

ESTERILIZAÇÃO DE LARVAS DE *Chrysomya putoria*
PARA UTILIZAÇÃO EM BIOTERAPIA

MARIA CLARA CHEQUIN FERNANDES¹, MARÍLIA DE ABREU HUBER E SILVA¹,
MARIA LUCIA M TORRES³, MARIA CÂNDIDA DE O. COSTA³, FERNANDA L. S.
BASTOS VARZIM³, AFFONSO CELSO NAVARRO³

¹ Graduanda em Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB).

² Graduanda em Biologia do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB).

³ Docente do Curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB).

RESUMO: A terapia larval consiste em aplicação de larvas vivas de moscas da espécie *Chrysomya putoria* (Díptera Calliphoridae) na recuperação de tecidos necrosados, por acometimento de infecção causada por Diabetes Mellitus, osteomielite, feridas ulcerativas e feridas em geral. Para que as larvas possam ser aplicadas na ferida, os ovos precisam ser esterilizados para que a ação dos produtos químicos destrua os agentes patógenos que estão contidos nos ovos. Este trabalho tem como objetivo testar a esterilização de ovos para futura utilização das larvas no tratamento de feridas.

PALAVRAS-CHAVE: bioterapia, esterilização, *Chrysomya putoria*

INTRODUÇÃO

Várias técnicas têm sido utilizadas para auxiliar na cura de lesões cutâneas, associadas a antibióticos modernos, mas os tratamentos são demorados, caros e nem sempre eficazes. (MARCONDES, 2006). A terapia larval é o tratamento de feridas utilizando-se larvas vivas de moscas, tem aumentado o seu uso devido à grande eficácia das larvas em remover tecidos necrosados, além da segurança e simplicidade da aplicação (SHERMAN et al 2000; Martini e Sherman, 2003 apud Torres 2005). Os efeitos benéficos da terapia larval sobre a cicatrização de feridas infectadas têm sido reconhecido há centenas de anos. Esse processo ocorreu acidentalmente, sob condições de campo de batalhas, onde foi observado que as feridas infectadas por larvas cicatrizavam mais rapidamente e com menos complicações do que aquelas que haviam sido infectadas (THOMAS et al., 1999; SHERMAN et al., 2000 apud Torres 2005).

Após 1945, com o desenvolvimento de vários antibióticos, observaram-se certa euforia e arrogância, deixando-se de lado o uso desta técnica para o tratamento de feridas. Em pouco tempo, percebeu-se que os antibióticos levaram a resistência, e que os tratamentos eram caros e resolviam somente parte dos casos, não conseguindo impedir conseqüências graves, como as amputações. Essas dificuldades proporcionaram o ressurgimento do interesse pela terapia larval, a partir da década de 1980. A terapia larval passou a ser utilizada com grande sucesso podendo ser muito útil, especialmente em países e regiões de nível socioeconômico precário, por seu baixo custo e grande eficiência. Envolve tecnologia simples que pode ser desenvolvida em pequenos laboratórios, com pouco pessoal e praticamente sem depender de material sofisticado e/ou importado para a sua utilização (MARCONDES, 2006).

Segundo Schnack, (2004) apud Dallavecchia LD, Silva Filho RG (2010) larvas estéreis já foram utilizadas na terapia larval, porém a mais utilizada é a *Lucilia sericata*, muito comum em países situados ao norte do hemisfério. No Brasil, espécies do gênero *Chrysomya* apresentam potencial para serem utilizadas, pois possuem aspecto biológico e comportamentos semelhantes a *L. sericata*.

As técnicas de esterilização dos ovos foram testadas desde a década de 1930, utilizando formol e outros desinfetantes; esta técnica mostrou-se inviável, pois a esterilização dos ovos afetava a viabilidade das larvas (Marcondes, 2006). Segundo Varzim (2005) e Marcondes (2006) os ovos devem ser coletados e colocados em placa de petri contendo papel filtro umedecido com água destilada e com a utilização de um pincel fino, os mesmos devem ser separados por uma cuidadosa pressão mecânica. A separação dos ovos é importante, porque facilita a ação dos químicos, eliminando as bactérias.

