

PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIO *IN VITRO* PARA TESTAR A ATIVIDADE DE INSETICIDAS FRENTE À LARVAS DE *COCHLIOMYIA HOMINIVORAX*

Monique Taveira Medeiros, Barbara Rauta de Avelar, Anna Carolina Teixeira de Jesus, Jéssica D'avila de Assis, Diefrey Ribeiro Campos, Fabio Barbour Scott.

Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária – LQEPV, UFRRJ
(Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro), Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

vet.mtm@hotmail.com, barbararauta@gmail.com, annacarolinati@ufrrj.br, ida.rural@gmail.com,
diefrey8@gmail.com, scott.fabio@gmail.com.

Resumo

O presente estudo tem como objetivo padronizar um bioensaio *in vitro* para avaliação do desenvolvimento do ciclo biológico completo das larvas de primeiro instar de *Cochliomyia hominivorax* para testar a atividade de inseticidas. A metodologia foi estruturada com diferentes combinações de quantidade de dieta larval (10 ou 20 g), número de larvas (10 ou 20) e tipo de recipiente (placas de Petri 15x60mm), frascos de polipropileno de 145mL ou 200mL, e todos os grupos foram incubados a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e $80 \pm 10\%$ de umidade, com avaliações diárias. Para a análise estatística dos dados foi usado o teste de Kruskal-wallis no software estatístico BioStat5 ($P \leq 0,05$). Nos grupos incubados em placas de Petri, todas as larvas morreram em até 48h, sem recuperação de pupas. Já nos frascos de polipropileno, houve manutenção do ciclo até a emergência de adultos, com taxas médias de recuperação de pupas entre 6,7– 13,2 e de adultos entre 5,3–7,3. Desse modo, o melhor desempenho foi observado no G5 ,10 larvas em 10 g de meio em frascos de 145mL, logo, a metodologia padronizada mostrou-se adequada para testes *in vitro*.

Palavras-chave: Antiparasitários. Larvas. Pupa. Adultos.

Introdução

Os casos de miíase primária são amplamente relatados no Brasil, tornando-o um país endêmico para a espécie *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae), que possui estágio larval como parasita obrigatório de animais homeotérmicos (Costa-júnior,2019). Como consequência, os impactos econômicos gerados na agropecuária são expressivos, uma vez que os principais danos causados por *C. hominivorax* ao setor pecuário são: morte de animais recém-nascidos, estresse e aumento da mortalidade, diminuição na produção de carne e leite, despesas para a inspeção diária dos animais, gastos com aplicação de tratamento preventivo ou curativo. Devido a esse contexto, estimasse que o impacto desse inseto no Brasil rende custos de até 0,38 bilhões de dólares, afetando especialmente a produtividade do setor bovino nacional (Grisi,2014). Além dos prejuízos econômicos, a espécie também representa um problema de saúde pública, afetando seres humanos (Chupeau et al., 2020), o que reforça a relevância de seu controle no âmbito da Saúde Única (Barros & Bricarello, 2020). Apesar dos desafios ainda enfrentados pelo Brasil, importantes avanços foram obtidos em outras regiões do continente. Países da América do Norte, América Central e Caribe foram oficialmente declarados livres da espécie em 2018, resultado direto de programas de erradicação considerados bem-sucedidos (Mackenzie, 2022). Entretanto, relatos recentes apontam o reaparecimento da mosca em áreas da América do Norte (Valdez-Espinoza, 2025). Esse retorno a territórios previamente livres reacende preocupações quanto à possibilidade de reintrodução e dispersão geográfica do parasito, colocando em risco a estabilidade alcançada por décadas de esforços de controle.

Diante desse cenário, o presente estudo tem como objetivo padronizar um modelo de bioensaio *in vitro* para avaliar a atividade de inseticidas sobre as formas larvais e seu desenvolvimento até a fase adulta de *C. hominivorax*.

