períodos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, UNIRIO, FINEP e FAPERJ pelo suporte financeiro a este trabalho.

REFERÊNCIAS

- Aguiar-Coelho VM, Milward-De-Azevedo EMV. 1996. Relações intraespecíficas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Diptera) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira Entomologia* 41: 35-40.
- Barbosa LS, Jesus DML, Aguiar-Coelho VM. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociencias*. 6: 207-217.
- Barbosa LS, Couri MS, Aguiar-Coelho VM. 2008. Desenvolvimento de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae), utilizando diferentes densidades do parasitóide. *Biota Neotropica* 8: 1-6.
- Bruno TV, Guimarães JH, Santos AMM, Tucci EC. 1993. Moscas sinantrópicas (Diptera) e seus predadores que se criam em esterco de aves poedeiras confinadas, no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira Entomologia* 37: 577-590.
- Brusca RC, Brusca GJ. 2007. Invertebrados, 2th edition. Guanabara Koogan.
- Bubli AO, Imasheva AG, Loeschcke V. 1998. Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* 52, 619-625.
- Chaudhury MF, Alvarez LA, Velasquez LL. 2000. A new meatless diet for adult screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Economic Entomology* 93: 1398-1401.
- Chippendale GM, 1978. In: Parra JRP, editor. Técnicas de Criação de Insetos para Programas de Controle Biológico, pp. 125 ESALQ.
- Cunha-e-Silva SL, Milward-de-Azevedo EMV. 1994. Estudo comparado do desenvolvimento pós-embrionário de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) em duas dietas à base de carne, em laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 11: 659-668.
- D'Almeida JM. 1994. Substratos de criação de dípteros caliptrados (Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae) em condições naturais e de laboratório. Tese de doutorado. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 100 p.
- D'Almeida JM, Fraga MB, Ferro CL. 2000. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em dietas artificiais. *Entomologia and Vectores* 7: 155-162.

- D'Almeida JM, Ferro CL, Fraga MB. 2001. Desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) em dietas artificiais. *Acta Biologica Leopoldensia* 23: 25-30.
- De Jong G. 1976. A model of competition for food. I. Frequency dependent viabilities. *American Naturalist* 100: 1013-1027.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX. 2009. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotropical Entomology* 38: 203-207.
- Ferreira MJM. 1978. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Revista Brasileira de Biologia* 38: 445-454.
- Fisher RA. 1930. Seleção gênica. In: Futuyma DJ, editor. *Biologia Evolutiva*, pp. 631. Sociedade Brasileira de Genética.
- Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM, Ishihata GK. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15: 170-174.
- Gomes L, Von Zuben CJ, Govone JS. 2002. Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. *Entomology and Vectors* 9: 115-132.
- Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22: 53-60.
- Greenberg B. 1971. Flies and disease, vol. 1. Ecology, classification and biotic association. Princeton University Press.
- Greenberg, B. 1973. Flies and disease, vol. 2. Biology and disease transmission. Princeton University Press.
- Guimarães JH. 1984. Considerações gerais sobre moscas do gênero *Chrysomya* no Brasil. *Agroquímica Ciba Geigy* 24: 7-14.
- Higley LG, Haskell NH. 2003. Insect development na forensic entomology. In: Byrd JH, Castner JL, editors. *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations*, pp 389-406. CRC Press LLC.
- Insumos, Editora. 2008. Agar ou Agar-agar: o mais antigo ficocolóide. *Aditivos & Ingredientes* 56: 31-39. [http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf]
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Khazaeli AA, Fukvi HH, Curtsinger JW. 1993. Egg and larval densities and survival rates in an inbred line of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 72: 142-143.
- Kirst FD. 2006. Período de desenvolvimento de dípteros necrófagos em carcaça de coelho (*Oryctolagus cuniculus* L.) no extremo sul do Brasil. Monografia Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.
- Leal TTS, Prado AP, Antunes JÁ. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chlopyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 41- 44.
- Leal TTS, Antunes JA, Prado AP. 1991. Growth of *Chrysomya putoria* blowfly larvae in relation to dietary casein concentration. *Medical and Veterinary Entomology* 5: 139-141.
- Lomônaco C, Germanos E. 2001. Variações Fenotípicas em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em Resposta à Competição Larval por Alimento. *Neotropical Entomology* 30: 223-231.
- Marinho RC. 2007. Estudo da relação parasitóide *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) utilizando como hospedeiro *Chrysomya megacephala*

- (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em laboratório. Dissertação Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomology and Vectors* 10: 255-268.
- Mello RS, Aguiar-Coelho VM. 2009. Durations of immature stage development period of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. *Parasitology Research* 104: 411-418.
- Mendonça PM, Queiroz MMC, D'Almeida JM. 2009. Rearing *Chrysomya megacephala* on artificial diets composed of varying concentrations of albumin. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 421-426.
- Nespoli PEB, Queiroz MMC, Ribeiro RC, Milward-de-Azevedo EMV. 1998. Desenvolvimento pós-embriônico de duas populações de *Chrysomya albiceps* (Wiedmann) (Diptera, Calliphoridae) criadas em carne em diferentes estágios de decomposição. *Revista Brasileira de Entomologia*. 41: 133-136.
- Paes MJ, Milward-de-Azevedo EMV. 1998. Desenvolvimento pós-embriônico de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) criada em dietas naturais processadas em condições controladas. *Parasitologia al dia* 22: 90-96
- Paes MJ, Brito LG, Branco MC, Moya-Borja GE. 2000. Desenvolvimento pós-embriônico de *Lucilia cuprina* (Wied., 1830) (Diptera: Calliphoridae) criada em dieta a base de carne em diferentes estágios de putrefação. *Parasitologia al dia* 24: 102-108.
- Panizzi AR, Parra JRR. 1991. Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas. Manole.
- Parra JR. 2001. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 6th edition. ESALQ/FEALQ.
- Reis SF, Stangenhuis G, Godoy WAC, Von Zuben CJ, Ribeiro OB. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função da densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 38: 33-46.
- Ribeiro OB, PRADO AP, GUIMARÃES JH. 1993. Competição intra-específica em *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) em meio artificial. *Revista Brasileira de Entomologia* 37: 641-652.
- Ribeiro OB. 1998. Dynamics of equilibrium in experimental populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 42, 43-51.
- Roper C, PIGNATELLI P, PARTRIDGE L. 1996. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* life history to differences in larval density. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 609-622.
- Torres MLM. 2005. Efeito de quarto antibióticos sobre larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) utilizadas em bioterapia. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo.
- Von Zuben CJ, Stangenhuis G, Godoy WAC. 2000. Competição larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): efeitos de diferentes níveis de agregação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo. *Revista Brasileira de Biologia* 60: 195-203.
- Zumt F. 1965. Myiasis in man and animals in the old world. Butterworths.

Tabela 1: Massa de larvas (g)* de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) oriundas de três dietas diferentes criadas em temperatura ambiente (Temperatura Média: 20,6° C, Umidade Relativa do Ar média: 67,7%).

	Massa individual média (g)	Intervalo de Variação (g)	Desvio padrão
Controle (carne)	0,056 ^a	0,0408-0,0629	0,126
T1 (moela)	0,056 ^a	0,0371-0,0620	0,008
T2 (Homogenato de moela em agar)	0,052 ^a	0,0360-0,0642	0,009

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t ao nível de 5%.

Tabela 2: Duração média dos estágios de desenvolvimento pós-embriônico de larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) criadas em três dietas diferentes (carne, moela e homogenato de moela em agar) em temperatura ambiente*. (Temperatura Média: 20,6° C, Umidade Relativa do Ar média: 67,7%).

LARVAL				
	Dias	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle (carne)	4,050 ^a	0,068	4	7
T1 (moela)	4,406 ^a	0,271	4	7
T2 (homogenato de moela em agar)	4,495 ^a	0,291	4	7
PUPAL				
	Dias	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle (carne)	4,278 ^a	0,099	3	5
T1 (moela)	4,365 ^{ab}	0,218	2	6
T2 (homogenato de moela em agar)	4,696 ^b	0,105	2	6
TOTAL				
	Dias	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Controle (carne)	8,868 ^a	0,102	8	10
T1 (moela)	8,676 ^a	0,140	8	12
T2 (homogenato de moela em agar)	9,067 ^a	0,242	8	10

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

Tabela 3: Viabilidades dos estágios de larvas, pupas e total (de neolarvas a adulto) de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) criada em dietas carne, moela e homogenato de moela em agar* (Temperatura Média: 20,6° C, Umidade Relativa do Ar média: 67,7%).

Dietas	Viabilidade		
	Larval	Pupal	Total*
Controle (carne)	98% a	98% a	93% a
Tratamento 1 (moela)	92% ab	91% ab	83% ab
Tratamento 2 (Homogenato de moela em agar)	73% b	71% b	64% b

* Total = período de neolarvas a adultos

* Valores seguidos pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo ANOVA.

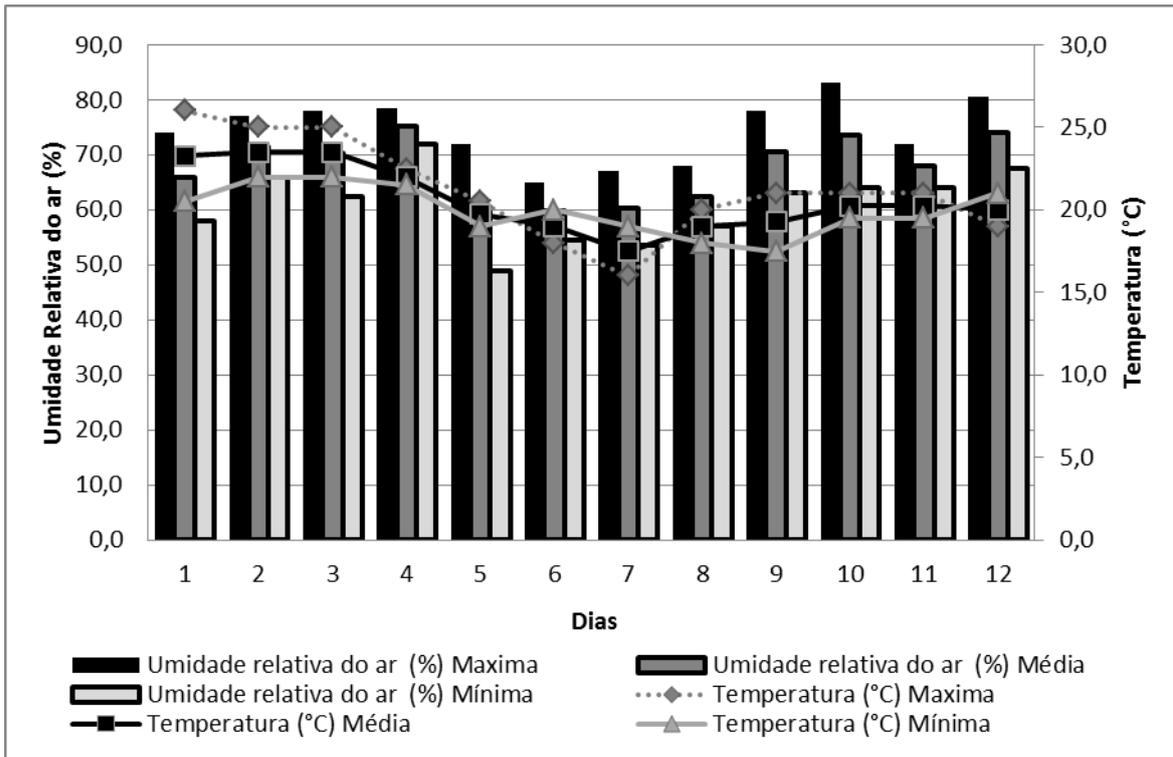


Figura 1: Variação de temperatura e umidade relativa do ar registradas no Laboratório de Estudo de Dípteros da UNIRIO durante a fase experimental.

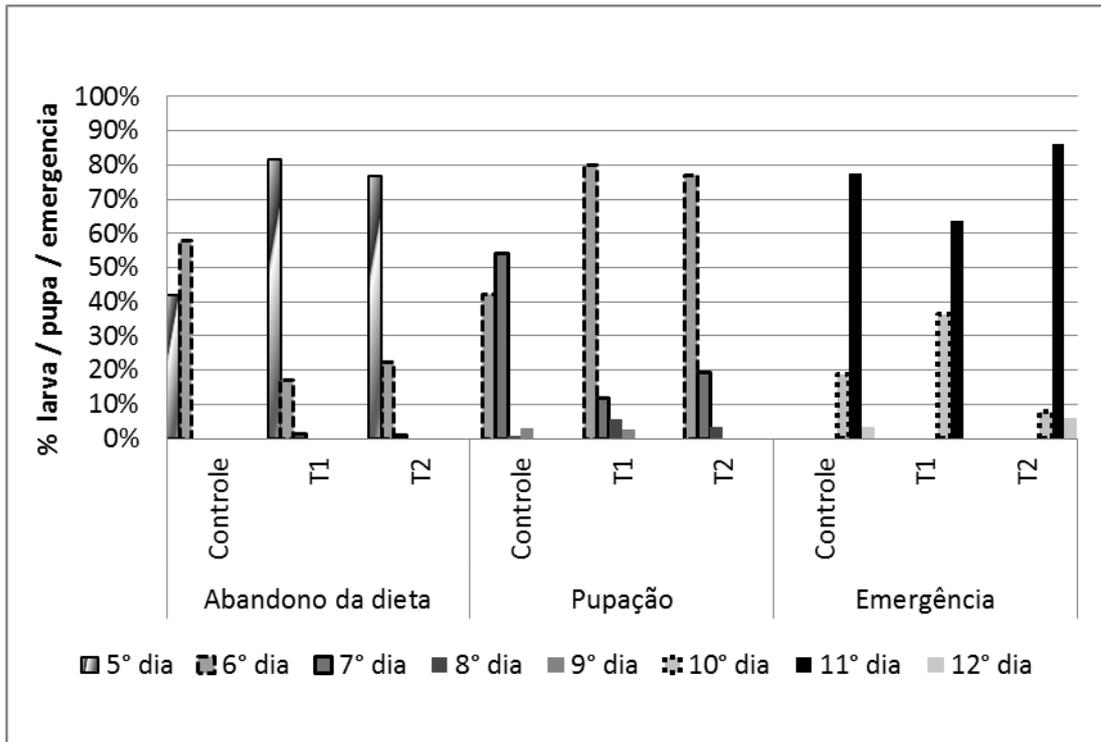


Figura 2: Ritmo de abandono de larvas maduras da dieta, pupariação e emergência dos adultos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830), pelos dias, em carne (controle), moela (T1) e dieta de homogenato de moela em agar (T2). (Temperatura Média: 20,6°C, Umidade Relativa do Ar média: 67,7%).

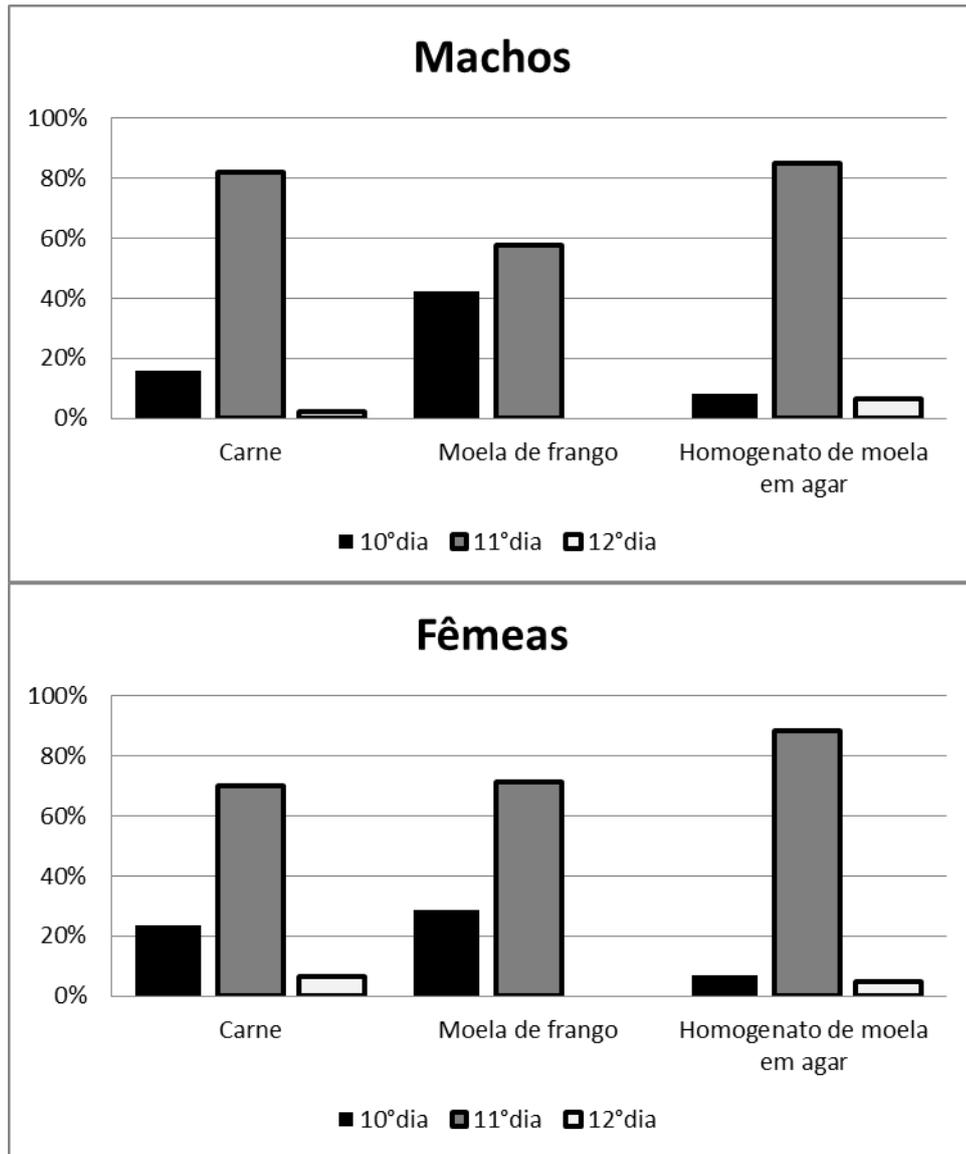


Figura 3: Ritmo de emergência de machos e fêmeas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830), criados em carne (controle), moela (T1) e dieta de homogenato de moela em agar (T2) (Temperatura Média: 20,6°C, Umidade Relativa do Ar média: 67,7%).

**CAPÍTULO III- AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ANTIBIÓTICO
CIPROFLOXACINO NO DESENVOLVIMENTO DA MOSCA
VAREJEIRA DO VELHO MUNDO *Chrysomya putoria***

Avaliação da influência do antibiótico ciprofloxacino no desenvolvimento da mosca varejeira do velho mundo *Chrysomya putoria*

RESUMO

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) é uma espécie com potencial para a prática da terapia larval, descrita também em miíases e ainda em estudos de entomologia forense. Avaliar a ação de diferentes concentrações do antibiótico ciprofloxacino sobre o crescimento e desenvolvimento desta espécie é o objetivo deste estudo. Larvas de primeiro ínstar da 3ª geração em 60 gramas de dieta de homogenato de moela em agar 65% receberam cloridrato de ciprofloxacino. Cada concentração do antibiótico testado (3,33 µg/mL; 6,66 µg/mL e 13,33 µg/mL) e o controle foram replicados quatro vezes (40 larvas/repetição). O controle recebeu água destilada invés do antibiótico. Cada béquer de cada repetição (100mL) foi inserido em outro béquer maior (400mL) contendo serragem e vedado com escaline e elástico. As larvas foram mantidas em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias. As larvas, após abandono da dieta, foram pesadas em lotes de cinco em balança analítica e armazenadas em tubos de ensaio vedados com escaline e elástico. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência dos adultos e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos. Para a análise utilizou-se Microsoft Excel e STAT. A variação entre as médias de massa de larvas e as durações dos estágios larvais, pupais e totais foram analisadas por Teste t de Student ($\alpha=5\%$); as viabilidades e as taxas de normalidade comparadas por ANOVA; a razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos quanto a massa individual média das larvas (T1:0,049g; T2:0,034g; T3:0,029g; T4:0,030 g), duração média da inoculação das larvas até o abandono (4,478; 4,138; 4,019; 4,000 dias) e dos estágios larval (5,477; 5,234; 5,000; 5,000 dias), pupal (3,874; 3,937; 2,986; 3,974 dias) e total (9,339; 9,158; 8,981; 8,953 dias), respectivamente para controle, T1, T2 e T3. As proporções sexuais encontradas nos quatro tratamentos não diferiram do esperado. As taxas de normalidade foram controle=100%, T1=96%, T2=98%, T3=99%. Apenas o tratamento 2 diferiu significativamente do controle nas viabilidades larval e total. O antibiótico pareceu não alterar o desenvolvimento de *C. putoria* no período pós-embriônico.

Palavras chave: moscas varejeiras, drogas, larvas, pupas.

INTRODUÇÃO

Os agentes antimicrobianos são medicamentos utilizados para eliminar diferentes gêneros de microorganismos. Dentre os diferentes gêneros de antimicrobianos existentes, destacam-se os de uso comum, como o norfloxacino, ciprofloxacino, nitrofurantoína ampicina e sulfametoxazol/trimetropina. O ciprofloxacino é um quimioterápico de amplo espectro utilizado para o tratamento de patologias causadas por microorganismos gram-positivos e gram-negativos sensíveis (DEF 2001; Korolkovas 2002; Martindale 2002), apropriado para o tratamento das infecções causadas por agentes patogênicos sensíveis ao fármaco: infecções das vias aéreas, otorrinolaringológicas, maxilofaciais, das vias urinárias e renais, do trato gastrointestinal (incluindo febre tifóide), das vias biliares, dos tecidos moles e feridas infectadas, ósseas e articulares, ginecológicas e obstétricas, septicemia, meninges (meningite), peritonite, infecções ou risco iminente de infecção (profilaxia) em doentes com imunossupressão (Quinoflox 2011)

Muitas feridas como as supracitadas podem ter como alternativa de tratamento o uso da terapia larval, também conhecida como terapia de desbridamento larval, bioterapia ou biocirurgia, consiste na aplicação de larvas vivas de moscas (Diptera: Calliphoridae) em ferimentos que não cicatrizam, com o objetivo de remover o material necrótico e promover o crescimento de novos tecidos. Seu uso e popularização têm aumentado em muitos países devido à grande eficácia das larvas em remover tecidos necrosados e a segurança e facilidade de aplicação (Sherman et al. 2000; Martini & Sherman 2003; Marcondes 2006; Dallavechia et al. 2010, 2011). *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1830) (Diptera: Calliphoridae) é facilmente obtida em todo território brasileiro, é de fácil criação e baixo custo, suas larvas se desenvolvem rapidamente, e seu comportamento e biologia são compatíveis ao uso em terapia larval (Marcondes 2006; Oliveira-Costa 2011). Quando é feita opção por esta técnica, é importante conhecer a ação sobre as larvas dos antibióticos usados de forma conjunta, pois estes podem influenciar suas atividades naturais e sobrevida.

