

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Atividade do Novaluron sobre Larvas de *Cochliomyia*  
*hominivorax* (Diptera, Calliphoridae).**

**Jessica D'avilla de Assis**

**2022**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ATIVIDADE DO NOVALURON SOBRE LARVAS DE *Cochliomyia hominivorax***  
**(DIPTERA, CALLIPHORIDAE)**

**JÉSSICA D'AVILLA DE ASSIS**

*Sob a Orientação da Professora*

**Thaís Ribeiro Correa Azevedo**

*E Coorientação de*

**Diefrey Ribeiro Campos**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

**Seropédica, RJ**

**Março, 2022**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A848a Assis, Jessica D'avilla de , 1987-  
Atividade do Novaluron sobre larvas de Cochliomyia  
hominivorax (Diptera, Calliphoridae / Jessica D'avilla  
de Assis. - Seropédica, 2022.  
60 f.

Orientadora: Thais Ribeiro Correia Azevedo.  
Coorientador: Diefrey Ribeiro Campos.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em  
Ciências Veterinárias, 2022.

1. Míases. 2. Controle e prevenção de parasitos. 3.  
Segurança e sustentabilidade. I. Azevedo, Thais  
Ribeiro Correia, 1978-, orient. II. Campos, Diefrey  
Ribeiro , 1988-, coorient. III Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em  
Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 664/2022 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.015646/2022-38

Seropédica-RJ, 10 de março de 2022.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
JÉSSICA D'AVILLA DE ASSIS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/03/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese/dissertação.

*(Assinado digitalmente em 11/03/2022 12:40)*

THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO

DAGP (12.28.01.00.12)

Matrícula: ###298#9

*(Assinado digitalmente em 11/03/2022 11:30)*

VIVIANE DE SOUZA MAGALHAES

DCFar (12.28.01.00.00.47)

Matrícula: ###463#5

*(Assinado digitalmente em 11/03/2022 11:04)*

GUILHERME MARCONDES KLAFKE

CPF: ###.###.508-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **664**, ano: **2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **10/03/2022** e o código de verificação: **9b83a0d75b**

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.*

*(Simone de Beauvoir)*

*Esse trabalho é dedicado  
à minha filha Helena.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram na carreira acadêmica, por todo carinho e amor incondicional, amo vocês, e serei eternamente grata! Obrigada por ainda se dedicarem a mim!

A minha irmã Jeniffer, por cuidar da Helena para mim, você conseguiu me proporcionar a maior tranquilidade que uma mãe poderia ter, sabendo que a filha está sendo cuidada por uma pessoa que a ama tanto quanto eu.

Ao meu namorado e companheiro Rafael Gonçalves Costa, por todo apoio ao longo desses anos e pela compreensão as minhas idas ao laboratório tarde da noite e aos finais de semana. Amo você!

A minha orientadora Dra. Thaís Ribeiro Correia Azevedo, por ter me amparado e acolhido, sendo sempre tão solícita e presente, no laboratório quanto na vida pessoal. Obrigada pela amizade, foi imprescindível para eu chegar até aqui.

Ao Dr. Diefrey Campos meu coorientador, agradeço todo carinho e auxílio no preparo dos experimentos, pelos conhecimentos divididos e as orientações.

A área experimental de campo do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), que me proporcionou conhecer pessoas fantásticas, que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional. Agradeço aos funcionários Cláudio Satler, Reginaldo Santos, Sidinei Ramos, Inocêncio Garcia e Fabrício Silva, aos médicos veterinários, Raphael Comissário, Bruno de Toledo Gomes, Camila Rodrigues e Marisa Rocha, aos estagiários Thiago Vieira, Lucca Francesco Cassano, Juliana Abreu e Natalia Mourão que de alguma forma estiveram comigo e me auxiliaram nesse processo.

A todos os membros do laboratório que me acolheram calorosamente numa fase tão delicada da minha vida, principalmente professor Fábio Barbour Scott, obrigada pela compreensão.

A Gabriela Oliveira pela chance de ingressar no curral, pois foi ela quem reconheceu meu potencial, que eu mesma ainda não havia enxergado.