Metodologia

As larvas de primeiro instar (L1) utilizadas no estudo foram oriundas da colônia laboratorial de *C. hominivorax* do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) (CEUA-8634020223), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As gaiolas utilizadas foram estimuladas para oviposição, e as massas de ovos são recuperadas e incubadas em uma câmara climatizada com temperatura variando a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80 \pm 10\%$, após 12 horas as larvas em primeiro instar são coletadas.

Já na padronização do método *in vitro* foram realizados testes em diferentes recipientes com diferentes quantidades de meio larval proposto por Mastrangelo (2014), utilizando larvas de primeiro estágio (L1) de *C. hominivorax* que foram recuperadas diretamente do meio larval com o auxílio de pincel nº 0. Foram preparados oito grupos experimentais, com seis repetições cada:

Tabela 1: Apresentação dos grupos experimentais estruturados para o teste *in vitro*.

Grupos	Combinações do método		
	Quantidade da dieta larval	L1 incubadas	Recipientes
G1	10g	10	Placas de Petri 15x60mm
G2	10g	20	Placas de Petri 15x60mm
G3	20g	10	Placas de Petri 15x60mm
G4	20g	20	Placas de Petri 15x60mm
G5	10g	10	Potes de 145mL
G6	20g	10	Potes de 145mL
G7	10g	20	Potes de 200mL
G8	20g	20	Potes de 200mL

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Nos grupos experimentais (G1-G4) as larvas foram incubadas em placas de Petri 15x60mm vedadas nas bordas laterais utilizando massa plástica. Já nos grupos (G5 e G6) as larvas foram incubadas em frascos de polipropileno de 145mL e os G7 e G8 as larvas foram incubadas em frasco de polipropileno de 200mL. Todos os grupos foram mantidos em câmaras climatizadas com temperatura variando a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ com umidade relativa de $80 \pm 10\%$, e observados diariamente por 14 dias. Após a observação de 48 horas foi acrescido 50% do volume final do meio nos potes em que haviam larvas vivas, e os recipientes foram acondicionados dentro de frascos de polipropileno com volume de 500mL acrescido de 10 gramas de vermiculita onde foi acompanhado o processo de pupação e emergência de moscas adultas.

Por fim, a análise estatística dos dados utilizou o programa estatístico computacional BioStat 5, e para avaliar a variância estatística entre as médias de recuperação de pupas e média da recuperação dos adultos, utilizou-se o teste para dados não paramétricos, Kruskal Wallis considerando o nível de confiança de 95% ($P \leq 0,05$).

Resultados

Os resultados expõem que nos grupos G1 a G4, o recipiente não comportou bem a incubação das larvas. Já nos grupos G5 a G8 o método de adaptação da tampa garantiu boa vedação, impossibilitando a fuga das larvas. Nas avaliações de 24 horas após a incubação o grupo G1 possuía larvas ativas em todas as repetições, os grupos G2 a G4 possuíam redução ou ausência da motilidade larval em várias repetições e os grupos G5 a G8 possuíam o maior número de larvas ativas com a motilidade preservada. Acerca do ambiente da dieta larvas que o material foi incubado, o meio larval nos grupos G1 a G4 escureceu mais rápido, além do derretimento da massa plástica, com presença de larvas mortas entre a tampa e a massa. Nos grupos G3 e G4, a maior quantidade de meio (20g) dificultou a visualização das larvas.