Da mesma forma, os pacientes portadores de miíases muitas vezes fazem uso de antibioticoterapia em associação ao tratamento por apresentarem um quadro clínico insatisfatório, com outras enfermidades associadas e feridas na pele normalmente muito contaminadas (Ferraz et al. 2008, 2010), portanto o uso de antibióticos auxiliaria a cicatrização, fazendo-se necessário conhecer os efeitos destes antibióticos sobre as larvas.

A taxa de desenvolvimento dos insetos necrófagos pode ser afetada por substâncias introduzidas no seu organismo através da sua alimentação (Introna et al. 2001) e isso pode afetar estudos com estes insetos como os ligados a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) na entomologia forense, pois esta análise é baseada no período de desenvolvimento destes insetos (Estrada et al. 2009).

Chrysomya putoria é uma espécie com potencial para a prática da terapia larval e descrita também em miíases e ainda em estudos de entomologia forense. Avaliar a ação de diferentes concentrações dos antibióticos sobre o crescimento e desenvolvimento desta espécie é o objetivo deste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

A criação dos dípteros utilizados e toda a parte experimental foram realizadas no Laboratório de Estudos de Dípteros (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

A colônia de *C. putoria* foi iniciada com adultos coletados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro localizado dentro do parque da Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, RJ. Foram utilizadas três armadilhas seguindo o modelo de Mello et al. (2007), contendo sardinha como isca e expostas por aproximadamente 5 horas, na parte da manhã. Após a coleta dos adultos e das larvas de dípteros muscóides, os insetos foram levados para o LED, onde foi feita a triagem e a identificação taxonômica dos mesmos de acordo com Mello (2003). As moscas foram criadas em gaiolas de plástico transparente (40x30x20cm) com abertura na parte superior para arejamento e abertura frontal para permitir o acesso ao interior da gaiola revestida com tecido de náilon, sendo alimentadas com água, solução de mel e água (50%) e moela de frango ou carne bovina como fonte de proteínas, substrato de oviposição e maturação de ovários.

As larvas de primeiro ínstar da 3ª geração em laboratório foram transferidas com o uso de pincel fino para becheres de vidro de 100mL contendo 60 gramas de dieta de homogenato de moela em agar 65% (Ferraz et al. 2012) em cada um. A dieta foi selecionada por ser prática para homogeneizar substâncias a serem testadas e estéril (autoclavada), o que torna o antibiótico totalmente disponível para agir somente nas larvas inseridas. O antibiótico

utilizado foi Hifloxan[®] de 400 mg (Cloridrato de ciprofloxacino). Cada repetição recebeu 1mL do antibiótico em três diferentes concentrações resultando nas seguintes concentrações junto a dieta: 3,33 µg/mL; 6,66 µg/mL e 13,33 µg/mL. As concentrações foram escolhidas a partir da concentração sérica de ciprofloxacino (500mg via oral 12/12h: 2,97 µg /mL, 400mg intravenoso 12/12h: 4,56 µg /mL). A primeira concentração escolhida (T1) seria aproximadamente um valor entre as concentrações séricas oral e intravenosa; a segunda concentração (T2) seria aproximadamente o dobro da primeira; e a terceira concentração (T3) aproximadamente quatro vezes maior. Cada concentração do antibiótico testado e o controle foram replicados quatro vezes, sendo 40 larvas para cada repetição. O controle recebeu água destilada no lugar do antibiótico.

Cada béquer de cada repetição foi inserido em outro béquer maior (400mL) contendo serragem esterilizada para permitir a pupariação das larvas quando maduras após o abandono da dieta e vedado com tecido de náilon e elástico. As larvas foram mantidas em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias sempre no mesmo horário (12h).

As larvas, após abandono da dieta, foram pesadas em lotes de cinco em balança analítica e armazenadas em tubos de ensaio vedados com tecido de náilon e elástico para observação da emergência dos adultos. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência dos adultos e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos.

Para a análise bruta dos dados utilizou-se o programa Microsoft Excel e para as demais análises o programa PAST. A variação entre as médias de massa de larvas e as durações dos estágios larvais, pupais e totais (neolarvas a adultos) foram analisadas por meio do Teste t de Student ($\alpha=5\%$). As viabilidades e as taxas de normalidade foram comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

Quanto a massa individual média das larvas, não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos (Tabela 1). Quanto à duração média da inoculação das larvas até o abandono e dos estágios larval, pupal e total (dias), não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos (Tabela 2).

O ritmo de abandono das larvas da dieta, de pupariação e de emergência (%) de *C. putoria*, nos quatro tratamentos diferentes (Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 3,33%; T2= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 6,66%, T3= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 13,33%) está representada na Figura 1. O pico de abandono da dieta no controle foi no 4° e 5° dias, enquanto nos tratamentos com antibiótico foi predominantemente no 4° dia. O pico de pupariação do controle foi no 5° e 6° dias, enquanto que nos demais no 5° dia. Já o pico de emergência em todos os tratamentos ocorreu no 9° dia.

A taxa de emergência de machos e fêmeas de *C. putoria* pelos dias foi semelhante (Figura 2). As proporções sexuais encontradas foram: controle (machos=47%, fêmeas=53%), T1 (machos=55%, fêmeas=45%), T2 (machos=50%, fêmeas=50%) e T3 (machos=44%, fêmeas=56%). Os testes qui-quadrado revelaram que as razões sexuais encontradas nos quatro tratamentos não diferiram do esperado (Controle: $\chi^2=0,398$; T1: $\chi^2=0,909$; T2: $\chi^2=0,009$; T3: $\chi^2=1,923$; χ^2 tabelado=3,84, gl=1, $\alpha=5\%$).

Apenas o controle apresentou 100% de adultos normais (T1=96%, T2=98%, T3=99%). Porém não houve diferença significativa estatisticamente entre os tratamentos (Controle x T1 ($p=0,192$), Controle x T2 ($p=0,073$), Controle x T3 ($p=0,356$), T1 x T2

($p=0,408$), T1 x T3 ($p=0,249$), T2 x T3 ($p=0,463$)). Quanto as viabilidades larval, pupal e total, apenas o tratamento 2 diferiu significativamente do controle nas viabilidades larval e total (Tabela 3).

DISCUSSÃO

A necessidade de testarmos diferentes concentrações do mesmo antibiótico é devido a um mesmo antimicrobiano adicionado a dietas poder ser seguro, inibitório ou altamente prejudicial dependendo da concentração utilizada (Singh & House 1970). Foi utilizada uma quantidade de dieta nas quatro repetições que proporcionasse mais de 1g de dieta por larva, pois esta foi verificada por Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo (1996) como a densidade ideal relativa ao emprego de carne em diferentes califorídeos. Esse foi um cuidado para que a densidade não atrapalhasse a avaliação da eficiência destas dietas causando estresse por competição explorativa por recursos ou por alterações químicas no substrato alimentar decorrentes do metabolismo larval (Khazaeli et al. 1993; Bublil et al. 1998). Considerando que foi obtido 100% de dípteros normais no controle e outros valores nos demais tratamentos que não diferiram significativamente do controle, podemos considerar que a densidade de dípteros na dieta foi adequada ao desenvolvimento desses e podemos também supor que o antibiótico ciprofloxacino também não afetou o fenótipo. A densidade influencia na determinação fenotípica de caracteres bionômicos e altera componentes determinantes do valor adaptativo dos organismos como já foi verificado por Ribeiro et al. (1993), Reis et al. (1994), Roper et al. (1996), Ribeiro (1998) em trabalhos usando dípteros. Quando não há variações na simetria significa que não foram constituídos distúrbios suficientemente intensos, que não pudessem ser tamponados ou neutralizados com ajustes metabólicos capazes de garantir a estabilidade homeostática nos padrões de desenvolvimento (Lomonaco & Germanos 2001).

Apesar de não-significativo, os tratamentos com antibiótico apresentaram intervalos de variação do massa individual com valores mínimos (Controle>T1>T2>T3) e valores máximos (Controle>T1>T3>T2) menores que do controle. Esses valores também foram menores que os encontrados por Ferraz et al. (2012) que utilizou carne, moela e a dieta homogenato de moela em agar para criação de *C. putoria*. A duração total do desenvolvimento foi menor nos tratamentos com antibiótico (Controle>T1>T2>T3) e a de todos tratamentos menores comparados ao encontrado por Ferraz et al. (2011) que utilizou carne e ração pastosa para cães para criação de *C. putoria*. Apenas a duração do estagio larval teve maior duração no presente experimento. Isto é muito compreensível já que carne é a dieta natural desta espécie (Leal et al. 1982).

Em estudo com *Cochliomyia macellaria* (F.) (Diptera: Calliphoridae), foi realizada comparação do seu desenvolvimento em meio estéril ou com bactérias e foi observado que estas sobrevivem no meio estéril com uma taxa de desenvolvimento mais curta e maior sobrevivência do que no meio com bactérias (Ahmad et al. 2006). No presente estudo, o ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emergência tendeu a ser mais precoce nos tratamentos com antibiótico comparado ao do controle. Como as larvas utilizadas nesse experimento não eram estéreis, provavelmente levaram bactérias aos meios, que podem ter sido neutralizados nos meios com antibiótico, mas não no controle.

O principal período de limitação de recursos alimentares em Calliphoridae ocorre no período larval, no qual as larvas ingerem o máximo de alimento no menor intervalo de tempo (Goodbrod & Goff 1990). Um maior tempo alimentando-se também pode ocorrer para compensar a baixa qualidade nutricional do alimento (Kamal 1958; Levot et al. 1979; Paes et al. 2000). No presente estudo, quanto menor o tempo que o inseto ficou na dieta (abandono) menor foi sua massa (Controle>T1>T2>T3).

As taxas sexuais dos indivíduos nos quatro tratamentos diferentes deste trabalho indicaram estabilidade na população conforme análise do qui-quadrado e segundo os preceitos de Fisher (1930): somente quando a razão sexual for 1:1 haverá estabilidade na população; uma razão sexual com desvio não é evolutivamente estável, porque em gerações futuras ocorrerão aumentos graduais na proporção do sexo observado em menor número.

O antibiótico ciprofloxacino não alterou a massa média larval de *C. putoria*, nem alterou a duração dos estágios pós-embrionários, assim como a razão sexual destes dípteros. Alguns estudos sobre o efeito de outras substâncias no desenvolvimento larval de *C. putoria* já foram realizados e obtiveram resultados diferentes. Carvalho (2004) estudou o efeito da cocaína expondo fígados contendo a substância para alimentação de *C. putoria* e notou que as larvas de *C. putoria* expostas à droga se desenvolveram significativamente mais rápido em relação ao controle. Também foi constatado que as larvas expostas ao fígado contendo cocaína iniciaram e terminaram o processo de pupariação antes que as do controle, assim como a emergência.

Outra substância que acelerou o desenvolvimento larval de *C. putoria* foi o diazepam, além de larvas mais pesadas que as do controle (Carvalho et al. 2001). O anfetamínico anfepramona também acelerou o desenvolvimento de *C. putoria* em aproximadamente 48 h (Carvalho 2004). Já o analgésico escopolamina retardou o desenvolvimento de grupos com maior concentração (Grella et al. 2007) e a anfetamina aumentou o período de pupa de *C. putoria* (Nitsche 2010)

No presente estudo, o ciprofloxacino apenas alterou a viabilidade larval e total do tratamento 2 de forma significativa estatisticamente. As viabilidades do T2 foram maiores, porém as dos outros tratamentos também foram elevadas. Em dípteros, viabilidades acima de 60% são consideradas promissoras (Loureiro et al. 2005). Há ainda a possibilidade das larvas não terem metabolizado a droga assim como relatado por Grella & Thyssen (2008) em estudo com imaturos de *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*, criados em dieta artificial acrescida de cloridrato de oxycodone, onde não observaram diferenças significativas no desenvolvimento entre os grupos controle e os grupos experimentais.

É fato que insetos absorvem substâncias utilizadas por humanos, inclusive foram detectadas toxinas e substâncias controladas tanto no inseto como nos restos quitinizados recolhidos de vítimas em estágio avançado de decomposição (Goff & Lord 2001). Com isso o estudo dos efeitos que drogas e toxinas exercem no desenvolvimento larval é necessário pois a aceleração ou retardamento nesta taxa pode interferir na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) quando baseada na biologia desses insetos (Goff et al. 1992, Carvalho et al. 2001, Grella & Thyssen 2008). Em Campinas, entre 1993 e 1998, *C. putoria* mostrou-se entre as mais freqüentes no Instituto Médico Legal (IML) e em coletas de campo, sendo inclusive considerada como indicador forense para a área (Carvalho et al. 2000).

Sherman et al. (1995) realizou um experimento a respeito da ação de sete antibióticos sobre o crescimento e desenvolvimento das larvas e pupas de *Lucilia sericata*, utilizadas em terapia larval, sendo estes pertencentes às classes das penicilinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos. Estes foram adicionados em meio agar-fígado em várias concentrações, onde foram colocadas as larvas de um dia e observados os resultados em relação a maturação das mesmas, número de pupas e adultos, duração de cada estágio e peso das pupas. Os autores concluíram que não foi observada interferência sobre o crescimento larval nem sua maturação, resultado muito semelhante ao nosso estudo. Larvas de *C. putoria* já foram utilizadas para terapia larval em ratos *Wistar* e obteve-se sucesso, não sendo realizado o uso dessas larvas em humanos no Brasil por falta de estudos.

Portanto, estudos como este auxiliarão nos usos de *C. putoria* em entomologia forense, terapia larval e na clínica de miasas.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FINEP, UNIRIO e FAPERJ pelo suporte financeiro a este trabalho.

REFERENCIAS

- Aguiar-Coelho VM, Milward-de-Azevedo EMV. 1996. Relações intraespecíficas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Diptera) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira Entomologia* 41: 35-40.
- Ahmad A, Broce A, Zurek L. 2006. Evaluation of significance of bacteria in larval development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 43(6):1129-1133.
- Bubli AO, Imasheva AG, Loeschke V. 1998. Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* 52: 619-625.
- Carvalho, LML, Thyssen PJ, Linhares AX, Palhares FB. 2000. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (1): 135-138.
- Carvalho LML, Linhares AX, Trigo JR. 2001. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Science International* 120: 140-144.
- Carvalho, LML. 2004. Detecção e efeito de drogas no desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), duas moscas varejeiras de interesse forense. *Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Parasitologia*.
- Dallavecchia DL, Proença BN, Coelho VMA. 2011. Bioterapia: uma alternativa eficiente para o tratamento de lesões cutâneas. *Revista de pesquisa: cuidado é fundamental online* 3(3): 2071-79.
- Dallavecchia, DL, Silva Filho RG, Figueiredo, NMA, Aguiar-Coelho VM. 2010. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. *Revista de pesquisa: cuidado é fundamental online* 2 (Ed. Supl.): 1-4.
- DEF 2001/2002: *Dicionário de especialidades farmacêuticas*, 30ª edição. Publicações Científicas.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207
- Ferraz ACP, Bosisio DD, Aguiar-Coelho VM. 2011. Dieta para larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *EntomoBrasilis* 4 (3): 125-129
- Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP; Silva Filho, RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science*, in prelo.
- Ferraz ACP, Proença B, Gadelha BQ, Faria LM, Barbalho MGM, Aguiar-Coelho VM, Lessa CSS. 2010. First Record of Human Myiasis Caused by Association of the Species *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* (Diptera:

- Sarcophagidae), and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) *Journal of Medical Entomology* 47(3):487-490.
- Ferraz, ACP, Nunes RV, Gadelha BQ, Nascimento BP, Barros PREM, Coelho VMA, Lessa CSS. 2008. Raro caso de míases por *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) e *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae) em paciente humano. *Arquivo Ciências da Saúde* 15: 142–144.
- Ferreira MJM. 1978. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Revista brasileira de Biologia* 38 (2): 445-454.
- Fisher RA. 1930. Seleção gênica. In: Futuyma DJ, editor. *Biologia Evolutiva*, pp. 631. Sociedade Brasileira de Genética.
- Goff ML, Lord WD. 2001. Entomotoxicology: Insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development In: Byrd JH, Castner JL, editors. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, pp 331–340. CRC.
- Goff ML, Brown WA, Omori AI. 1992. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. *Journal of Forensic Sciences* 37(3):867-872.
- Grella MD, Thyssen PJ. 2008. Qualitative analysis of the effect of oxycodone (opioid analgesic) on the development rate of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and its importance for estimating of the post-mortem interval in Brazil. Annals of XXIII International Congress of Entomology, Durban, Africa.
- Grella MD, Estrada DA, Thyssen P J. 2007. Scopolamine effect on the development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) and its importance for the post mortem interval estimate. *Entomologia mexicana* 6: 870-873.
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Korolkovas A. 2002. *Dicionário terapêutico Guanabara 2002/2003*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.18.31-18.32.
- Khazaeli AA, Fukvi HH, Curtsinger JW. 1993. Egg and larval densities and survival rates in an inbred line of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 72: 142-143.
- Leal TTS, Prado AP, Antunes JA. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 41- 44.
- Lomônaco C, Germanos E. 2001. Variações Fenotípicas em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em Resposta à Competição Larval por Alimento. *Neotropical Entomology* 30: 223-231.
- Loureiro MS, Oliveira VC, D'almeida JM. 2005. Desenvolvimento pós-embrionário de *Pattonella intermutans* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae) em diferentes dietas. *Revista Brasileira de entomologia* 49 (1): 127-129
- Marcondes CB. 2006. *Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças*. Florianópolis, Ed. UFSC, 88p.
- Martindale, 2002. Martindale: the complete drug reference. 33. ed. Grayslake: Pharmaceutical Press, 2002. p. 123.
- Martini RK, Sherman RA. 2003. Terapia de Desbridamento com larvas. *Jornal Brasileiro de Medicina* 85(4): 82-85.
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomología y Vectores* 10 (2): 255-268.

- Mello RS, Queiroz MMC, Aguiar-Coelho, VM. 2007. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia Série Zoologia* 97(4): 481-485.
- Nitsche MJT. 2010. Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar*. Tese Apresentada Ao Instituto De Biociências, Campus De Botucatu, Unesp, Botucatu – Sp.
- Quinoflox: cloridrato de ciprofloxacino. São Paulo: Biolab Sanus, 2011. Bula de remédio. (<http://www.bulas.med.br/bula/3433/quinoflox.htm>)
- Reis SF, Stangenhans G, Godoy WAC, Von Zuben CJ, Ribeiro OB. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função da densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 38: 33-46.
- Ribeiro OB, Prado AP, Guimarães JH. 1993. Competição intra-específica em *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1983) (Diptera, Calliphoridae) em meio artificial. *Revista Brasileira de Entomologia* 37: 641-652.
- Ribeiro OB. 1998. Dynamics of equilibrium in experimental populations of *Cochliomya macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 42: 43-51.
- Roper C, Pignatelli P, Partridge L. 1996. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* life history to differences in larval density. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 609-622.
- Sherman RA, Hall MJR, Thomas S. 2000. Medicinal Maggots: An Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. *Annual Review of Entomology* 45: 55-81.
- Sherman RA, Wyle FA, Thrupp L. 1995. Effects of Seven Antibiotics on the Growth and Development of *Phaenicia sericata* (Diptera: Calliphoridae) Larvae. *Journal of Medical Entomology* 32(5): 646-649.
- Singh P, House HL. 1970. Antimicrobials: 'Safe' levels in a synthetic diet of an insect, *Agria Affinis*. *Journal of Insect Physiology* 16: 1769-1782.

Tabela 1: Massa de larvas (g)* de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) oriundas de quatro tratamentos** com diferentes concentrações de ciprofloxacino criadas em câmara climatizada (30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo).

Tratamento	Massa individual média (g) ± Desvio padrão	Intervalo de variação	<i>p</i> = valor de significância (teste t)			
			Controle	T1	T2	T3
Controle	0,049a±0,007	0,035-0,059	-	0,231	0,182	0,371
T1	0,034a±0,021	0,011-0,058	0,231	-	0,793	0,710
T2	0,029a±0,024	0,007-0,053	0,182	0,793	-	0,544
T3	0,039a±0,018	0,006-0,054	0,371	0,710	0,544	-

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t ($\alpha=5\%$).

** Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 3,33%; T2= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 6,66%, T3= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 13,33%

Tabela 2: Duração média dos estágios de desenvolvimento pós-embriônico* (dias) de larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) oriundas de quatro tratamentos** com diferentes concentrações de ciprofloxacino criadas em câmara climatizada (30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo)

		Dias	Desvio Padrão	<i>p</i> = valor de significância (teste t)			
				Controle	T1	T2	T3
Duração até abandono	Controle	4,478a	0,517	-	0,264	0,127	0,117
	T1	4,138a	0,192	0,264	-	0,266	0,230
	T2	4,019a	0,038	0,127	0,266	-	0,679
	T3	4,000a	0,081	0,230	0,117	0,679	-
Estágio larval	Controle	5,477a	0,516	-	0,419	0,114	0,117
	T1	5,234a	0,223	0,419	-	0,081	0,095
	T2	5,000a	0	0,114	0,081	-	0,985
	T3	5,000a	0,081	0,117	0,095	0,985	-
Estágio pupal	Controle	3,874a	0,214	-	0,588	0,353	0,393
	T1	3,937a	0,055	0,588	-	0,161	0,340
	T2	2,986a	0,016	0,353	0,161	-	0,790
	T3	3,974a	0,048	0,393	0,340	0,790	-
Duração total	Controle	9,339a	0,322	-	0,367	0,068	0,054
	T1	9,158a	0,186	0,367	-	0,108	0,073
	T2	8,981a	0,016	0,068	0,108	-	0,158
	T3	8,953a	0,033	0,054	0,073	0,158	-

* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t ($\alpha=5\%$).

** Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 3,33%; T2= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 6,66%, T3= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 13,33%

Tabela 3: Comparação por ANOVA das viabilidades dos estágios larval, pupal e total (de neolarvas a adulto) de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) criada em quatro tratamentos: controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 3,33%; T2= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 6,66%, T3= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 13,33%

		Viabilidade	<i>p</i> = valor de significância (ANOVA)			
			Controle	T1	T2	T3
Larval	Controle	81,88%,	-	0,643	0,007	0,733
	T1	78,13%,	0,643	-	0,831	0,965
	T2	96,67%	0,007	0,831	-	0,859
	T3	77,50%	0,733	0,965	0,859	-
Pupal	Controle	93,60%	-	0,456	0,579	0,806
	T1	85,44%	0,456	-	0,333	0,571
	T2	95,65%	0,579	0,333	-	0,512
	T3	92,01%	0,806	0,571	0,512	-
Total	Controle	76,88%	-	0,562	0,034	0,807
	T1	68,75%	0,562	-	0,108	0,820
	T2	92,5%	0,034	0,108	-	0,217
	T3	73,13%	0,807	0,820	0,217	-

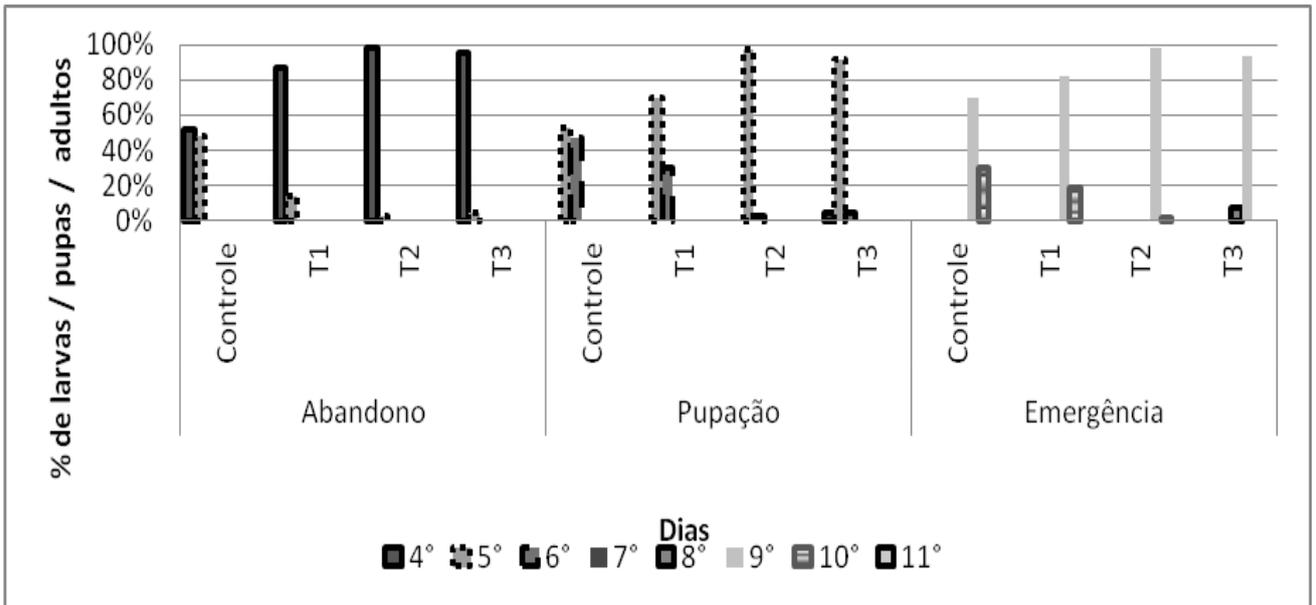


Figura 1 – Ritmo de abandono das larvas da dieta, de pupariação e de emergência (%) de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) em quatro tratamentos: controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 3,33%; T2= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 6,66%, T3= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 13,33%

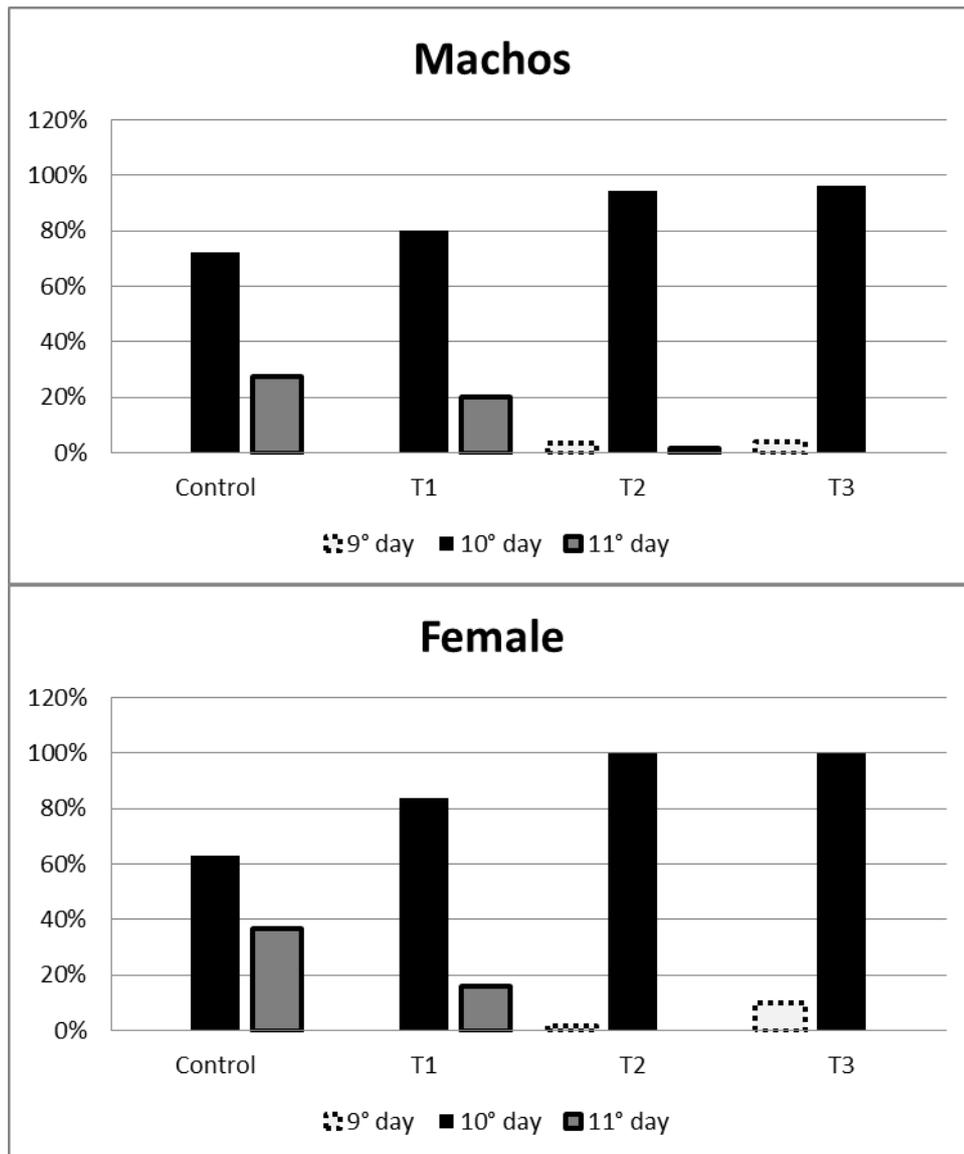


Figura 2 – Taxa de emergência, em dias, de machos e fêmeas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1830) criados em quatro tratamentos: controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 3,33%; T2= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 6,66%, T3= homogenato de moela em agar + ciprofloxacino 13,33%

**CAPÍTULO IV – EFEITO DO ANTIBIÓTICO GENTAMICINA NO
DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Chrysomya putoria*
(WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

Efeito do antibiótico gentamicina no desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae)

RESUMO

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) é uma espécie com potencial para a prática da terapia larval, descrita também em míases e ainda em estudos de entomologia forense. Avaliar a ação de diferentes concentrações do antibiótico gentamicina sobre o crescimento e desenvolvimento desta espécie é o objetivo deste estudo. Larvas de primeiro ínstar da 3ª geração em 60 gramas de dieta de homogenato de moela em agar 65% receberam sulfato de gentamicina. Cada concentração do antibiótico testado (4,44µg/mL; 13,33µg/mL e 66,66µg/mL) e o controle foram replicados quatro vezes (40 larvas/repetição). O controle recebeu água destilada invés do antibiótico. Cada béquer de cada repetição (100mL) foi inserido em outro béquer maior (400mL) contendo serragem esterilizada e vedado com escaline e elástico. As larvas foram mantidas em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias. A massa corporal das larvas maduras, após abandono da dieta, foram registradas em lotes de cinco em balança analítica e armazenadas em tubos de ensaio vedados com tecido de nailon e elástico. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência dos adultos e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos. Para a análise utilizou-se Microsoft Excel e STAT. A variação entre as médias da massa corporal de larvas e as durações dos estágios larval, pupal e total foram analisadas por Teste t de Student ($\alpha=5\%$); as viabilidades e as taxas de normalidade comparadas por ANOVA; a razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos quanto a massa individual média (gramas) das larvas (Controle: 0,049; T1: 0,053; T2: 0,054; T3: 0,053), duração média da inoculação das larvas até o abandono (4,478; 4,114; 4,225; 4,989 dias) e dos estágios larval (5,477; 5,270; 5,275; 5,845 dias), pupal (3,874; 3,610; 4,057; 3,741 dias) e total (9,339; 8,785; 9,323; 9,642 dias), respectivamente para controle, T1, T2 e T3. As proporções sexuais encontradas nos quatro tratamentos não diferiram do esperado. As taxas de normalidade foram de 100% em todos os tratamentos. Apenas o tratamento 2 diferiu significativamente do controle nas viabilidades larval. O antibiótico pareceu não alterar o desenvolvimento de *C. putoria* no período pós-embriônico.

INTRODUÇÃO

Corpos de animais em decomposição atraem uma grande variedade de organismos, dos quais os artrópodes constituem fauna dominante, utilizando este micro-habitat temporário para se alimentar, viver e procriar (Von Zuben, 2001). Por esta razão e também por serem geralmente os primeiros a encontrar o corpo em decomposição os insetos podem ser utilizados nas investigações criminais, auxiliando dentre outras formas na estimativa de intervalo pós-morte (IPM) (Catts & Goff, 1992). Para isto é necessário conhecer o tempo de desenvolvimento das espécies, a sucessão de insetos que colonizam cadáveres (Carvalho et al, 2004) e a dispersão larval pós-alimentar (Von Zuben, 2001).

A taxa de desenvolvimento dos insetos necrófagos pode ser afetada por substâncias introduzidas no seu organismo através da sua alimentação (Introna et al. 2001) e isso pode afetar estudos como o IPM (Estrada et al. 2009). Desta forma é importante analisar que tipo de influência determinada substância faz sobre cada espécie.

Antibióticos são substâncias que têm capacidade de interagir com microrganismos que causam infecções no organismo. Eles matam ou inibem o metabolismo e/ou reprodução dos microrganismos permitindo ao sistema imunológico combatê-los com maior eficácia. A

gentamicina é um antibiótico aminoglicosídeo bactericida que atua inibindo a síntese proteica bacteriana. É ativa contra ampla variedade de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Estudos clínicos têm demonstrado a eficácia de sulfato de gentamicina injetável em: bacteremia, septicemia, infecções graves do sistema nervoso central, infecções dos rins e do aparelho geniturinário, infecções respiratórias, infecções gastrintestinais, infecções da pele, ossos, tecidos moles (incluindo feridas infectadas), infecções intra-abdominais (incluindo peritonite) e infecções oculares (Gentamicina 2011).

Analisar as conseqüências da ingestão do antibiótico gentamicina no desenvolvimento pós embrionário de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) é o objetivo deste estudo. *C. putoria* é uma espécie de ampla distribuição, inclusive ambientes florestais (Ferraz et al. 2010) e importância forense e médico-sanitária por frequentar matéria orgânica em decomposição, veicular microrganismos patogênicos e causar miíases em animais e no homem (Zumpt 1965; Guimarães et al. 1978, Baumgartner & Greenberg 1984, Ferraz et al. 2011a).

MATERIAL E MÉTODOS

A criação dos dípteros utilizados e toda a parte experimental foram realizadas no Laboratório de Estudos de Dípteros (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

A colônia de *C. putoria* foi iniciada com adultos coletados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro localizado dentro do parque da Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, RJ. Foram utilizadas três armadilhas seguindo o modelo de Mello et al. (2007), contendo sardinha como isca e expostas por aproximadamente 5 horas, na parte da manhã. Após a coleta dos adultos e das larvas de dípteros muscóides, os insetos foram levados para o LED, onde foi feita a triagem e a identificação taxonômica dos mesmos de acordo com Mello (2003). As moscas foram criadas em gaiolas de plástico transparente (40x30x20cm) com abertura na parte superior para arejamento e abertura frontal para permitir o acesso ao interior da gaiola revestida com tecido escaline, sendo alimentadas com água, solução de mel e água (50 %) e moela de frango ou carne bovina como fonte de proteínas, substrato de oviposição e maturação de ovários. A metodologia de criação seguiu descrição de Barbosa et al. (2004) e Ferraz et al. (2011b).

As larvas de primeiro ínstar da 3ª geração em laboratório foram transferidas com o uso de pincel fino para becheres de vidro de 100mL contendo 60 gramas de dieta de homogenato de moela em agar 65% (Ferraz et al. 2012) em cada um. A dieta foi selecionada por ser prática para homogeneizar substâncias a serem testadas e estéril (autoclavada), o que torna o antibiótico totalmente disponível para agir somente nas larvas inseridas. O antibiótico utilizado foi Hytamicina[®] de 40 mg (Sulfato de gentamicina). Cada repetição recebeu 1mL do antibiótico em três diferentes concentrações resultando nas seguintes concentrações junto a dieta: 4,44µg/mL; 13,33µg/mL e 66,66µg/mL. As concentrações foram escolhidas a partir da concentração sérica de gentamicina (2-3 doses diárias intravenosas ou intramusculares; concentração máxima 30 minutos/1 hora após a administração: 4 a 6 mcg/ml. Evitar concentrações acima de 12 mcg/ml por períodos prolongados) (Gentamicina, 2011). A primeira concentração escolhida (T1) seria próxima a concentração sérica intravenosa; a segunda concentração (T2) seria próxima a concentração sérica intravenosa máxima; e a terceira concentração (T3) aproximadamente cinco vezes maior a concentração sérica intravenosa máxima. Cada concentração do antibiótico testado e o controle foram replicados quatro vezes, sendo 40 larvas para cada repetição. O controle recebeu água destilada no lugar do antibiótico.

Cada béquer de cada repetição foi inserido em outro béquer maior (400 mL) contendo serragem esterilizada para permitir a pupariação das larvas quando maduras após o abandono da dieta e vedado com escaline e elástico. As larvas foram mantidas em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias sempre no mesmo horário (12h).

A massa corporal das larvas, após abandono da dieta, foram registradas em lotes de cinco em balança analítica e armazenadas em tubos de ensaio vedados com tecido de nylon e elástico para observação da emergência. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos.

Para a análise bruta dos dados utilizou-se o programa Microsoft Excel e para as demais análises o programa PAST. A variação entre as médias da massa corporal de larvas e as durações dos estágios larvais, pupais e totais (neolarvas a adultos) foram analisadas por meio do Teste t de Student ($\alpha=5\%$). As viabilidades e as taxas de normalidade foram comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

Quanto a massa corporal individual média das larvas, não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos (Tabela 1). Quanto à duração média da inoculação das larvas até o abandono e dos estágios larval, pupal e total (dias), não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos (Tabela 2).

O ritmo de abandono das larvas da dieta, de pupariação e de emergência (%) de *C. putoria*, nos quatro tratamentos diferentes (Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + gentamicina 3,33 µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + gentamicina 13,33 µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + gentamicina 66,66 µg/mL) está representada na Figura 1. O pico de abandono de larvas maduras da dieta no controle foi no 5° e 6° dias, enquanto nos tratamentos com antibiótico foi predominantemente no 5° dia, sendo que o T3 foi o único tratamento que o abandono larval se estendeu até o 7° dia. O pico de pupariação do controle foi no 6° e 7° dias, enquanto que nos demais no 6° dia, se estendendo até o 8° dia no T3. Já o pico de emergência em todos os tratamentos ocorreu no 10° dia, sendo que apenas nos tratamentos T1 e T3 a emergência se estendeu até o 12° dia.

A taxa de emergência de machos e fêmeas de *Chrysomya putoria* foi semelhante no controle e T3 (Figura 2). No T1, machos emergiram primeiro (a partir do 9° dia) e a emergência se estendeu até o 12° dia; já as fêmeas emergiram no 10° e 11° dias. No T2, enquanto as fêmeas emergiram todas no 10° dia, os machos estenderam a emergência do 10° ao 11° dia. As proporções sexuais encontradas foram: controle (machos=47%, fêmeas=53%), T1 (machos=48%, fêmeas=52%), T2 (machos=50%, fêmeas=50%) e T3 (machos=51%, fêmeas=49%). Os testes qui-quadrado revelaram que as razões sexuais encontradas nos quatro tratamentos não diferiram do esperado (Controle: $\chi^2=0,398$; T1: $\chi^2=0,221$; T2: $\chi^2=0,006$; T3: $\chi^2=0,081$; χ^2 tabelado=3,84, gl=1, $\alpha=5\%$).

O controle e os demais tratamentos apresentaram 100% de adultos normais. Quanto as viabilidades larval, pupal e total, apenas o tratamento 2 diferiu significativamente do controle na viabilidade larval (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Estudos recentes têm detectado toxinas e substâncias controladas tanto no inseto como nos restos quitinizados recolhidos de vítimas em estágio avançado de decomposição (Goff & Lord 2001). Estas substâncias podem gerar conseqüências ao desenvolvimento destes insetos,

em alguns estudos as drogas atuaram diminuindo o ganho de massa larval pela redução da atividade larval, limitando seu crescimento (Soto 2008), o que não ocorreu no presente estudo. Todos os tratamentos apresentaram valores de massa larval individual médio muito semelhantes, inclusive com o encontrado por Ferraz et al. (2012) que utilizou carne, moela e a dieta homogenato de moela em agar para criação de *C. putoria*. Como precaução utilizou-se nas quatro repetições a quantidade de dieta que proporcionasse mais de 1g de dieta por larva, pois esta foi verificada por Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo (1996) como a densidade ideal relativa ao emprego de carne em diferentes califorídeos. Desta forma não ocorreu estresse por competição explorativa por recursos ou por alterações químicas no substrato alimentar decorrentes do metabolismo larval (Khazaeli et al. 1993, Bubli et al. 1998).

Nos tratamentos com antibiótico houve discreto aumento na duração total conforme aumento da concentração do antibiótico (T1>T2>T3). Da mesma forma, houve discreto aumento na duração até abandono e do estágio larval. Porém esta diferença não foi considerada significativa estatisticamente. A duração do estágio larval de todos os tratamentos do presente estudo foi maior comparado ao encontrado por Ferraz et al. (2011b) que utilizou carne e ração pastosa para cães para criação de *C. putoria*. Isto é muito compreensível já que carne é a dieta natural desta espécie (Leal et al. 1982), então provavelmente nela se encontram todos os nutrientes necessários. Porém os estágios pupal e total foram menores. Em estudo com *Cochliomyia macellaria* (F.) (Diptera: Calliphoridae), foi realizada comparação do seu desenvolvimento em meio estéril ou com bactérias e foi observado que estas sobrevivem no meio estéril com uma taxa de desenvolvimento mais curta e maior sobrevivência do que no meio com bactérias (Ahmad et al. 2006). No presente estudo, não houve diferença significativa no ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emergência entre tratamentos com antibiótico e o controle.

O antibiótico gentamicina não alterou a duração dos estágios pós-embrionários, mas em estudo sobre efeito da cocaína onde *C. putoria* recebeu fígado contendo a substância para alimentação, as larvas se desenvolveram significativamente mais rápido em relação ao controle e iniciaram e terminaram o processo de pupariação antes que as do controle, assim como a emergência (Carvalho 2004). Diazepam e anfeprona também aceleraram o desenvolvimento larval de *C. putoria* (Carvalho et al. 2001, Carvalho 2004). Em contradição, o analgésico escopolamina retardou o desenvolvimento de grupos com maior concentração (Grella et al. 2007)

No presente estudo, o gentamicina apenas alterou a viabilidade larval do tratamento 2 de forma significativa estatisticamente. As viabilidades do T2 foram maiores, porém as dos outros tratamentos também foram elevadas. Em dípteros, viabilidades acima de 60% são consideradas promissoras (Loureiro et al. 2005). Em estudo com dieta artificial acrescida de escopolamina houve aumento da mortalidade de *C. putoria* conforme maior concentração da droga (Grella et al. 2007), diferente do ocorrido em nosso estudo. Há ainda a possibilidade das larvas não terem metabolizado a droga assim como relatado por Grella & Thyssen (2008) em estudo com imaturos de *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*, criados em dieta artificial acrescida de cloridrato de oxycodone, onde não observaram diferenças significativas no desenvolvimento entre os grupos controle e os grupos experimentais. As larvas são capazes de eliminar eficientemente várias substâncias tóxicas durante seu desenvolvimento e com isso não afetar seu desenvolvimento pela presença de drogas na sua fonte alimentar (Nuorteva & Nuorteva 1982; Wilson et al. 1993). Esse efeito paradoxal de em menores concentrações de drogas ocorrer maior sobrevivência que o controle já ocorreu em outros estudos (Goff et al. 1989; Soto 2008).

Quanto a viabilidade pupal, todos os tratamentos do presente estudo obtiveram valores acima de 75%, considerados adequados, e ainda acima do obtido nos estudos de Soto (2008) com dieta artificial acrescida de coração de frango tanto no controle quanto nos tratamentos com barbitúricos em *C. putoria*. Na viabilidade total, os tratamentos do presente estudo obtiveram valores acima de 69%, e da mesma forma, acima do controle e demais tratamentos de Soto (2008). As taxas de emergência encontradas por Ribeiro (1990) em várias densidades larvais diferentes de *C. putoria* variaram de 60 a 98%, também condizentes com o encontrado neste estudo.

As taxas sexuais encontradas indicaram estabilidade na população conforme análise do qui-quadrado, pois somente quando a razão sexual for 1:1 haverá estabilidade na população (Fisher 1930) e ainda ocorreu 100% de dípteros normais no controle e demais tratamentos indicando que não foram constituídos distúrbios suficientemente intensos, que não pudessem ser tamponados ou neutralizados com ajustes metabólicos capazes de garantir a estabilidade homeostática nos padrões de desenvolvimento (Lomonaco & Germanos 2001).

O uso excessivo de medicamentos pode ser mais prejudicial do que benéfico e as estatísticas americanas demonstram que não são poucos os casos de intoxicação por excesso ou incompatibilidade medicamentosa, levando à morte, principalmente na idade avançada. Portanto, estudos como este auxiliarão no uso de *C. putoria* em entomologia forense, principalmente se o antibiótico foi utilizado anteriormente, ou ainda se foi utilizado em excesso e causou a morte.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FINEP, UNIRIO e FAPERJ pelo suporte financeiro a este trabalho.

REFERENCIAS

- Aguiar-Coelho VM, Milward-de-Azevedo EMV. 1996. Relações intraespecíficas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Diptera) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira Entomologia* 41: 35-40.
- Ahmad A, Broce A, Zurek L. 2006. Evaluation of significance of bacteria in larval development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 43(6):1129-1133.
- Barbosa LS, Jesus DML, Aguiar-Coelho VM. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Díptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências* 6: 207-217.
- Baumgartner DL, Greenber B. 1984. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *Journal of Medical Entomology* 21: 105-113.
- Bubli AO, Imasheva AG, Loeschcke V. 1998. Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* 52: 619-625.
- Carvalho LML, Linhares AX, Trigo JR. 2001. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Science International* 120: 140-144.
- Carvalho, LML. 2004. Detecção e efeito de drogas no desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), duas moscas varejeiras de interesse forense. *Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Parasitologia*.