As principais características que seriam encontradas em um agente químico antimicrobiano “ideal” são: atividade antimicrobiana, solubilidade, estabilidade, ausência de toxicidade, homogeneidade, inativação mínima por material estranho, atividade em temperaturas ambiente ou corporal, poder de penetração, ausência de poderes corrosivos e tintoriais, poder desodorizante, capacidade detergente, disponibilidade e baixo custo. Os agentes químicos antimicrobianos podem ser: esterilizantes, desinfetantes, germicidas, anticépticos, saneador (PELCZAR JR. et al., 1980 apud Varzim, 2005).

As técnicas propostas para esterilização de ovos de moscas incluem desde o uso de soluções que contêm cloreto de sódio, álcool, ácido hipoclorídrico, formalina, hidróxido de sódio, hipoclorito de sódio, agar do bacto, clorexidina, antibióticos, até luz ultravioleta (NITSCHÉ, 2010). Mumcuoglu (2001) apud Varzim (2005) esterilizou os ovos com Hipoclorito de sódio 0,5% e Formaldeído a 0,5% e após a esterilização os ovos foram lavados com água estéril, removidos e colocados em placa de petri com Agar fígado, incubados em temperatura de 25-30 °C de uma noite para outra. O Glutaraldeído presente em alguns químicos, é eficaz contra todos os tipos de microorganismos, inclusive vírus e esporos bacterianos, é um desinfetante e esterilizante, sendo de fácil penetração e mais ativo na presença de matéria orgânica e de espectro bactericida mais amplo. Este composto é preparado comercialmente na concentração de 2% e apresenta como desvantagem a alta mortalidade quando utilizado na desinfecção de ovos para incubação (PAULINO, 1999 apud Varzim, 2005).

O antimicrobiano Hipoclorito de sódio é derivado do cloro inorgânico que apresenta com espectro boa ação fungicida, algicida, protozoocida, viricida e contra formas vegetativas de bactérias, mas não é tão eficiente contra esporos bacterianos. As soluções de hipoclorito de sódio variam de 1 a 15% e liberam entre 1 a 5% de cloro livre; estas soluções podem ser anti-sépticas, desinfetantes e esterilizantes. A solução de hipoclorito de sódio na concentração de 0,5%, chamada também de líquido ou solução de Dakin é muito utilizadas em Medicina Veterinária para irrigação de abscessos ou feridas, com a finalidade de promover a sua limpeza e anti-sepsia apresentando poder bactericida e liquefaz o tecido necrótico das feridas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi utilizada armadilha feita de garrafa de plástico e coberta por um véu (filó) para que as moscas não escapassem. Havia dentro da armadilha, como isca para atrair as moscas, peixe putrefeito. A armadilha foi levada ao lixo do HOVET Vicente Borelli da Faculdade de Medicina Veterinária “Octávio Bastos” de São João da Boa Vista, permanecendo de um dia para o outro, com êxito na captura das moscas da espécie *Chrysomya putoria* da família Calliphoridae. Essas foram colocadas em gaiolas de nylon e alimentadas com água, levedura de cerveja, leite em pó e açúcar, sendo uma proporção de 1:1:1 na temperatura de 27 a 28 °C. Foi colocado fígado dentro da gaiola para as moscas realizarem a ovipostura, sendo que os ovos foram coletados com auxílio de um pincel fino para a placa de petri contendo o filtro umedecido. Após 12 a 24 horas os ovos eclodiram liberando as larvas L1 que foram transferidas para o meio de cultura feito com 10g de leite em pó, 10g de levedura de cerveja, 2g de ágar-agar e 0,4g de “nipagin” (metil – p – hidroxibenzoato). As larvas ficaram no meio de cultura em um período de cinco dias em que se alimentaram intensamente e cresceram rapidamente e sofreram duas mudas tornando-se larvas totalmente maduras que finalmente caíram na serragem iniciando o processo de pupa, que é o endurecimento e escurecimento de sua pele original. Após sete dias as moscas eclodiram da pupa dando origem aos indivíduos adultos. A partir da terceira geração os ovos foram coletados para a esterilização. Para esse processo foi utilizado, como esterilizante, cloro ativo na concentração de 2,5%. Foram feitas, posteriormente, três soluções com diferentes concentrações de cloro ativo. A primeira foi de 0,5%, a segunda solução foi de 0,1 % e a terceira solução foi de 1%,