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

Já na avaliação de 48 horas após a incubação os grupos G1 a G4 possuíam larvas sem motilidade em todas as repetições, com as placas com presença de gases de putrefação da dieta larval e os grupos G5 a G8 permaneceram com maior grau de larvas com a motilidade preservada, entretanto já apresentou algumas larvas com a motilidade mais reduzida. Do terceiro a sétimo dia experimental os grupos G1 a G4 já possuíam larvas ativas ausentes e os grupos G5 a G8 já possuíam larvas de terceiro instar em fase de formação de pupa no quarto dia experimental, com o G5 sendo o primeiro a apresentar pupas. Em seguida, do oitavo ao décimo quarto dia experimental os grupos G5, G6, G7 e G8 apresentaram emergência de moscas adultas a partir do oitavo, nono, décimo e décimo terceiro dia experimental respectivamente. Os grupos G1 a G4 não foi possível recuperar pupas e adultos. No décimo sétimo dia foi realizada a última observação com todas as moscas mortas, permitindo a contagem final, resultando em médias de recuperação para os grupos G5, G6, G7 e G8 sendo para Pupas: 66,7%; 71,7%; 59,2%; 65,8%, e para Adultos: 81,8%; 65,7%; 66,6%; 55,9%, respectivamente. Ao final foi constatado que não houve diferença significativa entre os grupos 5 a 8 na recuperação de pupas e adultos.

Tabela 2: Média estatística dos resultados obtidos no teste para padronização *in vitro* para desafiar formas parasitárias da mosca *Cochliomyia hominivorax* e observação da continuidade do seu ciclo.

Grupos	Recuperação de Pupas		Recuperação de Adultos	
	Média	%	Média	%
G1: placa (10g meio larval/ 10 L1)	0.0 ± 0.0 ^a	0.0	0.0 ± 0.0 ^a	0.0
G2: placa (10g meio larval/ 20 L1)	0.0 ± 0.0 ^a	0.0	0.0 ± 0.0 ^a	0.0
G3: placa (20g meio larval/ 10 L1)	0.0 ± 0.0 ^a	0.0	0.0 ± 0.0 ^a	0.0
G4: placa (20g meio larval/ 20 L1)	0.0 ± 0.0 ^a	0.0	0.0 ± 0.0 ^a	0.0
G5: frasco 145 ml (10g meio larval/ 10 L1)	6.7 ± 1.4 ^b	66.7	5.3 ± 1.1 ^b	81.8
G6: frasco 145 ml (20g meio larval/ 10 L1)	7.2 ± 1.3 ^b	71.7	4.8 ± 2.04 ^b	65.7
G7: frasco 200 ml (10g meio larval/ 20 L1)	11.8 ± 2.9 ^b	59.2	7.7 ± 1.94 ^b	66.6
G8: frasco 200 ml (20g meio larval/ 20 L1)	13.2 ± 1.6 ^b	65.8	7.3 ± 1.47 ^b	55.9

^{a,b}. Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

A padronização de metodologias *in vitro* para o estudo do ciclo de *C. hominivorax* representa um desafio devido às particularidades do desenvolvimento larval e à necessidade de simulação de condições próximas ao ambiente natural do parasitismo. Esse bioensaio propõem que a impregnação inicial seja do sangue utilizado na dieta larval com o princípio ativo em teste para o consumo das fases imaturas como uma forma de acompanhar os impactos do ativo no desenvolvimento do díptero. Seguindo esse raciocínio, nas dietas subsequentes, o sangue não é impregnado, buscando reproduzir a dinâmica real das possíveis formas de tratamento ou profilaxia: exposição inicial ao inseticida seguida da ausência de reforço, permitindo avaliar os efeitos do ativo ao longo do ciclo biológico das moscas, visando a possibilidade de interrupção do ciclo antes da progressão para o próximo instar larval, pupação ou emergência de adultos.

Apesar do potencial do método, existem limitações importantes. A principal delas está relacionada à impossibilidade de acompanhar de forma precisa a mortalidade larval sem manipulação excessiva do meio, o que poderia comprometer a integridade do experimento. Dessa forma, os parâmetros mais confiáveis de avaliação concentram-se nas fases finais do ciclo, pupação e emergência dos adultos, o que restringe a análise dos efeitos do ativo nas fases intermediárias do desenvolvimento.