- Carvalho, L.M.L., Thyssen, P.J., Goff, M.L. & Linhares, A.X. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology*, 5(1): 33-39.
- Catts, E. P. & Goff, M. L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, 37: 253-272.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Ferraz, ACP., Gadelha, BQ., Queiroz, MMC., Moya-Borja, GE., Aguiar-Coelho, VM., Coelho, Valéria M. A. 2010. Effects of forest fragmentation on dipterofauna (Calliphoridae) at the Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, RJ. *Brazilian Journal of Biology* 70: 55 – 63.
- Ferraz ACP, Almeida VRG, Jesus DM., Nunes RV, Nascimento BP, Coelho VMA, Lessa CSS. 2011a. Epidemiological Study of Myiasis in Hospital do Andaraí, Rio de Janeiro, with the Occurrence of an Exotic Etiological Agent. *Neotropical Entomology* 40: 393 - 397.
- Ferraz ACP, Bosisio DD, Aguiar-Coelho VM. 2011b. Dieta para larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *EntomoBrasilis* 4 (3): 125-129
- Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP; Silva Filho, RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science*, in prelo.
- Fisher RA. 1930. Seleção gênica. In: Futuyma DJ, editor. *Biologia Evolutiva*, pp. 631. Sociedade Brasileira de Genética.
- Gentamicina: sulfato de gentamicina. Goiás: Neoquímica, 2011. Bula de remédio. (<http://neoquimica.provisorio.ws/arquivos/bulas/todas/1046503480014.pdf>)
- Goff ML, Omori AI, Goodbrood JR. 1989. Effect of cocaine in tissue on the development rate of *Boettcherisca peregrine* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology* 26: 91-93.
- Goff ML, Lord WD. 2001. Entomotoxicology: Insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development In: Byrd JH, Castner JL, editors. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, pp 331–340. CRC.
- Grella MD, Thyssen PJ. 2008. Qualitative analysis of the effect of oxycodone (opioid analgesic) on the development rate of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and its importance for estimating of the post-mortem interval in Brazil. Annals of XXIII International Congress of Entomology, Durban, Africa.
- Grella MD, Estrada DA, Thyssen P J. 2007. Scopolamine effect on the development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) and its importance for the post mortem interval estimate. *Entomologia mexicana* 6: 870-873.
- Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22: 53-60.
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Khazaeli AA, Fukvi HH, Curtsinger JW. 1993. Egg and larval densities and survival rates in an inbred line of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 72: 142-143.

- Leal TTS, Prado AP, Antunes JA. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 41- 44.
- Lomônaco C, Germanos E. 2001. Variações Fenotípicas em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em Resposta à Competição Larval por Alimento. *Neotropical Entomology* 30: 223-231.
- Loureiro MS, Oliveira VC, D'almeida JM. 2005. Desenvolvimento pós-embrionário de *Pattonella intermutans* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae) em diferentes dietas. *Revista Brasileira de entomologia* 49 (1): 127-129
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das forma adultas da espécie da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomología y Vectores* 10 (2): 255-268.
- Mello RS, Queiroz MMC, Aguiar-Coelho, VM. 2007. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia Série Zoologia* 97(4): 481-485.
- Nitsche MJT. 2010. Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar*. Tese Apresentada Ao Instituto De Biociências, Campus De Botucatu, Unesp, Botucatu – Sp.
- Nuorteva, P., & Nuorteva, S. L., 1982. The fate of Mercury in Sarcosaprophagous flies and in insects eating them. *Ambio* 11: 34-37.
- Reis SF, Stangenhans G, Godoy WAC, Von Zuben CJ, Ribeiro OB. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função da densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 38: 33-46.
- Ribeiro OB. 1990. Estudo da competição intra-específica em *C. putoria* e *M. domestica* em diferentes meios e temperaturas manipulados. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
- Soto DAE. 2008. Avaliação da taxa de desenvolvimento de três espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense sob o efeito de dois barbitúricos. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- Von Zuben, C.J. 2001. Zoologia Aplicada: Recentes avanços em estudos de entomologia forense. *Entomologia y Vectores*, 8(2): 173-183.
- Zumt F. 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, London.

Tabela 1: Massa corporal de larvas (g)* de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) oriundas de quatro tratamentos** com diferentes concentrações de gentamicina criadas em câmara climatizada (30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo).

Tratamento	Massa individual média (g) ± Desvio padrão	Intervalo de variação	<i>p</i> = valor de significância (teste t)			
			Controle	T1	T2	T3
Controle	0,049a±0,007	0,035-0,059	-	0,569	0,239	0,483
T1	0,053a±0,012	0,021-0,068	0,569	-	0,909	0,974
T2	0,054a±0,003	0,041-0,062	0,239	0,909	-	0,826
T3	0,053a±0,008	0,037-0,064	0,483	0,974	0,826	-

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t ($\alpha=5\%$).

** Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + gentamicina 3,33 µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + gentamicina 13,33 µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + gentamicina 66,66 µg/mL

Tabela 2: Duração média dos estágios de desenvolvimento pós-embriônico* (dias) de larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) oriundas de quatro tratamentos** com diferentes concentrações de gentamicina criadas em câmara climatizada (30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo)

		Dias	Intervalo de variação	Desvio Padrão	<i>p</i> = valor de significância (teste t)			
					Controle	T1	T2	T3
Duração até abandono	Controle	4,478a	4 - 5	0,517	-	0,214	0,488	0,418
	T1	4,114a	4 - 5	0,089	0,214	-	0,645	0,150
	T2	4,225a	4 - 5	0,450	0,488	0,645	-	0,231
	T3	4,989a	4 - 6	1,056	0,418	0,150	0,231	-
Estágio larval	Controle	5,477a	5 - 6	0,516	-	0,528	0,573	0,494
	T1	5,270a	5 - 6	0,340	0,528	-	0,986	0,264
	T2	5,275a	5 - 6	0,441	0,573	0,986	-	0,287
	T3	5,845a	5 - 7	0,871	0,494	0,264	0,287	-
Estágio pupal	Controle	3,874a	3 - 5	0,214	-	0,406	0,181	0,652
	T1	3,610a	3 - 6	0,551	0,406	-	0,163	0,741
	T2	4,057a	4 - 5	0,114	0,181	0,163	-	0,278
	T3	3,741a	2 - 5	0,518	0,652	0,741	0,278	-
Duração total	Controle	9,339a	9 - 10	0,322	-	0,124	0,954	0,532
	T1	8,785a	8 - 11	0,530	0,124	-	0,168	0,139
	T2	9,323a	9 - 10	0,435	0,954	0,168	-	0,531
	T3	9,642a	9 - 11	0,854	0,532	0,139	0,531	-

* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t ($\alpha=5\%$).

** Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + gentamicina 3,33 µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + gentamicina 13,33 µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + gentamicina 66,66 µg/mL

Tabela 3: Comparação por ANOVA das viabilidades dos estágios larval, pupal e total (de neolarvas a adulto) de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) criada em quatro tratamentos: controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + gentamicina 3,33 µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + gentamicina 13,33 µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + gentamicina 66,66 µg/mL

		Viabilidade%,	<i>p</i> = valor de significância (ANOVA)			
			Controle	T1	T2	T3
Larval	Controle	81,88a	-	0,196	0,006	0,874
	T1	90,63ab	0,196	-	0,326	0,419
	T2	96,88b	0,006	0,326	-	0,185
	T3	80,00ab	0,874	0,419	0,185	-
Pupal	Controle	93,60a	-	0,263	0,739	0,228
	T1	75,40a	0,263	-	0,287	0,468
	T2	92,26a	0,739	0,287	-	0,234
	T3	86,85a	0,228	0,468	0,234	-
Total	Controle	76,88a	-	0,717	0,073	0,517
	T1	70,63a	0,717	-	0,284	0,948
	T2	89,38a	0,073	0,284	-	0,093
	T3	69,38a	0,517	0,948	0,093	-

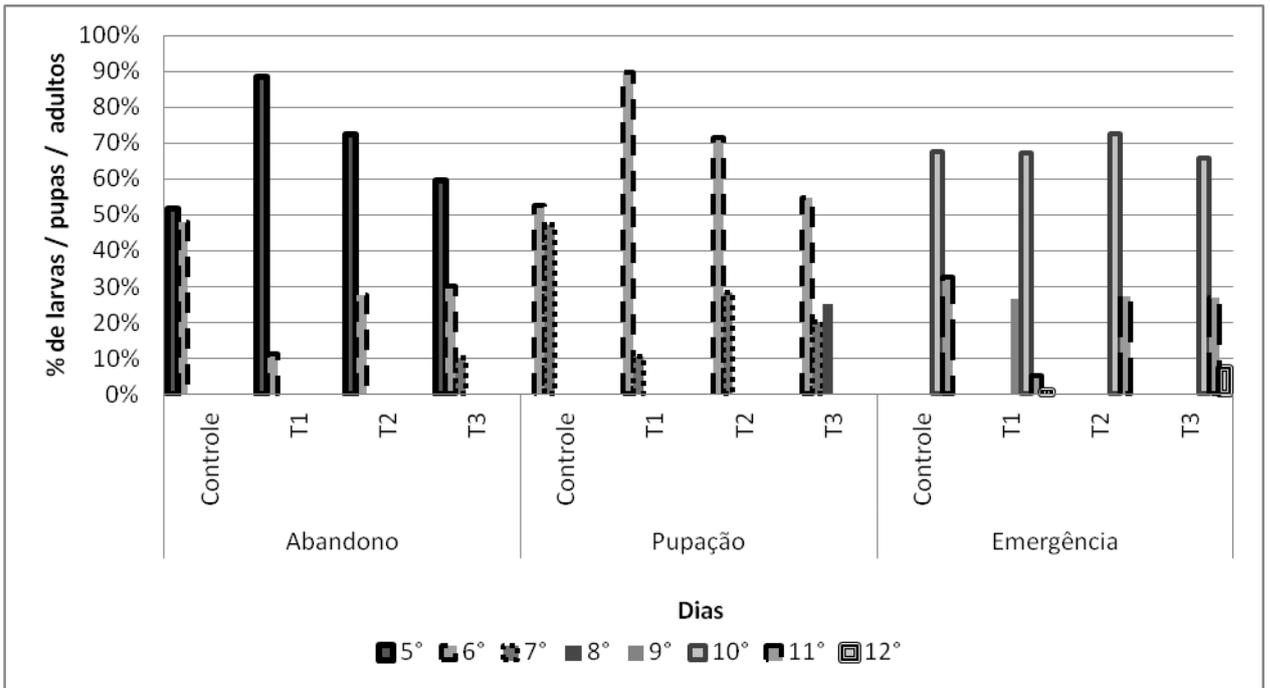


Figura 1 – Ritmo de abandono das larvas da dieta, de pupariação e de emergência (%) de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) em quatro tratamentos: controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + gentamicina 3,33 µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + gentamicina 13,33 µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + gentamicina 66,66 µg/mL

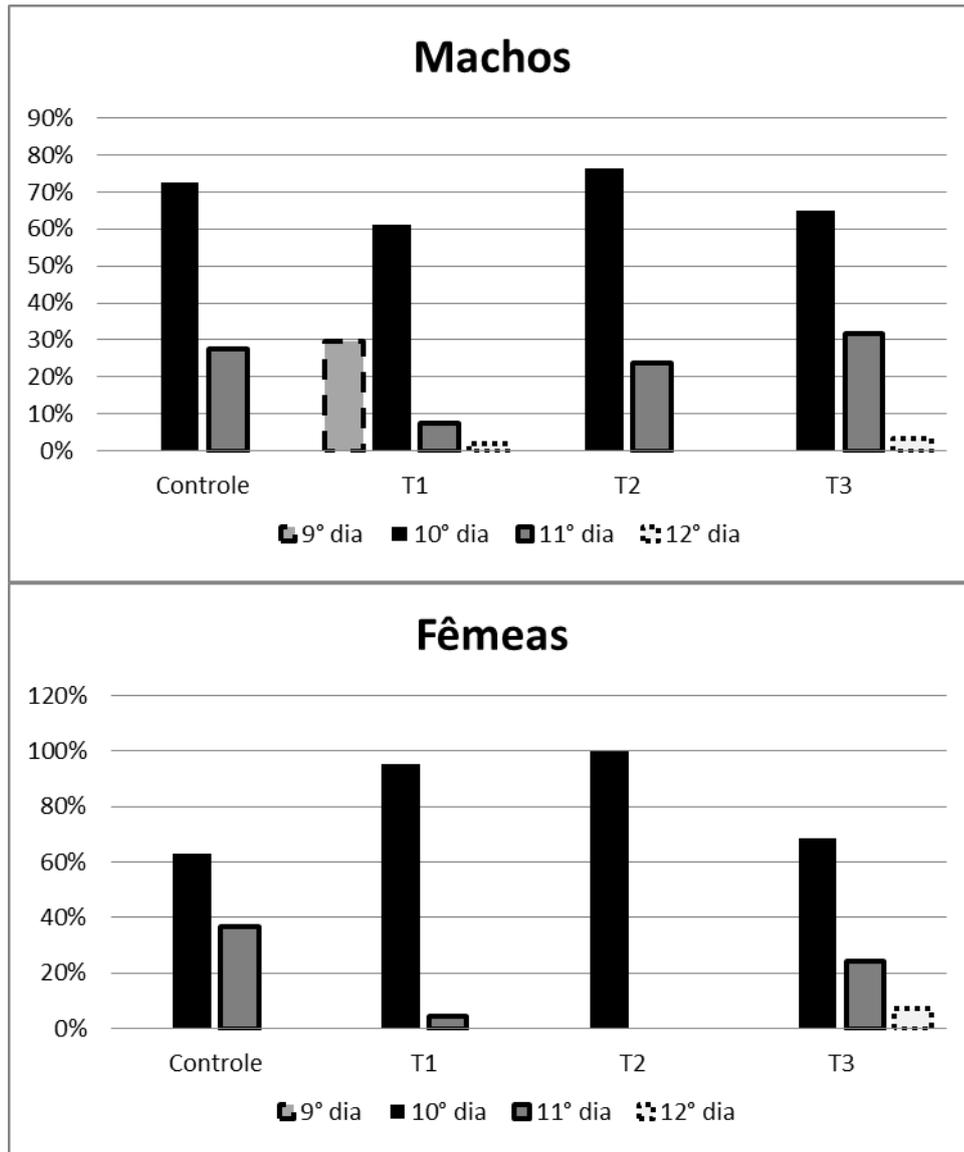


Figura 2 – Taxa de emergência, em dias, de machos e fêmeas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1830) criados em quatro tratamentos: controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + gentamicina 3,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$; T2= homogenato de moela em agar + gentamicina 13,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, T3= homogenato de moela em agar + gentamicina 66,66 $\mu\text{g}/\text{mL}$

**CAPÍTULO V – DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE
Chrysomya putoria (WIEDEMANN 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)
COM FONTE ALIMENTAR CONTENDO AMPICILINA EM
DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

Desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) em fonte alimentar contendo ampicilina em diferentes concentrações

RESUMO

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) é uma espécie de importância forense, com potencial para a prática da terapia larval e também descrita causando miíases. Avaliar a ação de diferentes concentrações do antibiótico ampicilina sobre o crescimento e desenvolvimento desta espécie foi o objetivo deste estudo. Larvas de primeiro ínstar da 3ª geração em 60 gramas de dieta de homogenato de moela em agar 65% receberam ampicilina sódica. Cada concentração do antibiótico testado (66µg/mL; 81,33µg/mL e 166,66µg/mL) e o controle foram replicados quatro vezes (40 larvas/repetição). O controle recebeu água destilada invés do antibiótico. Cada béquer de cada repetição (100mL) foi inserido em outro béquer maior (400mL) contendo serragem esterilizada e vedado com tecido de nylon e elástico. O experimento foi conduzido em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias. A massa corporal das larvas, após abandono da dieta, foi registrada em lotes de cinco em balança analítica e armazenadas em tubos de ensaio vedados com tecido de nylon e elástico. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência dos adultos e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos. Para a análise utilizou-se Microsoft Excel e Past. A variação entre as médias da massa de larvas e as durações dos estágios larval, pupal e total foram analisadas por Teste t de Student ($\alpha=5\%$); as viabilidades e as taxas de normalidade comparadas por ANOVA; a razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2). Não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos quanto a massa individual médio das larvas (Controle: 0,039; T1: 0,038; T2: 0,049; T3: 0,046g), duração média da inoculação das larvas até o abandono (3,617; 3,510; 3,159; 4,498 dias) e dos estágios larval (4,617; 4,016; 4,174; 4,469 dias), pupal (3,660; 3,664; 3,807; 3,623 dias) e total (8,279; 8,183; 7,888; 8,218 dias), respectivamente para controle, T1, T2 e T3. As proporções sexuais encontradas nos quatro tratamentos não diferiram do esperado. As taxas de normalidade foram de 100% em todos os tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos quanto as viabilidades larval e total, porém a viabilidade pupal do T1 diferiu significativamente do controle e do T2, e a do T3 diferiu do controle. O antibiótico pareceu não alterar significativamente o desenvolvimento de *C. putoria* no período pós-embriônico.

INTRODUÇÃO

Antibiótico é considerado como a panacéia universal (Wannmacher 2004). Os antibióticos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais (McCaig & Hughes 1995), mas 2/3 dos antibióticos usados são sem prescrição médica (Wannmacher 2004). Há algum tempo vem sendo o grupo farmacológico mais utilizado em automedicações (Stolley 1972; Haak 1989; Mestanza & Pamo 1992).

As penicilinas são um grupo de antibióticos de primeira escolha em muitas das patologias (Palma 2002). A ampicilina é indicada no tratamento de diversas infecções (trato urinário, respiratório, digestivo e biliar, infecções localizadas ou sistêmicas e infecções bucais, extrações dentárias infectadas e outras intervenções cirúrgicas) causadas por microorganismos gram-positivos e gram-negativos sensíveis a este medicamento (Ampicilina 2011)

Muitas substâncias podem gerar efeitos no desenvolvimento de artrópodes de importância forense por estes serem afetados pela ação das drogas ou de seus metabólitos quando presentes no corpo (Introna et al. 2001). Insetos que se alimentam de tecidos vivos ou

necrosados presentes em míases ou ainda quando aplicados em terapia larval também poderiam absorver estas substâncias e por elas terem seu desenvolvimento afetado. Insetos podem, inclusive, ser utilizados como método alternativo para detecção de substâncias tóxicas, pois nem sempre metabolizam as drogas ingeridas do cadáver e as acusam muito tempo depois após a morte (Goff et al. 1989; Hédouin et al 1999; Introna et al. 2001).

As espécies de Calliphoridae, dentre elas *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) durante a fase larval podem se alimentar de tecidos humanos, já que estas se apresentam provocando míases e ainda decompondo cadáveres (Zumpt 1965; Guimarães et al. 1978, Baumgartner & Greenberg 1984). Considerando esse uso exacerbado de antibióticos e o desconhecimento de como as larvas bioacumulam ou eliminam as drogas e como isso afeta o desenvolvimento larval (Soto 2008), é importante investigar o efeito de antibióticos como a ampicilina no desenvolvimento desta espécie quando acrescido em dieta artificial oferecida como fonte exclusiva de alimentação durante seu período pós-embrionário, e este é o objetivo do presente estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

A criação dos dípteros utilizados e toda a parte experimental foram realizadas no Laboratório de Estudos de Dípteros (LED), Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

A colônia de *C. putoria* foi iniciada com adultos coletados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro localizado dentro do parque da Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, RJ. Foram utilizadas três armadilhas seguindo o modelo de Mello et al. (2007), contendo sardinha como isca e expostas por aproximadamente 5 horas, na parte da manhã. Após a coleta dos adultos e das larvas de dípteros muscóides, os insetos foram levados para o LED, onde foi feita a triagem e a identificação taxonômica dos mesmos de acordo com Mello (2003). As moscas foram criadas em gaiolas de plástico transparente (40x30x20cm) com abertura na parte superior para arejamento e abertura frontal para permitir o acesso ao interior da gaiola revestida com tecido de nylon, sendo alimentadas com água, solução de mel e água (50 %) e moela de frango ou carne bovina como fonte de proteínas, substrato de oviposição e maturação de ovários. A metodologia de criação seguiu descrição de Barbosa et al. (2004) e Ferraz et al. (2011).

As larvas de primeiro ínstar da 3ª geração em laboratório foram transferidas com o uso de pincel fino para becheres de vidro de 100mL contendo 60 gramas de dieta de homogenato de moela em agar 65% (Ferraz et al. 2012) em cada um. A dieta foi selecionada por ser prática para homogeneizar substâncias a serem testadas e estéril (autoclavada), o que torna o antibiótico totalmente disponível para agir somente nas larvas inseridas. O antibiótico utilizado foi Ampicilina sódica de 1g, medicamento genérico (laboratório Teuto). Cada repetição recebeu 1mL do antibiótico em três diferentes concentrações resultando nas seguintes concentrações junto a dieta: 41,66µg/mL; 81,33µg/mL e 166,66µg/mL. As concentrações foram escolhidas a partir da concentração sérica de ampicilina (após a dose intravenosa de 1g, atinge-se a concentração máxima de aproximadamente 40µg/mL) (Ampicilina, 2011). A primeira concentração escolhida (T1) seria próxima a concentração sérica intravenosa; a segunda concentração (T2) seria aproximadamente o dobro; e a terceira concentração (T3) aproximadamente quatro vezes maior que a concentração sérica intravenosa. Cada concentração do antibiótico testado e o controle foram replicados quatro vezes, sendo 40 larvas para cada repetição. O controle recebeu água destilada no lugar do antibiótico.

Cada béquer de cada repetição foi inserido em outro béquer maior (400mL) contendo serragem esterilizada para permitir a pupariação das larvas quando maduras após o abandono da dieta e vedado com tecido de nylon e elástico. O experimento foi conduzido em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo. Foram realizadas observações diárias sempre no mesmo horário (12h).

Foi registrada a massa corporal das larvas, após abandono da dieta em lotes de cinco em balança analítica e armazenadas em tubos de ensaio vedados com tecido de nylon e elástico para observação da emergência dos adultos. Foram acompanhadas as datas de pupariação, emergência e a razão sexual, assim como anormalidades morfológicas dos adultos.

Para a análise bruta dos dados utilizou-se o programa Microsoft Excel e para as demais análises o programa PAST. A variação entre as médias de massa de larvas e as durações dos estágios larvais, pupais e totais (neolarvas a adultos) foram analisadas por meio do Teste t de Student ($\alpha=5\%$). As viabilidades e as taxas de normalidade foram comparadas por ANOVA. A razão sexual foi testada em relação à frequência esperada, pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

RESULTADOS

Quanto a massa individual média das larvas, não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos (Tabela 1). Quanto à duração média da inoculação das larvas até o abandono e dos estágios larval, pupal e total (dias), não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos (Tabela 2).

O ritmo de abandono das larvas da dieta, de pupariação e de emergência (%) de *C. putoria*, nos quatro tratamentos está representado na Figura 1. O pico de abandono da dieta no controle foi no 5° e 6° dias, enquanto nos tratamentos com antibiótico foi predominantemente no 5° dia, alcançando até o 7° dia apenas no T3. O pico de pupariação do controle foi no 6° e 7° dias, enquanto que nos demais tratamentos no 6° dia, se estendendo até o 8° apenas no T3. Já o pico de emergência em todos os tratamentos ocorreu no 10° dia, se estendendo até o 11° dia no controle e T2, e até o 13° dia no T1 e T3.