Os ovos foram separados em 4 grupos de 60 unidades, onde 3 deles foram colocados em filtros diferentes, os quais foram submersos por 2 minutos, um em cada solução, com o auxílio da pinça. Em seguida, os ovos esterilizados foram submersos por 30 segundos no soro fisiológico para que fosse retirado o excesso de solução de cloro ativo. O quarto grupo de ovos, que também foi colocado em um filtro, não foi esterilizado, foi adicionada apenas uma pequena quantidade de água destilada para que o meio não ficasse seco.

Ao término do procedimento foram anotadas nas placas de petri as especificações dos tratamentos ao qual os ovos foram submetidos (0,1% - 2 min.; 0,5% - 2 min.; 1% - 2 min.; não

esterilizado), em seguida, as placas foram acondicionadas em um isopor e mantidas a temperatura entre 25 e 30°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observado que após 12 horas da esterilização dos ovos, uma grande proporção destes não eclodiu podendo este fato estar relacionado à alta concentração de cloro ativo. Outra ocorrência suposta seria a variação da temperatura, decorrente do mal funcionamento da lâmpada, ocorrida durante a incubação desses ovos, um acontecimento imprevisto e que, também, contribuiu e comprometeu a eclosão dessas larvas, pois segundo Monteiro-Souza et al (1992) apud Ludwig et al (2007) a luz solar e a temperatura elevada provocam uma maior liberação do cloro. Com isso o resultado não foi satisfatório quando foi utilizado o Cloro 0,1%, 0,5% e 1% para esterilizar os ovos, obtendo-se apenas quatro larvas da eclosão dos ovos (6,6%), quando utilizada a concentração de 0,1% de Cloro, uma larva (1,6%) com a esterilização de Cloro 1% e nenhuma eclosão dos ovos com a esterilização 0,5% de Cloro. Apesar da variação de temperatura, a placa contendo ovos não esterilizados, obteve sucesso de cinquenta eclosões, sendo equivalente a 83.2% do total.

CONCLUSÕES

Tendo em vista problemas operacionais durante a incubação, novos testes deverão ser realizados, controlados e novas porcentagens de cloro ativo serão testadas a fim de se obter uma eficiente esterilização aliada à alta eclosão de larvas.

REFERÊNCIAS

- DALLAVECCHIA L D; SILVA FILHO R G. **Esterilização de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1974) para utilização em Biondesbridamento.** Programa de Pós Graduação em Enfermagem. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Unirio, 2010.
- LUDWIG A; HOFFMEISTER M K; IRALA L E; SALLES A A; LIMONGI O; SOARES R G. **Análise de concentração de cloro ativo e pH em amostras de hipoclorito de sódio 1%.** RSBO (Revista Sul-Brasileira de Odontologia) V. 4 n° 1, 2007 - 33
- MARCONDES, C. B. **Terapia Larval de lesões de pele causadas por Diabetes e outras doenças.** Santa Catarina, UFSC, 2006
- NITSCHKE J T. **Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos *Wistar*,** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Unesp, 2010.
- TORRES, L M. **Efeito de quatro antibióticos sobre larvas de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera Calliphoridae) Utilização em Bioterapia.** 2005 Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 2005.
- VARZIM F V L. **Esterilização de ovos de mosca varejeiras *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera Calliphoridae) para utilização em Bioterapia.** 2005 Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Unicamp, 2005.