No processo de definição do protocolo, os grupos G1 a G4 tiveram uma rápida putrefação do meio larval indicando provável deficiência na oxigenação, associada ao derretimento da massa de modelar em função da umidade. Esse fator pode ter resultado em esmagamento mecânico das larvas e inviabilizado o desenvolvimento. Além disso, volumes maiores de dieta larval (20 g) dificultaram a visualização dos indivíduos, configurando uma limitação metodológica, ainda que não tenham

A Ciência do NANO e seu impacto transformador no MACRO

impedido o desenvolvimento completo. Já nos grupos G5 a G8, o comportamento das larvas mostrou diferenças relacionadas à quantidade de dieta e ao tipo de recipiente. O grupo G5 apresentou pupação mais precoce, possivelmente em função da menor oferta de alimento (10 g para 10 larvas), o que pode ter acelerado o ciclo. O padrão de emergência mais rápido observado nos frascos de 145 mL sugere que esse recipiente favorece condições adequadas para o desenvolvimento, além de apresentar vantagens práticas, como menor custo, tamanho reduzido e facilidade de manuseio. Embora tenham sido observadas diferenças numéricas entre as médias de recuperação de pupas e adultos nos distintos grupos e recipientes, estas não foram estatisticamente significativas. Assim, ambos os tipos de frascos (145mL e 200mL) mostraram-se viáveis para a manutenção do ciclo completo de *C. hominivorax* em laboratório, oferecendo flexibilidade metodológica para futuros ensaios. De forma geral, a padronização proposta fornece uma ferramenta preliminar para a realização de bioensaios com inseticidas em condições controladas, ainda que limitada à avaliação das fases finais do ciclo.

Conclusão

Com base nos resultados apresentados foi possível padronizar de forma eficiente um bioensaio *in vitro* para desafiar formas imaturas da mosca *C. hominivorax* e reproduzir o seu desenvolvimento até sua forma adulta, sendo, portanto, o método do grupo G5, o que melhor apresentou desempenho não só estatístico como também empírico nas observações.

Referências

- Barros GP, Bricarello PA. 2020. Myiasis by *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858): a neglected zoonosis in Brazil. Open J Vet Med. 10:80–91. DOI:10.4236/ojvm.2020.106007
- Costa-júnior, Livio Martins et al. A review on the occurrence of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: calliphoridae) in Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 28, n. 4, p. 548-562, dez. 2019. FapUNIFESP (SciELO). DOI: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019059>
- Chupeau Z, Bonvallot N, Mercier F, et al. 2020. Organophosphorus flame retardants: a global review of indoor contamination and human exposure in Europe and epidemiological evidence. Int J Environ Res Public Health. 17:6713. DOI:10.3390/ijerph17186713
- Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cançado PH, León AA, Pereira JB, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 2014 Apr-Jun;23(2):150-6. doi: 10.1590/s1984-29612014042. PMID: 25054492.
- Gullan, P. J.; CRANSTON, P. S. Insetos : fundamentos da entomologia. 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2017. ISBN 978-85-277-3095-2.
- Mackenzie T, Pérez de León AA, Sagel A, et al. 2022. Geographic population genetic structure of the New World screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera:Calliphoridae), using SNPs. J Med Entomol. 59:874–882. DOI:10.1093/jme/tjac024
- Mastrangelo, T., Bezerra, F., & Fernandes, T. (2014). Dietas larvais alternativas para criação massal da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*. *Ciência Rural*, 44(4), 672–677. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000400016>
- Pezzi M, Bonacci T, Leis M, et al. 2019. Myiasis in domestic cats: a global review. Parasit&Vectors. 12:372. DOI:10.1186/s13071-019-3618-1
- Valdez-Espinoza UM, Fadda LA, Marques R, et al. 2025. O ressurgimento da bicheira do Novo Mundo e sua distribuição potencial na América do Norte. Sci Rep. 15:23819. DOI:10.1038/s41598-025-04804-9

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (FAPUR), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), além do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (LQEPV/UFRRJ), pelo suporte e pelos investimentos que possibilitaram a execução deste estudo.