Todos os tratamentos apresentaram 100% de adultos normais. A taxa de emergência de machos e fêmeas de *C. putoria* foi semelhante (Figura 2), ocorrendo o pico de emergência de ambos no 8° dia. Apenas nos tratamentos T2 e T3 houve extensão da emergência de fêmeas até o 10° dia. As proporções sexuais encontradas foram: controle (machos=48%, fêmeas=52%), T1 (machos=48%, fêmeas=52%), T2 (machos=54%, fêmeas=46%) e T3 (machos=49%, fêmeas=51%). Os testes qui-quadrado revelaram que as razões sexuais encontradas nos quatro tratamentos não diferiram do esperado (Controle: $\chi^2=0,001$; T1: $\chi^2=0,001$; T2: $\chi^2=0,007$; T3: $\chi^2=0,001$; χ^2 tabelado=3,84, gl=1, $\alpha=5\%$).

Quanto as viabilidades larval e total não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). Já a viabilidade pupal do T1 (menor do que a dos demais tratamentos) diferiu significativamente do controle e do T2, e a viabilidade pupal do T3 diferiu do controle.

DISCUSSÃO

Os antibióticos são comumente utilizados para melhorar uma infecção estabelecida e possuem a finalidade de eliminar ou impedir o crescimento bacteriano (Nicolini et al. 2008). Portanto, o perfil de pacientes com miíases, que frequentemente apresentam feridas infectadas, ou ainda de pacientes que farão uso da terapia larval normalmente se faz recomendado o uso deste tipo de fármaco. Considerando também que o número de usuários de drogas ilícitas, fármacos e outras substâncias tóxicas têm aumentado gradualmente com o passar dos anos, são importantes estudos entomotoxicológicos para entender possíveis

interações substância-inseto (Introna et al. 2001; Unodc 2007). Quando insetos necrófagos ingerem drogas através da alimentação de cadáveres de indivíduos que tenham feito uso destas drogas podem ter sua taxa de desenvolvimento e metabolismo alterados (Introna et al. 2001). No presente estudo, alguns poucos parâmetros foram alterados pela presença da ampicilina, como será mostrado a seguir.

Fazer uso de dietas artificiais, como a do presente estudo, para inserção de substâncias de forma homogênea, neste caso o antibiótico ampicilina, dispensa uso de cobaias que tem manipulação custosa e custo elevado (Soto 2008). Da mesma forma, a dieta artificial ainda é interessante por conhecermos sua composição e evitar possíveis interações indesejadas com a substância a ser testada.

Estudos anteriores com califorídeos comprovaram que a redução no tamanho e peso do adulto é uma consequência da limitação de alimento e espaço, refletindo a quantidade e qualidade do alimento consumido durante o estágio larval (Kamal 1958; Sullivan & Sokal 1963; Williams & Richardson 1983; Slansky & Rodriguez 1987; Goodbrod & Goff 1990; Reis et al. 1994). Considerando que a massa individual média das larvas não apresentou diferença significativa entre os quatro tratamentos, não houve portanto diminuição da ingestão alimentar e/ou absorção, ainda que na presença de antibióticos. A dieta utilizada é rica em proteínas e adequada aos califorídeos que se utilizam desse tipo de substrato (Yaghoobi et al. 2005) onde as larvas procuram ingerir o máximo possível antes da exaustão dos recursos (Ullyett 1950). As larvas então se dispersam em busca de novas fontes alimentares ou de um local para pupariação (Greenberg 1990), o que também ocorreu no presente estudo, migrando para o becher maior com serragem.

A quantidade de dieta de homogenato de moela em agar utilizada em cada repetição também garantiu a densidade ideal relativa de mais de 1g de dieta por larva preconizada por Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo (1996) em diferentes califorídeos usando carne como dieta a fim de evitar estresse por competição explorativa por recursos ou por alterações químicas no substrato alimentar decorrentes do metabolismo larval (Khazaeli et al. 1993, Bublil et al. 1998). A quantidade de alimento também poderia alterar o fenótipo (Ribeiro et al. 1993; Reis et al. 1994; Roper et al. 1996; Ribeiro 1998), mas mesmo em tratamentos com a presença do antibiótico ampicilina não houve variações fenotípicas, pois obtivemos 100% de adultos normais.

Oliveira et al. (2007), em estudo com *C. putoria* criada em carne bovina em câmara climatizada a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, $60 + 10\%$ U.R. e 14 horas de fotofase, obteve o tempo de desenvolvimento larval de 92 horas (o que daria aproximadamente 3,83 dias), tempo inferior aos quatro tratamentos do presente estudo; já Ferraz et al. (2011), com carne bovina e dieta pastosa para cães em temperatura ambiente (média da T. máx. $25,0^{\circ}\text{C}$, média da T. mín. $21,5^{\circ}\text{C}$, UR 60 a 90%) encontrou valores maiores. O aumento do estágio larval ocorre como uma estratégia para compensar a queda na qualidade nutricional do alimento consumido (Ullyett 1950; Kamal 1958). Porém, tanto no primeiro quanto no segundo estudos, as diferenças não superaram um dia em relação ao presente estudo. Não ocorreram também diferenças significativas entre a duração dos estágios larval, pupal e total entre o controle e os tratamentos com antibiótico ampicilina, então é possível que o antibiótico não tenha afetado a conversão do alimento.

O tratamento T3, com maior concentração de antibiótico teve prolongamento de um dia a mais que os demais tratamentos no abandono, pupariação e emergência. É possível que o antibiótico tenha alterado alguma característica organoléptica da dieta, já foi demonstrado que o comportamento da larva de *C. albiceps* (Diptera: Caliphoridae) é alterado pela palatabilidade e ação de ferormônios (Faria et al 2004). Apesar disso a população de dípteros

emergidos em todos os tratamentos pode ser considerada estável, pois nenhuma divergiu da razão sexual esperada 1:1 (Fisher 1930) e a taxa de emergência de machos e fêmeas também foi semelhante (apenas em T2 e T3 houve extensão da emergência de fêmeas até um dia a mais). Também houve viabilidade acima de 60% em todos os tratamentos, exceto viabilidade total em T3. Este valor é considerado promissor em dípteros (Loureiro et al. 2005).

Há autores que acreditam que haja correspondência entre a concentração de drogas presentes nos tecidos dos quais as larvas se alimentam e nos tecidos dos insetos (Goff et al. 1989; Introna et al. 1990; Kintz et al. 1990), enquanto outros indicam não haver a existência de tal relação pois o processo de acumulação e eliminação de substâncias pelas larvas pode variar conforme a droga e a espécie analisada (Nolte 1992; Sadler 1997). Talvez dessa forma fosse possível compreender resultados contraditórios como a diferença significativa nas viabilidades de T1 em relação ao controle e T2, e a viabilidade pupal do T3 diferir do controle se conhecêssemos a fundo as formas de absorção, bioacumulação ou excreção das substâncias/drogas em larvas de dípteros.

Poucas alterações foram percebidas devido a inserção do antibiótico ampicilina, portanto sua presença na fonte alimentar nas concentrações deste estudo não interferem de forma significativa seu desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FINEP, UNIRIO e FAPERJ pelo suporte financeiro a este trabalho.

REFERÊNCIAS

- Aguiar-Coelho, V.M. & Milward-de-Azevedo, E.M.V. 1996. Relações intra-específicas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Díptera) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia* 41(1):35-40.
- Ampicilina: ampicilina sódica. São Paulo: SEM, 2011. Bula de remédio. (<http://www.bulas.med.br/bula/5737/ampicilina+injetavel.htm>)
- Barbosa LS, Jesus DML, Aguiar-Coelho VM. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Díptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências* 6: 207-217.
- Baumgartner DL, Greenber B. 1984. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *Journal of Medical Entomology* 21: 105-113.
- Bubli, O.A., A.G. Imasheva & V. Loeschcke. 1998. Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* 52: 619-625.
- Faria L.D.B., W.A.C. Godoy and S.F. Reis. 2004. Larval predation on different instars in blowfly populations. Brazil. *Arch. Biol. Technol.* 47(6): 887-894.
- Ferraz ACP, Bosisio DD, Aguiar-Coelho VM. 2011. Dieta para larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *EntomoBrasilis* 4 (3): 125-129
- Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP; Silva Filho, RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science*, in prelo.
- Fisher RA 1930. *Seleção gênica*, p. 276-279. In DJ Futuyama 1993, *Biologia Evolutiva*, Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 631 pp.
- Goff ML, Omori AI, Goodbrood JR. 1989. Effect of cocaine in tissue on the development rate of *Boettcherisca* (Diptera: Sarcophagidae). *Journal of Medical Entomology* 26: 91-93.

- Goodbrod, J. R., and M. L. Goff. 1990. Effects of larval population density on rates of development and interactions between two species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture. *Journal of Medical Entomology* 27: 338-343.
- Greenberg, B. 1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and a muscid (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America* 83: 1210-1214.
- Guimarães, JH; Prado, AP.; Linhares, AX. 1978. Three newly introduced species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista brasileira de Entomologia* 22(1): 53-60.
- Haak, H. 1989. Padrões de consumo de medicamentos em dois povoados da Bahia (Brasil). *Revista de Saúde Pública* 23: 143-51.
- Hédouin V, Bourel B, Martin-Bouver L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D. 1999. Determinations of drug levels in larvae of *Lucilia sericata* reared on rabbit carcasses containing morphine. *J Forensic Sci* 44: 351-353.
- Introna F jr, Lo Dico C, Caplan YH, Smialek JE. 1990. Opiate analysis of cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. *J Forensic Sci* 35:118-122
- Introna, F., C.P. Campobasso & M.L. Goff. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Sci. Int.* 120: 42-47.
- Kamal, A. S. 1958. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous calliphorids and sarcophagids. *Annals of the Entomological Society of America* 51: 261-271.
- Khazaeli, A.A., H.H. Fukvi & J.W. Curtsinger. 1993. Egg and larval densities and survival rates in an inbred line of *Drosophila melanogaster*. *Drosoph. Inform. Serv.* 72:142-143
- Kintz P, Tracqui A, Ludes B et al. 1990. Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. *Am J Forensic Med Pathol* 11: 63-65
- Loureiro, M. S.; V. C. Oliveira & J. M. D'Almeida. 2005. Desenvolvimento pós-embrionário de *Pattonella intermutans* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae) em diferentes dietas. *Revista Brasileira de Entomologia* 49: 127-129.
- Mccaig, L. F.; Hughes, J. M. 1995. Trends in antimicrobial drug prescribing among office-based physicians in the United States. *JAMA* 273(3): 214-219.
- Mestanza, F. & Pamo, O. 1992. Estudio muestral del consumo de medicamentos y automedicación en Lima Metropolitana. *Rev. Med. Hered* 3:101-8.
- Nicolini, Paola et. al. 2008. Fatores relacionados à prescrição médica de antibióticos em farmácia pública da região Oeste da cidade de São Paulo. *Ciência & Saúde Coletiva* 13 (Sup): 689-696.
- Nolte KB, Pinder RD, Lord WD. 1992. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. *J Forensic Sci* 37: 1179-1185
- Oliveira, M.S.; Mello, R.P. DE & Queiroz, M.M. DE C. 2007. Morfologia e duração dos instares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em laboratório. *Revista Brasileira de Entomologia*, 51(2): 239-245.
- Palma RM. 2002. Prescrição de antibióticos no serviço de atendimento complementar *Rev Port Clin Geral* 18:35-52.
- Reis, S. F., Stangenhans, G., Godoy, W. A. C., Von Zuben, C. J. & Ribeiro, O. B., 1994, Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira Entomologia* 38: 33-46.
- Ribeiro OB, Prado AP, Guimarães JH. 1993. Competição intra-específica em *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1983) (Diptera, Calliphoridae) em meio artificial. *Revista Brasileira de Entomologia* 37: 641-652.
- Ribeiro OB. 1998. Dynamics of equilibrium in experimental populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 42: 43-51.

- Roper C, Pignatelli P, Partridge L. 1996. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* life history to differences in larval density. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 609-622.
- Sadler DW, Richardson J, Haigh S, Bruce G, Pounder DJ (1997). Amitriptyline accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. *Am J Forensic Med Pathol* 18:397-403
- Slansky, F. & Rodriguez, J. G., 1987, Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates: an overview, pp. 1-69. In: F. Slansky & F. G. Rodriguez (eds.), *Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates*. John Wiley & Sons, New York.
- Soto DAE. 2008. Avaliação da taxa de desenvolvimento de três espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense sob o efeito de dois barbitúricos. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP.
- Stolley, P. D. et al. 1972. Drug prescribing and use in an american community. *Ann. Inter. Med.*, 76: 537-40.
- Sullivan, R. L. & Sokal, R. R. 1963. The effect of larval density on several strains of the house fly. *Ecology* 44: 120-130.
- Ulyett, G. C. V. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep blowfly populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 234:77-174.
- Unodc, 2007. 2007: World drug report. United Nations: Office on drugs and crime. Disponível em: <http://www.unodc.org/brazil/pt/pressrelease_20072506.html>. Acesso em 16 out. 2007.
- Wannmacher L. 2004. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? *Uso racional de medicamentos: Temas selecionados* 1 (4): 1-6.
- Williams, H. & Richardson, A. M. M., 1983, Life history response to larval food shortage in four species of necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae). *Aust. J. Ecol.*, 8: 257-263.
- Yaghoobi, R.; Tirgari, S. & Sina, N. 2005. Human auricular myiasis caused by *Lucilia sericata*: clinical and parasitological considerations. *Acta Medica Iranica* 43(2): 155-157.
- Zumpt F. 1965. Myiasis in man and animals in the old world. Butterworths.

Tabela 1: Massa corporal de larvas (g)* de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) oriundas de quatro tratamentos** com diferentes concentrações de ampicilina criadas em câmara climatizada (30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo).

Tratamento	Massa individual média (g) ± Desvio padrão	Intervalo de variação	p= valor de significância (teste t)			
			Controle	T1	T2	T3
Controle	0,039a±0,015	0,014-0,059	-	0,704	0,259	0,389
T1	0,038a±0,012	0,012-0,058	0,704	-	0,187	0,299
T2	0,049a±0,008	0,016-0,062	0,259	0,187	-	0,542
T3	0,046a±0,005	0,031-0,056	0,389	0,299	0,542	-

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste t ($\alpha=5\%$).

** Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ampicilina 41,66µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + ampicilina 81,33µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + ampicilina 166,66µg/mL

Tabela 2: Duração média dos estágios de desenvolvimento pós-embriônico* (dias) de larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) oriundas de quatro tratamentos** com diferentes concentrações de ampicilina criadas em câmara climatizada (30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo)

		Dias	Intervalo de variação	Desvio Padrão	<i>p</i> = valor de significância (teste t)			
					Controle	T1	T2	T3
Duração até abandono	Controle	3,617a	3 - 4	0,466	-	0,741	0,116	0,773
	T1	3,510a	3 - 4	0,412	0,741	-	0,168	0,976
	T2	3,159a	3 - 4	0,177	0,116	0,168	-	0,362
	T3	4,498a	3 - 6	2,477	0,773	0,976	0,362	-
Estágio larval	Controle	4,617a	4 - 5	0,466	-	0,214	0,125	0,736
	T1	4,016a	4 - 5	0,729	0,214	-	0,688	0,404
	T2	4,174a	4 - 5	0,174	0,125	0,688	-	0,444
	T3	4,469a	4 - 7	0,700	0,736	0,404	0,444	-
Estágio pupal	Controle	3,660a	3 - 5	0,271	-	0,990	0,399	0,887
	T1	3,664a	3 - 5	0,490	0,990	-	0,599	0,904
	T2	3,807a	3 - 5	0,170	0,399	0,599	-	0,447
	T3	3,623a	3 - 5	0,420	0,887	0,904	0,447	-
Duração total	Controle	8,279a	8 - 9	0,244	-	0,581	0,107	0,708
	T1	8,183a	8 - 9	0,223	0,581	-	0,191	0,821
	T2	7,888a	8 - 10	0,333	0,107	0,191	-	0,138
	T3	8,218a	8 - 9	0,195	0,708	0,821	0,138	-

* Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste t ($\alpha=5\%$).

** Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ampicilina 41,66µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + ampicilina 81,33µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + ampicilina 166,66µg/mL

Tabela 3: Comparação por ANOVA das viabilidades dos estágios larval, pupal e total (de neolarvas a adulto) de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) criada em quatro tratamentos: Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ampicilina 41,66µg/mL; T2= homogenato de moela em agar + ampicilina 81,33µg/mL, T3= homogenato de moela em agar + ampicilina 166,66µg/mL

		Viabilidade (%)	<i>p</i> = valor de significância (ANOVA)			
			Controle	T1	T2	T3
Larval	Controle	82,50a	-	0,176	0,444	0,492
	T1	96,88a	0,176	-	0,162	0,113
	T2	90,63a	0,444	0,162	-	0,214
	T3	70,00a	0,492	0,113	0,214	-
Pupal	Controle	96,37a	-	0,024	0,929	0,008
	T1	78,46ab	0,024	-	0,048	0,371
	T2	95,95ab	0,929	0,048	-	0,056
	T3	84,42b	0,008	0,371	0,056	-
Total	Controle	80,00a	-	0,764	0,560	0,223
	T1	76,25a	0,764	-	0,237	0,246
	T2	86,88a	0,560	0,237	-	0,072
	T3	58,75a	0,223	0,246	0,072	-

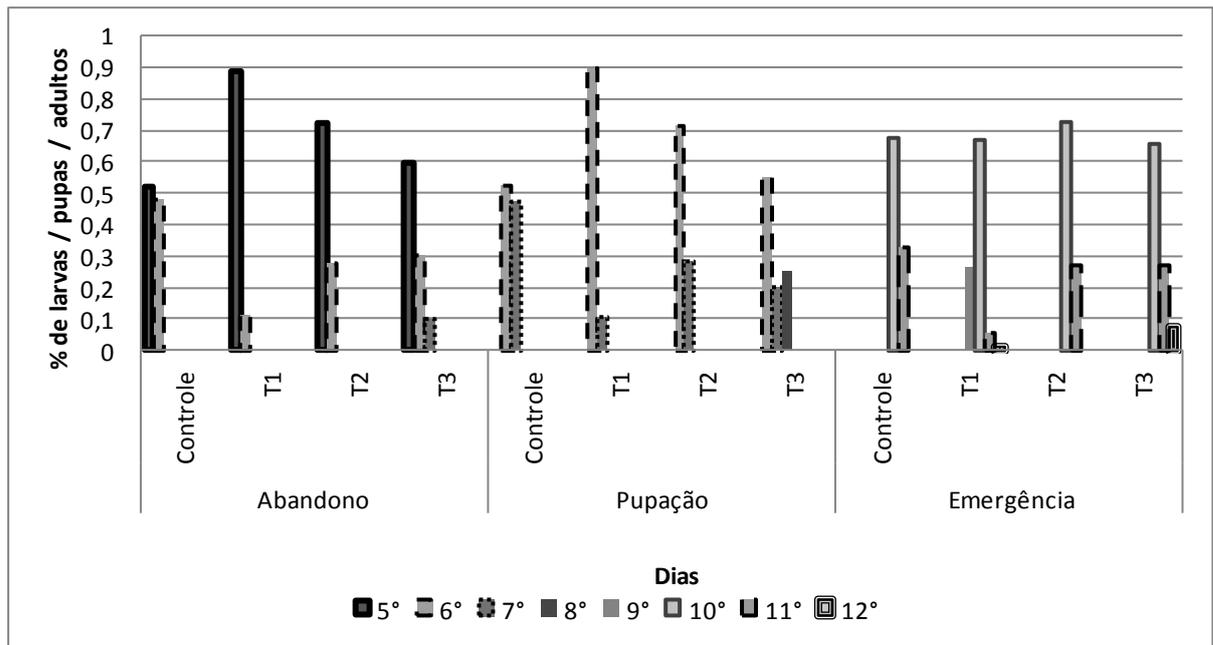


Figura 1 – Ritmo de abandono das larvas da dieta, de pupariação e de emergência (%) de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) em quatro tratamentos: Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ampicilina 41,66 μ g/mL; T2= homogenato de moela em agar + ampicilina 81,33 μ g/mL, T3= homogenato de moela em agar + ampicilina 166,66 μ g/mL

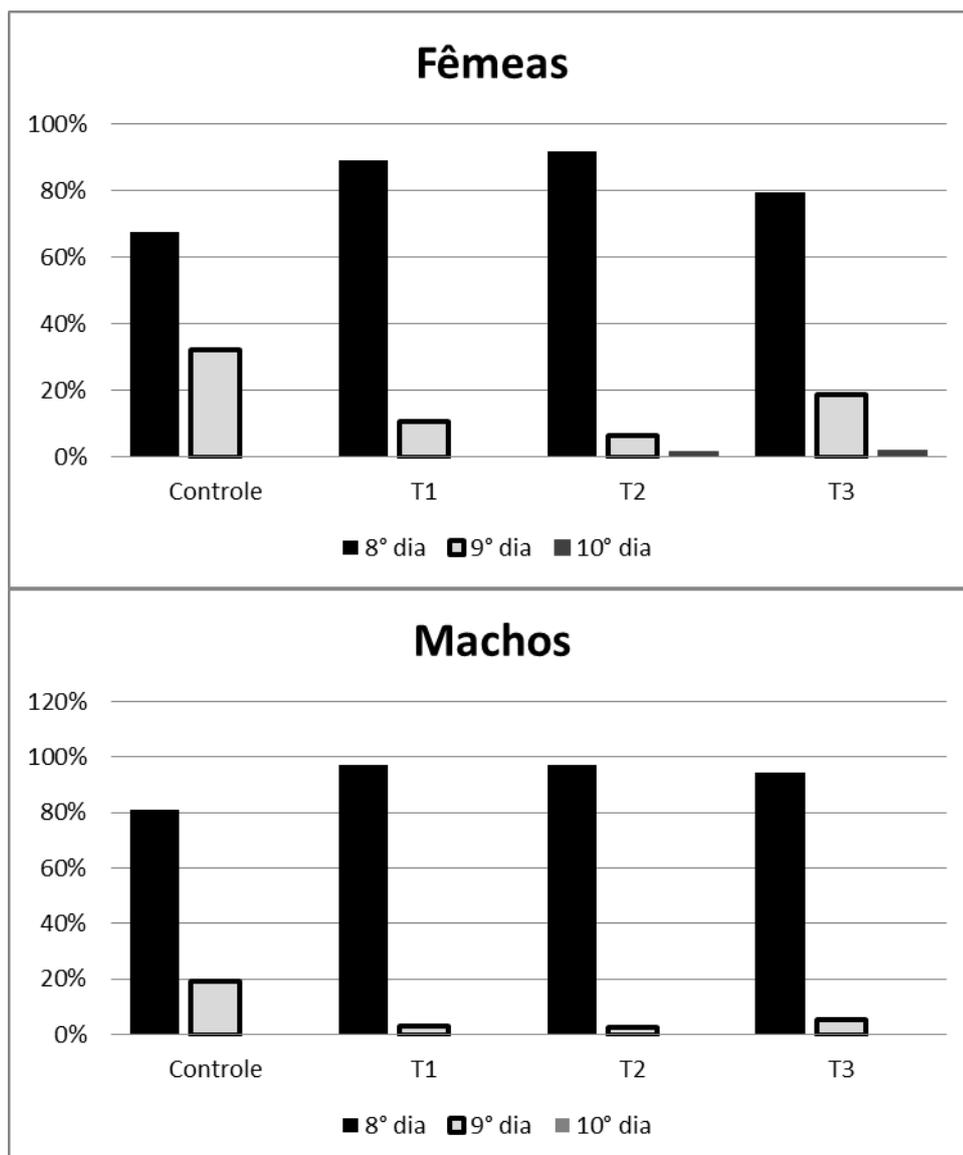


Figura 2 – Taxa de emergência, em dias, de machos e fêmeas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1830) criados em quatro tratamentos: Controle = homogenato de moela em agar; T1= homogenato de moela em agar + ampicilina 41,66 μ g/mL; T2= homogenato de moela em agar + ampicilina 81,33 μ g/mL, T3= homogenato de moela em agar + ampicilina 166,66 μ g/mL

2 CONCLUSÃO GERAL

- Moela de frango se mostrou satisfatória como dieta alternativa para criação de *C. albiceps* por apresentar massa corporal média larval, ritmo de abandono de larvas maduras, duração dos estágios larval, pupal e total, viabilidades larval e total semelhantes em carne bovina (controle) e moela de frango e ainda por não ter havido desvio da razão sexual e 100% de normalidade dos adultos emergidos (temperatura média: 25,6 ° C, umidade relativa do ar média: 72,4%). Moela de frango também se mostrou satisfatória como dieta alternativa para criação de *C. putoria* por apresentar massa média larval, duração do estágio larval, pupal e total, taxa de emergência de machos e fêmeas, viabilidades larval, pupal e total semelhantes em carne e moela e ainda por não ter havido desvio da razão sexual (temperatura ambiente média: 20,6 ° C, umidade relativa do ar média: 67,7%).
- Homogenato de moela de frango em agar 65% se mostrou satisfatório como dieta alternativa para criação de *C. putoria* por apresentar massa média larval, duração do estágio larval e total, taxa de emergência de machos e fêmeas, semelhantes em carne e moela e ainda por não ter havido desvio da razão sexual (criados em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo)
- Ciprofloxacino pareceu não afetar profundamente o desenvolvimento de *C. putoria* nas concentrações 3.33 µg/mL, 6.66 µg/mL e 13.33 µg/mL em homogenato de moela em agar 65% por não ter ocorrido diferença significativa no massa média larval, abandono larval, duração dos estágios larval, pupal e total, taxa de emergência de machos e fêmeas e normalidade dos adultos semelhantes nos tratamentos sem e com antibiótico e ainda por não ter havido desvio da razão sexual (criados em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo)
- Gentamicina pareceu não afetar profundamente o desenvolvimento de *C. putoria* nas concentrações 3,33 µg/mL, 13,33 µg/mL, 66,66 µg/mL em homogenato de moela em agar 65% por não ter ocorrido diferença significativa na massa média larval, duração média da inoculação das larvas até o abandono e dos estágios larval, pupal e total semelhantes nos tratamentos sem e com antibiótico e ainda por não ter havido desvio da razão sexual e 100% de normalidade dos adultos emergidos (criados em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo).
- Ampicilina pareceu não afetar profundamente o desenvolvimento de *C. putoria* nas concentrações 41,66µg/mL, 81,33µg/mL, 166,66µg/mL em homogenato de moela em agar 65% por não ter ocorrido diferença significativa na massa média larval, duração média da inoculação das larvas até o abandono e dos estágios larval, pupal e total, taxa de emergência de machos e fêmeas, e viabilidades larval e total semelhantes nos tratamentos sem e com antibiótico e ainda por não ter havido desvio da razão sexual e 100% de normalidade dos adultos emergidos (criados em câmara climatizada a 30°C dia e 28°C noite, 70 ± 10% U.R. e 14 horas de fotoperíodo).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUMGARTNER DL & GREENBERG B. 1984. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World. *Journal of Medical Entomology* 21: 105-113.
- CARRARO, V.M. Descrição quantitativa de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), no Campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em função da utilização da isca à base de sardinha. Tese (Mestrado em Parasitologia Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária - Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1995.
- CARVALHO L M L, THYSSEN P J, GOFF M L, LINHARES A X (2004) Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Int J Forensic Med Toxicol* 5: 33-39.
- CIOLCA, A. & ZARZARA, C. 1980. Cutaneous myiasis in sheep. *Vet Bull* 50 (2): 105.
- FERRAZ, ACP., GADELHA, BQ., QUEIROZ, MMC., MOYA-BORJA, GE., AGUIAR-COELHO, VM., COELHO, VALÉRIA M. A. 2010. Effects of forest fragmentation on dipterofauna (Calliphoridae) at the Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, RJ. *Brazilian Journal of Biology* 70: 55 - 63.
- FERRAZ, ACP, ALMEIDA VRG, JESUS DM., NUNES RV, NASCIMENTO, B. P., COELHO, VMA, LESSA CSS. 2011. Epidemiological Study of Myiasis in Hospital do Andaraí, Rio de Janeiro, with the Occurrence of an Exotic Etiological Agent. *Neotropical Entomology* 40: 393 – 397.
- FERREIRA MJM. 1983. Sinantropia de Calliphridae (Diptera) em Goiania, Goiás. *Revista Brasileira de Biologia* 43: 199-210.
- FERREIRA, M. J. M. & BARBOLA, I. F. 1998. Sinantropia de califórídeos (Insecta, Diptera) de Curitiba, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 58: 203-209.
- FURLANETTO SMP, CAMPOS MLC, HARSI CM. 1984. Microorganismos enteropatogenicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revta Microbiol.* 15: 170-174.
- GREENBERG B. 1971. Flies and disease. Vol.1. Princeton Univ. Press. Princeton.
- GREENBERG B. 1973. Flies and disease. Vol.2. Princeton Univ. Press. Princeton.
- GREENBERG, B. & M.L. SZYSKA. 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Arner* 77 (5): 488-517.
- GUIMARÃES, J. H; PRADO, A. P.; LINHARES, A. X., 1978. Three newly introduced species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista brasileira Entomologia* 22(1): 53-60.
- GUIMARÃES, JH., PRADO, AP. and BURALLI, M.,1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brasil (Diptera, Calliphoridae). *Revista brasileira Entomologia* 23(4): 245-255.
- IMBIRIBA, A. S.; D. T. IZUTANI; I. T. MILHORETO & E. LUZ. 1977. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 20: 35-39.
- MARCONDES, Carlos Brisola - Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças. Florianópolis, Editora da UFSC, 2006. 88p.
- NUORTEVA, P., 1963, Sinanthropy of blowflies (Dipt. Calliphoridae) in Finland. *Ann. Entomol. Fenn.* 29: 1-49.
- OSTESILE EB & DIPEOLU OO. 1981. A case of sheep strike in a neonatal lamb caused by *Lucilia cuprina*. *Zentrabl. Veterinarmed Reihe B* 28: 654-658.
- PARALUPPI, N.D.; CASTELLON, E. G. 1994. Calliphoridae (Diptera) em Manaus: I. Levantamento taxonômico e sazonalidade. *Revista Brasileira de Entomologia* 38: 661-668.

- PRADO, AP. And GUIMARÃES, JH. 1982. Estado atual da dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Revista brasileira Entomologia* 26 (3): 225-231.
- SOULSBY, E.J.L. 1969. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. London, Bailliere, Tindall and Cassell.
- ZUMPT, F. 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. London, Butterworths, 267p.

ANEXOS

ANEXO I



Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly

Adriana C.P. Ferraz^{1,2a*}, Daniele L. Dallavecchia^{2b}, Débora Cardoso da Silva^{1,2c}, Rafaela Pereira de Carvalho^{2d}, Renato Geraldo da Silva Filho^{2e}, Valéria M. Aguiar-Coelho^{2f}

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Rod. BR 465, Km 7, CEP 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil

² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO, Rua Frei Caneca, 94, Centro, CEP 20211-040 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the post-embryonic development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1818) (Diptera: Calliphoridae) reared on a diet of gizzard or gizzard/agar homogenate, with a diet of beef used as the control. Four replicates per treatment were performed (60 mL of each diet). The gizzard (60%), distilled water, and agar homogenate were combined in a blender. Each replicate consisted of 40 newly hatched larvae of *C. putoria* (5th generation). Each glass beaker containing a diet was inserted into a larger flask containing sawdust, which was covered with a nylon cloth held in place by an elastic band. The larvae were weighed and stored in test tubes sealed with a nylon cloth and an elastic band. The average temperature, measured with a thermohygrograph, was 20.6 °C, and the average relative humidity was 67.7%. The variation in the mean weight of mature larvae and in the duration of the larval, pupal, and total stages (newly hatched larvae to imagoes) were analyzed by Student's *t*-test ($\alpha = 5\%$), while viability was compared by ANOVA. The sex ratio was evaluated by the chi-squared test. The average duration of the period from the larval to imago stage was 8.868 days on the beef diet, 8.676 on the gizzard diet, and 9.067 on the gizzard/agar homogenate diet. Larval survival rates on these diets were 98, 92, and 73%, respectively, while pupal viabilities were 98, 91, and 71%, respectively, and larva-to-imago viabilities were 93, 83, and 64%, respectively. The duration of the pupal period differed significantly between the blowflies reared on the beef and gizzard/agar homogenate diets. The two diets proved to be good alternatives for rearing *C. putoria*.

Keywords: blowflies, fly breeding, maggots, protein, pupae

Correspondence: ^a adriana.pedroso7@yahoo.com.br, ^b danieledallavecchia@gmail.com, ^c dcardoso_rj@hotmail.com, ^d rafa.pereirari@hotmail.com, ^e rgbk@baktron.com.br, ^f valerialed@yahoo.com.br, * Corresponding author

Editor: Allen Cohen was Editor of this paper.

Received: 29 April 2009, **Accepted:** 22 December 2011

Copyright: This is an open access paper. We use the Creative Commons Attribution 3.0 license that permits unrestricted use, provided that the paper is properly attributed.

ISSN: 1536-2442 | Vol. 12, Number 43

Cite this paper as:

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Silva Filho RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science* 12:43 available online: insectscience.org/12.43

Introduction

Chrysomya putoria (Wiedemann 1818) (Diptera: Calliphoridae) is a blowfly distributed widely throughout Brazil (Guimarães et al. 1978) since its arrival in the country on ships hailing from Africa. This fly is important because it is a potential mechanical vector of type I and II poliovirus, Coxsackie viruses, *Shigella* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, and *Giardia lamblia*, as well as other enteric pathogens, irritants and destructive agents (Greenberg 1971, 1973; Furlanetto et al. 1984). Additionally, its larvae can produce secondary myiasis (Zumpt 1965). This blowfly is found on chicken farms (Guimarães 1984), where it breeds in liquid manure with greater than 75% moisture content (Bruno et al. 1993).

The larvae of the family Calliphoridae are detritivorous, feeding on feces or open sores, or acting as parasites (Brusca and Brusca 2007). The development rate of necrophagous insects can be affected by substances introduced through their diet (Introna et al. 2001). This may affect studies of these insects, such as those involving estimates of the post-mortem interval in forensic entomology, an analysis that is based on the period of development of these insects (Estrada et al. 2009).

Efficient diets are essential for the maintenance of large dipterous fly stocks in the laboratory, and for the production of pupae to breed the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis* (Walker 1836), a promising biological control agent that has been the focus of several studies (Marinho 2007; Barbosa et al. 2008; Mello and Aguiar-Coelho 2009).

Beef is an efficient diet for breeding larvae of necrophagous dipterans, but it releases a disagreeable odor characteristic of decomposing organic matter and increases the possibility of secondary contamination of other insects that are attracted to it (Estrada et al. 2009; Barbosa et al. 2004), in addition to being associated with high laboratory costs. Chicken gizzard also releases putrefaction odors, but its ready availability in markets and its lower cost have prompted studies to evaluate its potential as a food substrate for maintaining stocks of necrophagous dipterans such as *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1818). On the other hand, artificial diets allow for greater control of the effects of each ingredient, reducing the release of odors, and enabling the incorporation of other substances (i.e., for toxicity tests).

The purpose of this bioassay was to monitor the performance of newly hatched larvae of *C. putoria* reared on two natural diets (beef and gizzard) and an artificial diet (gizzard/agar homogenate).

Materials and Methods

The blowflies were reared in the Laboratory of Diptera Studies (LED) of the Department of Microbiology and Parasitology at UNIRIO – Federal University of the State of Rio de Janeiro, where the entire experimental part of this study was conducted. The *C. putoria* colony was started with imagoes collected at the Zoological Gardens of Rio de Janeiro, located in Quinta da Boa Vista Park in São Cristóvão, RJ, Brazil. Three traps were baited with sardines, as described by Ferreira (1978), and exposed for approximately 5 hours in the morning.

Imagoes and larvae of the muscoid dipteran were collected and taken to the LED, where they were examined and identified taxonomically, as described by Mello (2003). The blowflies were reared in plastic cages with a frontal opening covered with nylon fabric and were fed with water, a solution of honey and water (50%), and beef and chicken gizzard; the latter served as both sources of protein and substrates for egg laying and maturation.

Three treatments were carried out, each with four repetitions. The first served as the control (60 g of beef brisket in each repetition); the test diets consisted of chicken gizzard (60 g of gizzard per repetition) (T1) and a diet of gizzard homogenate in an agar solution with a concentration of 65% (60 mL for each repetition) (T2).

The homogenate was prepared in a blender in a concentration of three parts of gizzard to one part distilled water. The agar solution was prepared using bacteriological agar (agar-agar Micromed, www.drmicromed.com) (1.5%), following the instructions on its packaging; it was heated to 100 °C in distilled water until its complete dissolution, whereupon it was added to the homogenate. The content was mixed in test tubes with screw caps (20 × 150 mm), vortexed for approximately two min, and sterilized in an autoclave for 15 min at 121°C. After cooling, the test tubes were vortexed once more and their contents poured into 100 mL beakers.

The other treatments (beef and gizzard) involved thawing in a refrigerator for 24 hours prior to use, and then cutting the beef and gizzard into 1 cm³ cubes, which were then placed in the 100 mL beakers.

Each repetition involved 40 1st instar larvae of *C. putoria* of the 5th generation bred in the laboratory, which were handled with a paintbrush. Each 100 mL beaker of each repetition was placed in a larger beaker (400 mL) containing sterilized sawdust to allow the larvae to pupate when mature, after abandoning the diet. These larger beakers were also closed with nylon fabric secured with elastic bands.

Daily observations were made, always at the same time (12:00). The body mass of batches of five mature larvae was recorded on an analytical balance and the larvae were then stored in test tubes closed with nylon fabric secured with elastic bands to observe the emergence of the imagoes. Records were kept of the dates of pupation, emergence of imagoes, and sexual ratio, as well as morphological anomalies in the imagoes. The temperature and local relative air humidity were recorded using a thermo-hygrograph (maximum temperature: 26 °C, mean: 20.6 °C, minimum: 17.5 °C; maximum humidity: 83%, mean: 67.7%, minimum: 49%).

The raw data were analyzed using Microsoft Excel (www.microsoft.com), while the remaining analyses were performed with the STAT program. The variation between the mean weight of larvae and the duration of the larval, pupal, and total stages (newly hatched larva to imago) were analyzed using Student's *t*-test ($\alpha = 5\%$). The viabilities were compared by ANOVA. The sexual ratio was tested in relation to the expected frequency, using the chi-squared test (χ^2).

Results

No significant difference was found in the mean individual weight of the larvae in the three treatments: $p = 0.233$ (control vs. T1), p

■ 0.599 (control vs. T2), and $p = 0.152$ (T1 vs. T2) (Table 1).

With regard to the average duration of the larval stage (days), the three treatments showed no significant difference: $p = 0.116$ (control vs. T1), $p = 0.082$ (control vs. T2), $p = 0.631$ (T1 vs. T2) (Table 2). No significant difference was found between the average duration of the pupal stage (days) of the control and treatment 1 ($p = 0.371$) and between treatment 1 and treatment 2 ($p = 0.06$), but a significant difference was found between the control and treatment 2 ($p < 0.018$) (Table 2). The three treatments also showed no significant differences in the total average duration (newly hatched larva to imago): $p = 0.174$ (control vs. T1), $p = 0.179$ (control vs. T2), $p = 0.101$ (T1 vs. T2) (Table 2).

Figure 1 illustrates the pace at which mature larvae of *C. putoria* stopped feeding, pupated, and emerged as imagoes on the beef (control), gizzard (T1), and gizzard/agar homogenate (T2) diets. The T1 and T2 diets produced similar results in terms of emergence (peak on day 11), the end of feeding, and pupation. The peaks of the end of feeding and pupation of *C. putoria* reared on beef occurred one day later than on the other diets. The pace of emergence of males and females reared on the three diets (beef, gizzard, and gizzard/agar homogenate) was very similar (Figure 2).

The sexual proportions and ratios found were as follows: control (males ■ 58%, females ■ 42%, sexual ratio ■ 0.42), T1 (males ■ 55%, females ■ 45%, sexual ratio ■ 0.45), and T2 (males ■ 56%, females ■ 44%, sexual ratio ■ 0.44). The chi-squared tests indicated that the sexual proportions found in the three treatments did not differ from the expected ones (control: $\chi^2 = 3,699$; T1: $\chi^2 = 1,271$; T2:

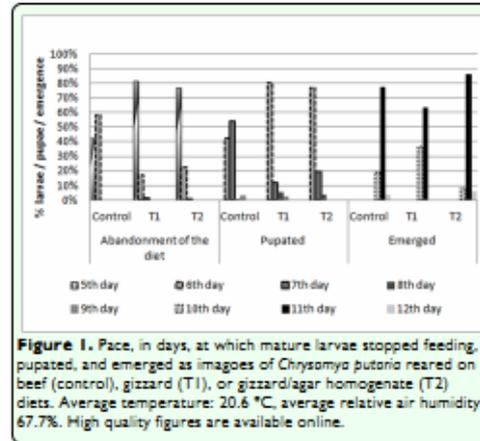


Figure 1. Pace, in days, at which mature larvae stopped feeding, pupated, and emerged as imagoes of *Chrysomya putoria* reared on beef (control), gizzard (T1), or gizzard/agar homogenate (T2) diets. Average temperature: 20.6 °C, average relative air humidity: 67.7%. High quality figures are available online.

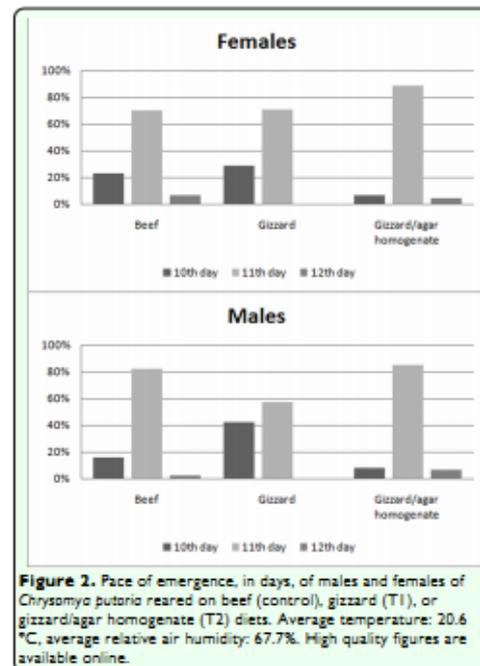


Figure 2. Pace of emergence, in days, of males and females of *Chrysomya putoria* reared on beef (control), gizzard (T1), or gizzard/agar homogenate (T2) diets. Average temperature: 20.6 °C, average relative air humidity: 67.7%. High quality figures are available online.

$\chi^2 = 1,412$; χ^2 indexed rate ■ 3.84, $gl = 1$, $\alpha = 5\%$). The three treatments produced 100% normal imagoes.

The viability of larvae, pupae, and total for

Table 1. Weight of larvae (g)* of *Chrysomya putoria* reared on three different diets at room temperature. Average temperature: 20.6 °C, average relative air humidity: 67.7%.

Diet	Mean ± SD	Range
Control (beef)	0.056 ^a ± 0.126	0.0408-0.0629
T1 (gizzard)	0.056 ^a ± 0.008	0.0371-0.0620
T2 (Gizzard/agar homogenate)	0.052 ^a ± 0.009	0.0360-0.0642

*Averages followed by the same letter do not differ significantly according to Student's t-test at a level of 5%. SD = standard deviation.

Table 2. Average duration of the post-embryonic stages of development of larvae of *Chrysomya putoria* reared on three different diets (beef, gizzard, and gizzard/agar homogenate) at room temperature*. Average temperature: 20.6 °C, average relative air humidity: 67.7%.

	Diets	Days			
		Mean	Minus	Plus	SD
Larvae	Control (beef)	4.050 ^a	4	7	0.068
	T1 (gizzard)	4.406 ^a	4	7	0.271
	T2 (gizzard/agar homogenate)	4.495 ^a	4	7	0.291
Pupal	Control (beef)	4.278 ^a	3	5	0.099
	T1 (gizzard)	4.365 ^a	2	6	0.218
	T2 (gizzard/agar homogenate)	4.696 ^a	2	6	0.105
Total	Control (beef)	8.868 ^a	8	10	0.102
	T1 (gizzard)	8.676 ^a	8	12	0.140
	T2 (gizzard/agar homogenate)	9.967 ^a	8	10	0.242

*Averages followed by the same letter in the same column do not differ significantly according to Student's t-test at a level of 5%. SD = standard deviation.

Table 3. Viabilities of the larval, pupal, and total (newly hatched larva to imago) stages of *Chrysomya putoria* reared on beef, gizzard, and gizzard/agar homogenate diets*. Average temperature: 20.6 °C, average relative air humidity: 67.7%.

Diets	Viability		
	Larval	Pupal	Total*
Control (beef)	98% ^a	98% ^a	93% ^a
T1 (gizzard)	92% ^{ab}	91% ^{ab}	83% ^{ab}
T2 (gizzard/agar homogenate)	73% ^b	71% ^b	64% ^b

*Total = period from newly hatched larvae to imagoes. Values followed by the same letter in the same column do not differ significantly according to ANOVA.

treatment 2 (gizzard/agar homogenate) differed significantly from the control: larva (control vs. T1: $p = 0.43$, control vs. T2: $p < 0.04$, T1 vs. T2: $p = 0.17$), pupa (control vs. T1: $p = 0.373$, control vs. T2: $p < 0.05$, T1 vs. T2: $p = 0.15$), and total (control vs. T1: $p = 0.43$, control vs. T2: $p < 0.04$, T1 vs. T2: $p = 0.20$). However, no significant difference was found between T1 and T2 (Table 3).

Discussion

The quantity of food in the three repetitions was enough for 1 g of diet per larva, which, according to Aguiar-Coelho and Milward-De-Azevedo (1996), is the ideal relative density of beef diet for different calliphorids. This parameter was carefully regulated to prevent the density from interfering in the evaluation of the efficiency of these diets by causing stress through exploitative competition for resources or through chemical changes in the food substrate resulting from the larval metabolism (Khazaeli et al. 1993; Bubli et al. 1998).

D'Almeida (1994) tested several diets for *C. putoria* and found that ground beef and fish were the most efficient diets. Leal et al. (1982) reported that *C. putoria* showed greater development on rat carcasses compared with artificial oligidic diets, and noted that beef is the natural diet of these calliphorids. According to Parra (2001), for an alternative diet to be considered efficient, it must have not only the nutritional aspects that meet the insect's needs but also the physical, chemical, and microbiological characteristics that enable the feeding process. The mean weight of the larvae reared on the three tested diets did not show a significant difference in this study, possibly indicating that the alternative diets (gizzard and gizzard homogenate) were efficient because their results were similar to those of the natural diet (beef). Nevertheless, the gizzard/agar homogenate diet appeared to be more easily solubilized by the larvae than the beef and gizzard. However, this did not make it unsuitable because diets with poor solubility result in pupae of low weight due to difficulties in digesting proteins and other elements of the medium (Chaudhury et al. 2000).

The durations of the post-embryonic stages of development (larval, pupal, and total) were also equivalent in the three diets, except for the duration of the pupal stage of the control (beef) and the gizzard/agar homogenate diets. According to D'Almeida et al. (2001), diets should be evaluated according to the duration of the period from newly hatched larvae to the emergence of imagoes; this is the most efficient method because it avoids distortions between the larval and pupal periods. Thus, one can consider that the diets supplied the needs of the insects because otherwise their feeding would have been delayed or even inhibited if there were a deficiency of essential nutrients (Chippendale 1978).

In exposed rabbit carcasses, the average duration of the development of *C. putoria* was 10 days in the summer of 2005, at a mean temperature of 20 °C, in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil (Kirst 2006). This was longer than the duration recorded in the present study, which varied on average from eight to nine days. However because the climate conditions were not controlled in either of these studies, it is possible that oscillations occurred during the periods of study. According to Higley and Haskell (2003), development time is dictated by temperature oscillations.

The sexual rates of the individuals reared on the three diets tested in this study indicated population stability, according to the chi-squared analysis and to the tenets of Fisher (1930), which state that a population will only show stability when the sexual ratio is 1:1; a sexual ratio with a deviation is not evolutionally stable because gradual increases in the proportion of the sex observed in lesser number will occur in future generations.

Because 100% of the dipterans were normal, we can consider that the density of dipterans in the diet was adequate for their development; this factor affects the phenotypic determination of bionomic traits and alters components that determine the adaptive value of organisms, as reported by Ribeiro et al. (1993), Reis et al. (1994), Roper et al. (1996), and Ribeiro (1998) in studies on Diptera. The absence of variations in symmetry indicates that no sufficiently intense disturbances occurred that could not be buffered or neutralized through metabolic adjustments to ensure homeostatic stability in the patterns of development (Lomonaco and Germanos 2001).

As for larval viability, it is known that some larvae eat more than the minimum required for survival, while others eat the minimum necessary, and still others are not able to ingest the minimum needed to pupate and thus die (De Jong 1976). In our study, the control and gizzard diets achieved high rates of larval, pupal, and total viabilities, while the viabilities of larvae on the gizzard/agar homogenate diet were significantly lower than those of the control, despite reaching weights equivalent to the larvae reared on the other diets. Smaller larvae are at a disadvantage in competition with larger ones, taking longer to pupate and covering longer distances to do so or to look for more food (Gomes et al. 2002). The larval viability rate in the gizzard homogenate diet was 73% (60 g of diet for 40 larvae = 1.5 g of diet per larva), presenting a similar rate to that reported by Godoy et al. (1996), who used an artificial diet, and the rate reported by Leal et al. (1982), of 73.25% at a density of 50 g of diet for 100 larvae (0.5 g of diet per larva) and at the 20 other densities tested with smaller quantities of diets fed to larvae. The diet used by Leal et al. (1982) has been used by several other authors

(Von Zuben et al. 2000; Estrada et al. 2009), and the achievement of a similar viability indicates a good result.

The use of larval therapy requires knowledge of the behavior of larvae in the presence of medicines that patients with a potential for this type of treatment may be using, such as antibiotics to prevent or fight infections. The artificial diet tested here would allow for the dissolution of such medicines in order to observe potential reactions of dipterans to their presence in the food substrate. Moreover, the fact that the diet contains few ingredients is an advantage when the aim is to test the influence of chemical products on the development of insects because the insect will be less affected by the medium when they are added to this diet. Similarly, chemical substances such as medicines could also cause changes in the development of dipterans and thus alter estimates of the post-mortem interval in forensic studies. Torres (2005) notes that experiments have been performed which involved the addition of antimicrobials to artificial diets for insect larvae to prevent their contamination by microorganisms and test the activity of these drugs in larval development and maturation.

The agar base used in our artificial diet has already been employed to create diets for other insects, most of them of agricultural interest (Panizzi and Parra 1991), and was chosen as a component due to its firm gel density at temperatures close to 37 °C (Insumos 2008) in an attempt to mimic the consistency of beef. Moreover, agar is nontoxic to the majority of microorganisms and humans, is non-absorbable, non-fermentable, and its composition consists mostly of fibers and mineral salts (P, Fe, K, Cl, I), cellulose, anhydrogalactose, and a small quantity of proteins (Insumos 2008).

The authors that tested diets for calliphorids include Paes and Milward-De-Azevedo (1998), Nespoli et al. (1998), and Paes et al. (2000), who examined the effect of natural diets in different stages of decomposition on the post-embryonic period of dipterans, as well as Cunha-e-Silva and Milward-De-Azevedo (1994), Leal et al. (1982, 1991), D'Almeida et al. (2000), and Mendonça et al. (2009), who tested artificial diets. The latter diets may be advantageous due to the possibility of higher nutritional and biological uniformity of the colonies over time (Parra 2001). The gizzard/agar homogenate diet tested here proved to be efficient for this purpose. Similarly, alternative diets such as chicken gizzard can also be used due to their lower cost in comparison to beef, favoring the development of projects and research that require the maintenance of large stocks of dipterans for long periods.

Acknowledgements

The author gratefully acknowledges CNPq, UNIRIO, FINEP, and FAPERJ (Brazil) for their financial support of this work.

References

- Aguiar-Coelho VM, Milward-De-Azevedo EMV. 1996. Relações intraespecíficas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Diptera) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira Entomologia* 41: 35-40.
- Barbosa LS, Jesus DML, Aguiar-Coelho VM. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya*

- megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências*. 6: 207-217.
- Barbosa LS, Couri MS, Aguiar-Coelho VM. 2008. Desenvolvimento de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae), utilizando diferentes densidades do parasitóide. *Biota Neotropica* 8: 1-6.
- Bruno TV, Guimarães JH, Santos AMM, Tucci EC. 1993. Moscas sinantrópicas (Diptera) e seus predadores que se criam em esterco de aves poedeiras confinadas, no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira Entomologia* 37: 577-590.
- Brusca RC, Brusca GJ. 2007. *Invertebrados*, 2nd edition. Guanabara Koogan.
- Bubli AO, Imasheva AG, Loeschcke V. 1998. Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* 52: 619-625.
- Chaudhury MF, Alvarez LA, Velasquez LL. 2000. A new meatless diet for adult screwworm (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Economic Entomology* 93: 1398-1401.
- Chippendale GM. 1978. In: Parra JRP, Editor. *Técnicas de Criação de Insetos para Programas de Controle Biológico*. pp. 125. ESALQ.
- Cunha-e-Silva SL, Milward-de-Azevedo EMV. 1994. Estudo comparado do desenvolvimento pós-embriônico de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) em duas dietas à base de carne, em laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 11: 659-668.
- D'Almeida JM. 1994. *Substratos de criação de dípteros calíptros (Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae) em condições naturais e de laboratório*. Ph.D. thesis, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.
- D'Almeida JM, Fraga MB, Ferro CL. 2000. Desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em dietas artificiais. *Entomologia y Vectores* 7: 155-162.
- D'Almeida JM, Ferro CL, Fraga MB. 2001. Desenvolvimento pós-embriônico de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) em dietas artificiais. *Acta Biologica Leopoldensia* 23: 25-30.
- De Jong G. 1976. A model of competition for food. I. Frequency dependent viabilities. *American Naturalist* 100: 1013-1027.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX. 2009. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotropical Entomology* 38: 203-207.
- Ferreira MJM. 1978. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Revista Brasileira de Biologia* 38: 445-454.
- Fisher RA. 1930. Seleção gênica. In: Futuyma DJ, Editor. *Biologia Evolutiva*. pp. 631. Sociedade Brasileira de Genética.
- Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM, Ishihata GK. 1984.

- Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15: 170-174.
- Gomes L, Von Zuben CJ, Govone JS. 2002. Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. *Entomologia y Vectores* 9: 115-132.
- Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22: 53-60.
- Greenberg B. 1971. *Flies and Disease, volume 1. Ecology, Classification and Biotic Association*. Princeton University Press.
- Greenberg B. 1973. *Flies and Disease, volume 2. Biology and Disease Transmission*. Princeton University Press.
- Guimarães JH. 1984. Considerações gerais sobre moscas do gênero *Chrysomya* no Brasil. *Agroquímica Ciba Geigy* 24: 7-14.
- Higley LG, Haskell NH. 2003. Insect development and forensic entomology. In: Byrd JH, Castner JL, Editors. *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations*. pp. 389-406. CRC Press LLC.
- Insumos. 2008. Agar ou Agar-agar: o mais antigo ficolóide. *Aditivos Ingredientes* 56: 31-39. Available online, http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Khazaeli AA, Fukvi HH, Curtsinger JW. 1993. Egg and larval densities and survival rates in an inbred line of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 72: 142-143.
- Kirst FD. 2006. Período de desenvolvimento de dípteros necrófagos em carcaça de coelho (*Oryctolagus cuniculus* L.) no extremo sul do Brasil. *Monografia Universidade Federal de Pelotas*.
- Leal TTS, Prado AP, Antunes JÁ. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chlopyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 41-44.
- Leal TTS, Antunes JA, Prado AP. 1991. Growth of *Chrysomya putoria* blowfly larvae in relation to dietary casein concentration. *Medical and Veterinary Entomology* 5: 139-141.
- Lomônaco C, Germanos E. 2001. Variações Fenotípicas em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em Resposta à Competição Larval por Alimento. *Neotropical Entomology* 30: 223-231.
- Marinho RC. 2007. Estudo da relação parasitóide *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) utilizando como hospedeiro *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em laboratório. Dissertação Mestrado em Biologia Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil.
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera,

- Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores* 10: 255-268.
- Mello RS, Aguiar-Coelho VM. 2009. Durations of immature stage development period of *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera, Pteromalidae) under laboratory conditions: implications for forensic entomology. *Parasitology Research* 104: 411-418.
- Mendonça PM, Queiroz MMC, D'Almeida JM. 2009. Rearing *Chrysomya megacephala* on artificial diets composed of varying concentrations of albumin. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 52: 421-426.
- Nespoli PEB, Queiroz MMC, Ribeiro RC, Milward-de-Azevedo EMV. 1998. Desenvolvimento pós-embriônico de duas populações de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) criadas em carne em diferentes estágios de decomposição. *Revista Brasileira de Entomologia*. 41: 133-136.
- Paes MJ, Milward-de-Azevedo EMV. 1998. Desenvolvimento pós-embriônico de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) criada em dietas naturais processadas em condições controladas. *Parasitologia al dia* 22: 90-96
- Paes MJ, Brito LG, Branco MC, Moya-Borja GE. 2000. Desenvolvimento pós-embriônico de *Lucilia cuprina* (Wied., 1830) (Diptera: Calliphoridae) criada em dieta a base de carne em diferentes estágios de putrefação. *Parasitologia al dia* 24: 102-108.
- Panizzi AR, Parra JRR. 1991. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas*. Manole.
- Parra JR. 2001. *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*, 6th edition. ESALQ/FEALQ.
- Reis SF, Stangenhans G, Godoy WAC, Von Zuben CJ, Ribeiro OB. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função da densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 38: 33-46.
- Ribeiro OB, Prado AP, Guimarães JH. 1993. Competição intra-específica em *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1983) (Diptera, Calliphoridae) em meio artificial. *Revista Brasileira de Entomologia* 37: 641-652.
- Ribeiro OB. 1998. Dynamics of equilibrium in experimental populations of *Cochliomya macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 42: 43-51.
- Roper C, Pignatelli P, Partridge L. 1996. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* life history to differences in larval density. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 609-622.
- Torres MLM. 2005. Efeito de quarto antibióticos sobre larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) utilizadas em bioterapia. Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.
- Von Zuben CJ, Stangenhans G, Godoy WAC. 2000. Competição larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): efeitos de diferentes níveis de agregação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo. *Revista Brasileira de Biologia* 60: 195-203.

Zumpt F. 1965. *Myiasis in man and animals in the old world*. Butterworths.

ANEXO II

Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of Old World screwworm fly *Chrysomya putoria* (Artigo submetido e em análise na Journal Insect Science)

Adriana C. P. Ferraz^{1,2}, Daniele L. Dallavecchia², Débora Cardoso da Silva^{1,3}, Rafaela Pereira de Carvalho², Renato Geraldo da Silva Filho², Valéria M. Aguiar-Coelho²

¹ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de pós-graduação. Rod. BR 465, Km 7, CEP 23890-000 Seropédica, RJ, Brazil. <adrianapedroso7@yahoo.com.br>

² Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rua Frei Caneca, 94, Centro, CEP 20211-040 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. <danieledallavecchia@gmail.com>; <rafa_pereirarj@hotmail.com>; <rgbk@baktron.com.br>; <valerialed@yahoo.com.br>

³ Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, Praça Primavera s/n, Bairro Primavera, CEP 45700-000, Itapetinga, BA, Brasil. <dcardoso_rj@hotmail.com>

ABSTRACT

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) is a species with potential for maggot therapy practice and has also been described in myiasis and forensic entomology studies. The objective of the present study was to assess the action of different ciprofloxacin concentrations on the growth and development of the species. First instar maggots of the third generation in the 60 g on chicken gizzard homogenate in 65% agar diet received ciprofloxacin chloridrate. Each concentration of the antibiotic tested (3.33 µg/mL; 6.66 µg/mL and 13.33 µg/mL) and the control were replicated four times (40 maggot/replication). The control received distilled water instead of the antibiotic. Each beaker of each replication (100 mL) was inserted in a larger beaker (400 mL) containing sawdust and sealed with escaline nylon fabric and elastic. The maggot were kept in a acclimatized chamber at 30°C day and 28°C night, 70 ± 10% R. H. and 14 hour photoperiod. Observations were made daily. The maggot, after abandoning the diet, were weighed in batches of five on analytic scales and stored in test tubes sealed with escaline nylong fabric and elastic. The pupation and adult emergence dates were recorded and the sex ratio and adult morphological abnormalities. Microsoft Excel and STAT were used for the analysis. The variation among the maggot weight means and the duration of the maggot, pupa and total stages were analyzed by the Student t-test ($\alpha=5\%$); the viabilities and the normality rates compared by ANOVA, the expected sex ratio frequency was tested by the chi-squared test (χ^2). There was no significant difference among the four treatments regarding mean individual maggot weight (T1:0.049g, T2:0.034g, T3:0.029g, T4:0.030 g), mean duration of the maggot inoculation until abandonment (4.478; 4.138; 4.019; 4.000 days) and the maggot (5.477; 5.234; 5.000; 5.000 days), pupa (3.874; 3.937; 2.986; 3.974 days) and total stages (9.339; 9.158; 8.981; 8.953 days), respectively, for the control, T1, T2 and T3. The sex ratios found in the four treatments did not differ from the expected. The normality rates were control=100%, T1=96%, T2=98% and T3=99%. Only treatment 2 differed significantly from the control in maggot and total viability. The antibiotic seemed not to alter *C. putoria* development in the post-embryonic period.

Keywords: blowflies, drug, maggots, pupae

INTRODUCTION

Antimicrobial agents are medications used to eliminate different genera of microorganisms. The different antimicrobial genera existing include those commonly used, such as norfloxacin, ciprofloxacin, nitrofurantoin, ampicin and sulfametoxazol/trimetropin. Ciprofloxacin is a wide spectrum therapeutic chemical used to treat pathologies caused by gram-positive and gram-negative sensitive microorganisms (DEF 2001; Korolkovas 2002; Martindale 2002), appropriate for the treatment of infections caused by pathogens sensitive to the drug: infection of the upper respiratory tract, ear, nose and throat, maxillofacial area, urinary and kidney tracts, gastrointestinal tract (including typhoid fever), bile duct, soft tissues and infected wounds, bones and joints, gynecological and obstetric infections, septicemia, meningitis, peritonitis, infections or imminent risk of infection (prophylaxis) in patients with immune suppression (Quinoflox 2011)

Many wounds as mentioned above can be treated alternatively with the use of maggot therapy, also known as maggot debridement therapy, biotherapy or biosurgery, that consists of applying live fly maggots (Diptera: Calliphoridae) to wounds that do not heal with the objective of removing the necrotic material and promoting new tissue growth. Its use and popularization have increased in many countries due to the great efficacy of the maggot in removing necrotic material and its safe and easy application (Sherman et al. 2000; Martini and Sherman 2003; Marcondes 2006; Dallavechia et al. 2010. 2011). *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1830) (Diptera: Calliphoridae) is easily obtained throughout the Brazilian territory, it is easy and cheap to rear, its maggots develop quickly and their behavior and biology are compatible with use in maggot therapy (Marcondes 2006; Oliveira-Costa 2011). When choosing this technique it is important to know the action on the maggot of the antibiotics used in conjunction because these may influence their natural activities and survival.

Similarly, the patients carriers of myiasis often use antibiotic therapy in association to the treatment because they present an unsatisfactory clinical condition, with other associated infirmities and skin wounds that are normally very contaminated (Ferraz et al. 2008. 2010), therefore the use of antibiotics would help healing so that it is necessary to know the effects of these antibiotics on the maggot.

Necrophage insect development rates can be affected by substances introduced in their organism through their food (Introna et al. 2001) and this can affect studies on these insects such as those linked to the post mortem interval estimate (PIE) in forensic entomology, because this analysis is based on the development period of these insects (Estrada et al. 2009).

Chrysomya putoria is a species with potential for maggot therapy practice and has also been described in myiasis and forensic entomology studies. The objective of the present study was to assess the action of different antibiotic concentrations on the growth and development of the species.

MATERIALS AND METHODS

The dipterans used throughout the experiment were reared in the Dipterans Study Laboratory (LED), Department of Microbiology and Parasitology at the Federal University of the State of Rio de Janeiro (UNIRIO).

The *C. putoria* colony was started with adults collected in the Zoological Garden in Rio de Janeiro located in the Quinta da Boa Vista, São Cristóvão, RJ. Three traps were used following the model by Mello et al. (2007), containing sardine as bait and exposed for approximately 5 hours in the morning. After collecting adults and dipteran maggots, the insects were taken to the LED where they were screened and identified taxonomically

according to Mello et al. (2003). The flies were reared in transparent plastic cages (40x30x20cm) with an opening in the upper part for airing and a front opening for access to the inside of the cage covered with nylon fabric. They were fed water, honey and water solution (50%) and chicken gizzard or beef as protein source, oviposition substrate and ovary maturation.

The first instar maggots of the third laboratory generation were transferred using a fine brush to 100 mL glass beakers each containing 60 g 60 grams chicken gizzard homogenate in 65% agar diet (Ferraz et al. 2012). The diet was selected because it was practical to homogenize substances to be tested and sterile (autoclaved) that makes the antibiotic completely available to act only on the inserted maggot. The antibiotic used was 400 mg Hifloxan[®] (ciprofloxacin chloridrate). Each replication received 1 mL of the antibiotic at three different concentrations resulting in the following concentrations in the diet: 3.33 µg/mL; 6.66 µg/mL and 13.33 µg/mL. The concentrations were chosen from ciprofloxacin serial concentration (500mg via oral 12/12h: 2.97 µg /mL, 400mg intravenous 12/12h: 4.56 µg /mL). The first concentration chosen (T1) would have an approximate value between the oral and intravenous serum concentrations, the second concentration (T2) would be approximately the double of the first, and the third concentration (T3) would be approximately 4 times great. Each concentration of the antibiotic tested and the control were replicated four times with 40 maggots in each replication. The control received distilled water in the place of the antibiotic.

Each beaker of each replication was inserted in a larger beaker (400 mL) containing sterilized sawdust to allow maggot pupation when mature after abandoning the diet and sealed with nylon fabric and elastic. The maggots were kept in an acclimatized chamber at 30°C day and 28°C night, 70 ± 10% R.H. and 14 hour photoperiod. Observations were made daily, always at the same time (12 p.m.).

The maggots, after abandoning the diet, were weighed in batches of five on analytical scales and stored in test tubes sealed with nylon fabric and elastic to observe adult emergence. The dates of pupation and adult emergence were recorded along with the sex ratio and adult morphological abnormalities.

The Microsoft Excel program was used for the gross data analysis and the PAST program for the other analyses. The variation among the maggot weight means and the durations of the maggot, pupa and total stages (neolarvae and adults) were analyzed by the Student t-test($\alpha=5\%$). The viability and normality rates were compared by ANOVA. The sex ratio was tested in relation to the expected frequency by the chi-square test (χ^2).

RESULTS

There was no significant difference among the four treatments for the mean individual maggot weight (Table 1) and no significant difference among the four treatments regarding the mean duration of the inoculation of the maggots until abandonment and the maggot, pupa and total stages (days) (Table 2).

Figure 1 shows the diet abandonment rhythm of the *C. putoria* maggots, pupation and emergence (%) of in the four different treatments (control: chicken gizzard homogenate in 65% agar diet; T1: chicken gizzard homogenate in 65% agar diet plus 3.33 µg/mL ciprofloxacin; T2: chicken gizzard homogenate in 65% agar diet plus 6.6 µg/mL ciprofloxacin, T3: chicken gizzard homogenate in 65% agar diet plus 13.33 µg/mL ciprofloxacin). Diet abandonment peaked in the control on the fourth and fifth days, while in the treatments with antibiotic it peaked predominantly on the fourth day. The control pupation peaked on the fifth and sixth days, while the other treatments peaked on the fifth day. Emergence peaked on the ninth day in all the treatments.

The *C. putoria* male and female emergence rates by days were similar (Figure 2). The sex ratios found were (males=47%, females=53%), T1 (males =55%, females =45%), T2 (males =50%, females =50%) and T3 (males =44%, females =56%). The chi-square tests showed that the sex ratios observed in the four treatments did not differ from the expected (Control: $\chi^2=0.398$, T1: $\chi^2=0.909$, T2: $\chi^2=0.009$, T3: $\chi^2=1.923$, χ^2 from table with 1 df $\alpha=5\%$ (5% probability) is 3.84).

Only the control presented 100% normal adults (T1=96%, T2=98%, T3=99%). However, there was no significant statistical difference among the treatments (Control x T1 ($p=0.192$), Control x T2 ($p=0.073$), Control x T3 ($p=0.356$), T1 x T2 ($p=0.408$), T1 x T3 ($p=0.249$), T2 x T3 ($p=0.463$)). Regarding the maggot, pupa and total viabilities, only treatment 2 differed significantly from the control in the maggot and total viabilities (Table 3)

DISCUSSION

Different concentrations of the same antibiotic need to be tested because the same antimicrobial added to diets may be safe, inhibitory or highly damaging depending on the concentration used (Singh and House 1970). A quantity of diet was used in the four applications that provided more than 1 g diet per maggot, because this was reported by Aguiar-Coelho and Milward-de-Azevedo (1996) as the ideal density for using meat in different caliphoridae. This care was taken so that the density did not interfere in the assessment of the efficiency of these diets causing stress by exploitative competition for resources or chemical alterations in the food substrate resulting from the maggot metabolism (Khazaeli et al. 1993; Bubli et al. 1998). Considering that 100% normal dipterans were obtained in the control and other values in the other treatments did not differ significantly from the control, it can be considered that the dipterans density on the diet was adequate for their development and it can also be assumed that the ciprofloxacin antibiotic do not affect the phenotype. Density influences the phenotype determination of bionomic traits and alters determining components of the adaptive value of the organisms, as reported by Ribeiro et al. (1993), Reis et al. (1994), Roper et al. (1996), Ribeiro (1998) in studies using dipterans. When there are no variations in the symmetry it means that sufficiently intense disturbances were not produced, that could not be buffered or neutralized with metabolic adjustments to guarantee homeostatic stability in the development patterns (Lomonaco and Germanos 2001).

Although not significant, the treatments with antibiotic presented variation intervals in individual weight with minimum values (Control>T1>T2>T3) and maximum values (Control>T1>T3>T2) smaller than the control. These values were also lower than those reported by Ferraz et al. (2012) who used meat, chicken gizzard and chicken gizzard homogenate in 65% agar diet to rear *C. putoria*. The total duration of the maggot development stage was longer in the present experiment. This is very understandable because meat is the natural diet of this species (Leal et al. 1982).

A study compared the development of *Cochliomyia macellaria* (F.) (Diptera: Calliphoridae) in sterile medium with and medium with bacteria and it was observed that they survived in the sterile medium with a faster development rate and greater survival than in the medium with bacteria (Ahmad et al. 2006). In the present study, the rhythm of the maggots abandoning the diet, pupation and emergence tended to be earlier in the treatments with antibiotic compared to that of the control. As the maggots used in this experiment were not sterile, they probably took bacteria to the culture media that may have been neutralized in the culture media with antibiotics, but not in the control.

The main period of food resource limitation in Calliphoridae is in the maggot period, when the maggots ingest the maximum amount of food in the shortest time interval

(Goodbrod and Goff, 1990). A longer feeding period can also occur to compensate the poor nutritional quality of the food (Kamal 1958; Levot et al. 1979; Paes et al. 2000). In the present study, the less time the insect stayed on the diet (abandonment) the lower was its weight (Control>T1>T3>T2)

The gender rates of the individuals in the four different treatments in the present study indicated stability in the population according to the chi-square analysis and the concepts by Fisher (1930): only when the sex ratio is 1:1 will there be stability in the population; a sex ratio with deviation is not evolutionarily stable because in future generations there will be gradual increases in the proportion of the sex observed in smaller number.

The ciprofloxacin antibiotic did not alter the mean maggot weight of *C. putoria* or the duration of the post-embryonic stages, or the sex ratio of these dipterans. Some studies on the effects of other substances on *C. putoria* maggot development have reported different results. Carvalho (2004) studied the effect of cocaine, exposing livers containing the substance to feed *C. putoria* and observed that the *C. putoria* maggots exposed to the drug developed significantly faster compared to the control. It was also reported that the maggot exposed to liver containing cocaine started and ended the pupation process before those of the control, but emergence was similar.

Another substance that accelerated *C. putoria* maggot development was diazepam and the maggots were heavier than the control maggots (Carvalho et al. 2001). The amphetamine anphepramon also accelerated *C. putoria* development by approximately 48 hours (Carvalho, 2004). The analgesic scopolamine retarded development in groups with higher concentration (Grella et al. 2007) and the amphetamine increased the *C. putoria* pupation period (Nitsche 2010)

In the present study, ciprofloxacin only altered the maggot and total viabilities statistically and significantly in treatment 2. The T2 viabilities were greater, but those of the other treatments were also high. In dipterans, viability of over 60% is considered promising (Loureiro et al. 2005). There is also the possibility that the maggots did not metabolize the drug, as reported by Grella and Thyssen (2008) in a study on immature *C. albiceps*, *C. megacephala* and *C. putoria*, reared on artificial diet with the addition of oxycodone chloridrate where significant differences were not observed in the development among the control and experimental groups.

It is a fact that insects absorb substances used by humans, even toxins and controlled substances have been detected both in the insect and the quitinized remains removed from victims at an advanced stage of decomposition (Goff and Lord 2001). Thus it is necessary to study the effects that drugs and toxins exercise on maggot development because acceleration or delay in these rates can interfere in the postmortem interval estimates when based on the biology of these insects (Goff et al. 1992, Carvalho et al. 2001, Grella and Thyssen 2008). In Campinas, SP, Brazil, from 1993 to 1998, *C. putoria* was among the most frequent insect in morgue and field collections and was also considered as a forensic indicator for the area (Carvalho et al. 2000).

Sherman et al. (1995) carried out an experiment on the action of seven antibiotics on *Lucilia sericata* maggot and pupa growth and developmeny, used in maggot therapy and the drugs belonging to the penicillin, cefalosporin and aminoglycoside classes. These were added to agar-liver culture medium at several concentrations where one-day-old maggots were placed and the results observed regarding their maturing, pupation and adult numbers, duration of each stage and pupa weight. The authors concluded that interference was not observed on maggot growth or maturing, a very similar finding to that of the present study. *C.*

putoria maggots have already been used successfully for maggot therapy in Wistar rats but these maggots have not yet been used in humans in Brazil for lack of studies.

Therefore, studies such as the present will help in the uses of *C. putoria* in a forensic entomology, maggot therapy and clinical myiasis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CNPq, FINEP, UNIRIO and FAPERJ for funding the study.

REFERENCES

- Aguiar-Coelho VM, Milward-de-Azevedo EMV. 1996. Relações intraespecíficas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (Calliphoridae, Diptera) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira Entomologia* 41: 35-40.
- Ahmad A, Broce A, Zurek L. 2006. Evaluation of significance of bacteria in larval development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 43(6):1129-1133.
- Bubli AO, Imasheva AG, Loeschcke V. 1998. Selection for knockdown resistance to heat in *Drosophila melanogaster* at high and low larval densities. *Evolution* 52: 619-625.
- Carvalho, LML, Thyssen PJ, Linhares AX, Palhares FB. 2000. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 (1): 135-138.
- Carvalho LML, Linhares AX, Trigo JR. 2001. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Science International* 120: 140-144.
- Carvalho, LML. 2004. Detecção e efeito de drogas no desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), duas moscas varejeiras de interesse forense. *Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Parasitologia*.
- Dallavecchia DL, Proença BN, Coelho VMA. 2011. Bioterapia: uma alternativa eficiente para o tratamento de lesões cutâneas. *Revista de pesquisa: cuidado é fundamental online* 3(3): 2071-79.
- Dallavecchia, DL, Silva Filho RG, Figueiredo, NMA, Aguiar-Coelho VM. 2010. Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. *Revista de pesquisa: cuidado é fundamental online* 2 (Ed. Supl.): 1-4.
- DEF 2001/2002: *Dicionário de especialidades farmacêuticas*, 30ª edição. Publicações Científicas.
- Estrada DA, Grella MD, Thyssen PJ, Linhares AX. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Ferraz ACP, Bosisio DD, Aguiar-Coelho VM. 2011. Dieta para larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *EntomoBrasilis* 4 (3): 125-129

- Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP; Silva Filho, RG, Aguiar-Coelho VM. 2012. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science*, in prelo.
- Ferraz ACP, Proença B, Gadelha BQ, Faria LM, Barbalho MGM, Aguiar-Coelho VM, Lessa CSS. 2010. First Record of Human Myiasis Caused by Association of the Species *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae), and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) *Journal of Medical Entomology* 47(3):487-490.
- Ferraz, ACP, Nunes RV, Gadelha BQ, Nascimento BP, Barros PREM, Coelho VMA, Lessa CSS. 2008. Raro caso de miíases por *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) e *Dermatobia hominis* (Diptera: Oestridae) em paciente humano. *Arquivo Ciências da Saúde* 15: 142–144.
- Ferreira MJM. 1978. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Revista brasileira de Biologia* 38 (2): 445-454.
- Fisher RA. 1930. Seleção gênica. In: Futuyma DJ, editor. *Biologia Evolutiva*, pp. 631. Sociedade Brasileira de Genética.
- Goff ML, Lord WD. 2001. Entomotoxicology: Insects as toxicological indicators and the impact of drugs and toxins on insect development In: Byrd JH, Castner JL, editors. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*, pp 331–340. CRC.
- Goff ML, Brown WA, Omori AI. 1992. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. *Journal of Forensic Sciences* 37(3):867-872.
- Grella MD, Thyssen PJ. 2008. Qualitative analysis of the effect of oxycodone (opioid analgesic) on the development rate of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and its importance for estimating of the post-mortem interval in Brazil. Annals of XXIII International Congress of Entomology, Durban, Africa.
- Grella MD, Estrada DA, Thyssen P J. 2007. Scopolamine effect on the development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) and its importance for the post mortem interval estimate. *Entomologia mexicana* 6: 870-873.
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Science International* 120: 42-47.
- Korolkovas A. 2002. *Dicionário terapêutico Guanabara 2002/2003*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.18.31-18.32.
- Khzaeli AA, Fukvi HH, Curtsinger JW. 1993. Egg and larval densities and survival rates in an inbred line of *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service* 72: 142-143.
- Leal TTS, Prado AP, Antunes JA. 1982. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chlopyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 41- 44.
- Lomônaco C, Germanos E. 2001. Variações Fenotípicas em *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae) em Resposta à Competição Larval por Alimento. *Neotropical Entomology* 30: 223-231.
- Loureiro MS, Oliveira VC, D'almeida JM. 2005. Desenvolvimento pós-embriônico de *Pattonella intermutans* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae) em diferentes dietas. *Revista Brasileira de entomologia* 49 (1): 127-129
- Marcondes CB. 2006. *Terapia larval de lesões de pele causadas por diabetes e outras doenças*. Florianópolis, Ed. UFSC, 88p.
- Martindale, 2002. Martindale: the complete drug reference. 33. ed. Grayslake: Pharmaceutical Press, 2002. p. 123.

- Martini RK, Sherman RA. 2003. 2003. Terapia de Desbridamento com larvas. *Jornal Brasileiro de Medicina* 85(4): 82-85.
- Mello RP. 2003. Chave para identificação das forma adultas da espécies da família Calliphoridae (Diptera: Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores* 10 (2): 255-268.
- Mello RS, Queiroz MMC, Aguiar-Coelho, VM. 2007. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia Série Zoologia* 97(4): 481-485.
- Nitsche MJT. 2010. Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar*. Tese Apresentada Ao Instituto De Biociências, Campus De Botucatu, Unesp, Botucatu – Sp.
- Quinoflox: cloridrato de ciprofloxacino. São Paulo: Biolab Sanus, 2011. Bula de remédio. (<http://www.bulas.med.br/bula/3433/quinoflox.htm>)
- Reis SF, Stangenhans G, Godoy WAC, Von Zuben CJ, Ribeiro OB. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função da densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 38: 33-46.
- Ribeiro OB, Prado AP, Guimarães JH. 1993. Competição intra-específica em *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1983) (Diptera, Calliphoridae) em meio artificial. *Revista Brasileira de Entomologia* 37: 641-652.
- Ribeiro OB. 1998. Dynamics of equilibrium in experimental populations of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 42: 43-51.
- Roper C, Pignatelli P, Partridge L. 1996. Evolutionary responses of *Drosophila melanogaster* life history to differences in larval density. *Journal of Evolutionary Biology* 9: 609-622.
- Sherman RA, Hall MJR, Thomas S. 2000. Medicinal Maggots: An Ancient Remedy for Some Contemporary Afflictions. *Annual Review of Entomology* 45: 55-81.
- Sherman RA, Wyle FA, Thrupp L. 1995. Effects of Seven Antibiotics on the Growth and Development of *Phaenicia sericata* (Diptera: Calliphoridae) Larvae. *Journal of Medical Entomology* 32(5): 646-649.
- Singh P, House HL. 1970. Antimicrobials: 'Safe' levels in a synthetic diet of an insect, *Agria Affinis*. *Journal of Insect Physiology* 16: 1769-1782.

Table 1: Maggot weight (g)* of *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) from four treatments with different ciprofloxacin concentrations** reared in an acclimatized chamber (30°C day and 28°C night, 70 ± 10% R.H. and 14 hours photoperiod).

Treatments	Average individual weight (g) ± standard deviation	Range	<i>p</i> = significance value (test t)			
			Control	T1	T2	T3
Control	0,049a±0,007	0,035-0,059	-	0,231	0,182	0,371
T1	0,034a±0,021	0,011-0,058	0,231	-	0,793	0,710
T2	0,029a±0,024	0,007-0,053	0,182	0,793	-	0,544
T3	0,039a±0,018	0,006-0,054	0,371	0,710	0,544	-

* Means followed by the same letter do not differ significantly by the t test ($\alpha=5\%$).

** Control = chicken gizzard homogenate in 65% agar diet; T1= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 3.33 µg/mL ciprofloxacin; T2= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 6.66 µg/mL ciprofloxacin, T3= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 13.33 µg/mL ciprofloxacin

Table 2: Mean duration of the post-embryonic* development stages (days) of *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) from four treatments with different ciprofloxacin concentrations** reared in an acclimatized chamber (30°C day and 28°C night, 70 ± 10% R.H. and 14 hours photoperiod).

		Days	Standard Deviation	<i>p</i> = significance value (test t)			
				Control	T1	T2	T3
Duration until abandonment	Control	4,478a	0,517	-	0,264	0,127	0,117
	T1	4,138a	0,192	0,264	-	0,266	0,230
	T2	4,019a	0,038	0,127	0,266	-	0,679
	T3	4,000a	0,081	0,230	0,117	0,679	-
Larvae Stage	Control	5,477a	0,516	-	0,419	0,114	0,117
	T1	5,234a	0,223	0,419	-	0,081	0,095
	T2	5,000a	0	0,114	0,081	-	0,985
	T3	5,000a	0,081	0,117	0,095	0,985	-
Pupae Stage	Control	3,874a	0,214	-	0,588	0,353	0,393
	T1	3,937a	0,055	0,588	-	0,161	0,340
	T2	2,986a	0,016	0,353	0,161	-	0,790
	T3	3,974a	0,048	0,393	0,340	0,790	-
Total Duration	Control	9,339a	0,322	-	0,367	0,068	0,054
	T1	9,158a	0,186	0,367	-	0,108	0,073
	T2	8,981a	0,016	0,068	0,108	-	0,158
	T3	8,953a	0,033	0,054	0,073	0,158	-

* Means followed by the same letter do not differ significantly by the t test ($\alpha=5\%$).

** Control = chicken gizzard homogenate in 65% agar diet; T1= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 3.33 µg/mL ciprofloxacin; T2= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 6.66 µg/mL ciprofloxacin, T3= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 13.33 µg/mL ciprofloxacin

Table 3: Comparison by ANOVA of the viability of the maggot, pupa and total abilities (neomaggot to adult) of *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) from four treatments with different ciprofloxacin concentrations* reared in an acclimatized chamber (30°C day and 28°C night, 70 ± 10% R.H. and 14 hours photoperiod).

		Viabilidade	<i>p</i> = valor de significância (ANOVA)			
			Controle	T1	T2	T3
Larvae	Controle	81,88%,	-	0,643	0,007	0,733
	T1	78,13%,	0,643	-	0,831	0,965
	T2	96,67%	0,007	0,831	-	0,859
	T3	77,50%	0,733	0,965	0,859	-
Pupae	Controle	93,60%	-	0,456	0,579	0,806
	T1	85,44%	0,456	-	0,333	0,571
	T2	95,65%	0,579	0,333	-	0,512
	T3	92,01%	0,806	0,571	0,512	-
Total	Controle	76,88%	-	0,562	0,034	0,807
	T1	68,75%	0,562	-	0,108	0,820
	T2	92,5%	0,034	0,108	-	0,217
	T3	73,13%	0,807	0,820	0,217	-

* Control = chicken gizzard homogenate in 65% agar diet; T1= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 3.33 µg/mL ciprofloxacin; T2= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 6.66 µg/mL ciprofloxacin, T3= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 13.33 µg/mL ciprofloxacin

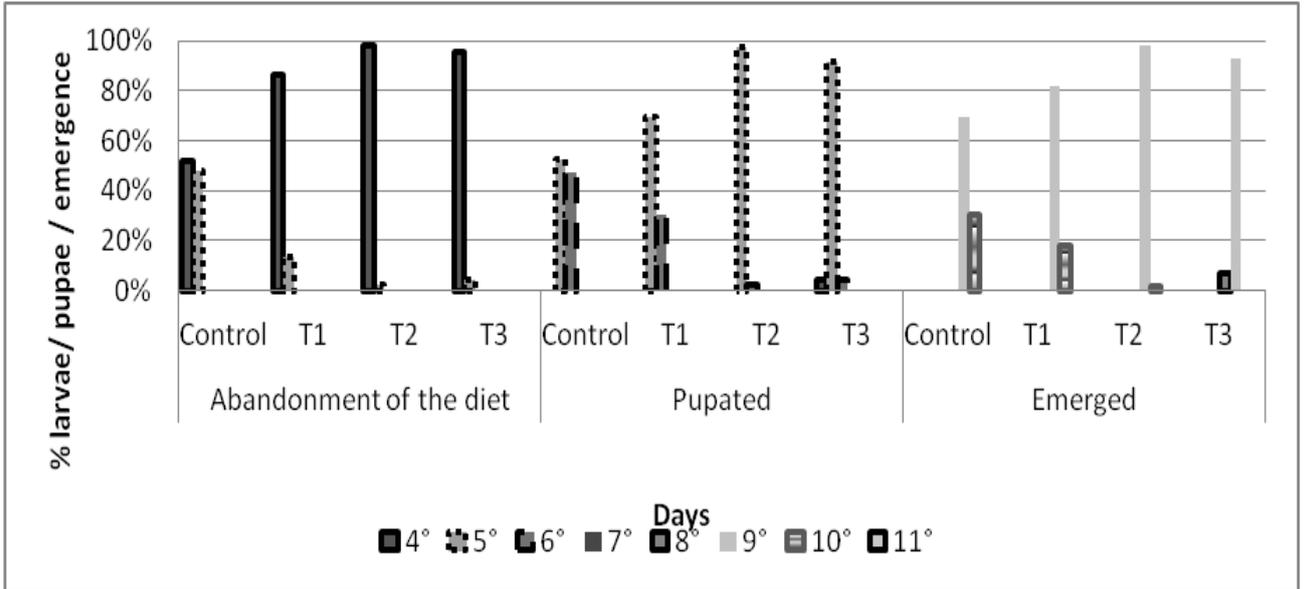


Figure 1- Diet abandonment rhythm of *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) maggots, at pupation and emergence (%) from four treatments: Control = chicken gizzard homogenate in 65% agar diet; T1= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 3.33 $\mu\text{g/mL}$ ciprofloxacin; T2= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 6.66 $\mu\text{g/mL}$ ciprofloxacin, T3= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 13.33 $\mu\text{g/mL}$ ciprofloxacin

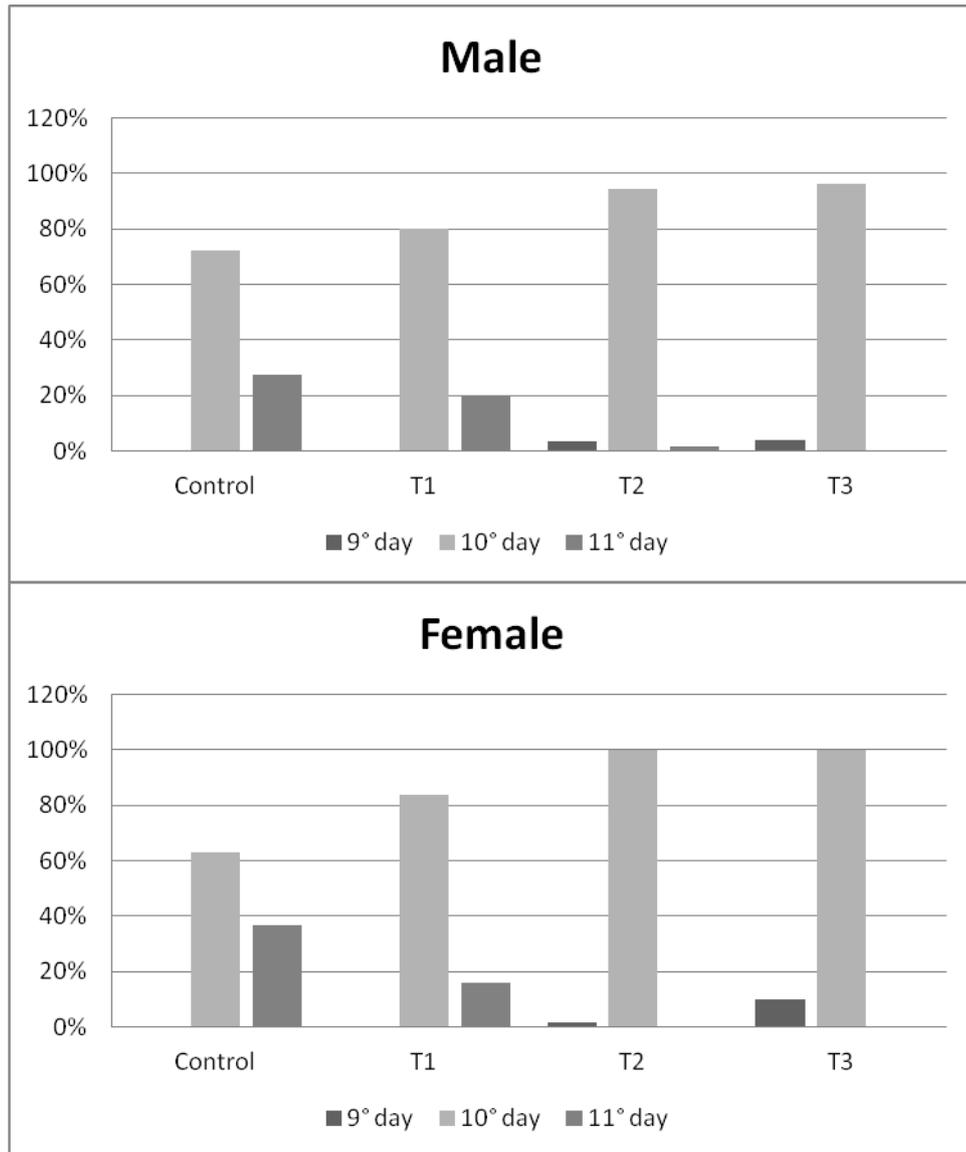


Figure 2- Emergence rate in days of male and female *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) reared on four treatments: Control = chicken gizzard homogenate in 65% agar diet; T1= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 3.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ciprofloxacin; T2= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 6.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ciprofloxacin, T3= chicken gizzard homogenate in 65% agar diet + 13.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ciprofloxacin.