A Monique Taveira Medeiros, uma grande amiga, que dividiu comigo seus conhecimentos e amor pela colônia de *Cochliomyia hominivorax*, sua presença deixava o trabalho mais leve.

Agradeço a toda equipe do setor de Farmacometria do LQEPV, em especial à Melina Alves e Thais Paes por toda ajuda com as diluições.

A minha amiga Suellen Mattos, por ter cuidado da Helena para que eu pudesse cuidar da colônia.

Muito obrigada a todos que de alguma forma me apoiaram ou me incentivaram nessa jornada!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## **BIOGRAFIA**

Jéssica D'avilla de Assis nasceu em Barra do Piraí, cidade localizada no estado do Rio de Janeiro, no dia 07 de dezembro de 1987, filha de Ana Lúcia Ferreira D'avilla e Rosemar de Assis. Em 2013, graduou-se no curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), em Seropédica (RJ). Entre 2013 e 2014 atuou profissionalmente no setor de Bovinocultura de Leite da UFRRJ. Em 2014, após aprovação no processo seletivo de reingresso interno, iniciou o curso de Medicina Veterinária na UFRRJ. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica na área de clínica médica de animais de produção, com foco em ruminantes. Em setembro de 2018, ingressou como bolsista de Apoio Técnico na Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica da UFRRJ, na área de campo experimental do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária. Em março de 2019, ingressou no mestrado, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ e, no mesmo ano, teve sua primeira filha, Helena, que fortaleceu ainda mais a busca por seus objetivos profissionais.

ASSIS, Jéssica D'avilla. **Atividade do Novaluron sobre larvas de *Cochliomyia hominivorax* (Diptera, Calliphoridae)**. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

### RESUMO

As miíases são parasitoses causadas pelas larvas da mosca *Cochliomyia hominivorax*, com grande morbidade e mortalidade, sobretudo em animais domésticos como bovinos e ovinos, podendo acarretar grandes prejuízos econômicos ao agronegócio, além de ser um problema em saúde. A resistência desses parasitos aos tratamentos clássicos, associados aos problemas ambientais e de saúde, devido ao uso contínuo de alguns dos inseticidas, levaram a busca de novas alternativas. Os Reguladores de Crescimento dos Insetos (IGRs), são compostos químicos que interferem no crescimento e desenvolvimento desses espécimes, atuando principalmente sobre as formas imaturas. Dentre os principais IGRs, o novaluron, inibidor de síntese de quitina, apresentou maior eficácia no controle de dípteros. No presente estudo, larvas de primeiro (L<sub>1</sub>) e terceiro (L<sub>3</sub>) instares de *C. hominivorax* foram expostas à diferentes concentrações de novaluron. As metodologias utilizadas foram adaptadas para cada estágio: i) as L<sub>1</sub> foram expostas em dieta larval acrescida de novaluron e ii) as L<sub>3</sub> foram expostas pelo uso de papel filtro impregnado com o IGR. O ciclo biológico foi observado para determinar em qual estágio o efeito inseticida do novaluron ocorria. Foi observada uma mortalidade de 91,7% de larvas à 0,05 ppm e de 100% das pupas à 0,07 ppm de novaluron no ensaio de desenvolvimento em meio. Nos ensaios com L<sub>3</sub>, foi observado 94,1% de atividade contra pupas para concentração de 100ppm. As concentrações letais de 50% para larvas e pupas foram, respectivamente, de 0,010ppm e 21ppm. Com base nesses resultados, pôde-se afirmar que o novaluron teve atividade sobre as larvas de *C. hominivorax* interferindo no ciclo de desenvolvimento, apresentando efeito larvicida e pupicida frente a L<sub>1</sub>, além de inibir a emergência de adultos após a exposição das L<sub>3</sub>.

**Palavras-chave:** Benzoilfenilureia, Controle, Disruptores de desenvolvimento, Miíases.

ASSIS, Jéssica D'avilla. **Activity of Novaluron on *Cochliomyia hominivorax* Larvae (Diptera, Calliphoridae)**. 60p. Dissertation (Master's degree in veterinary sciences). Institute of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

#### **ABSTRACT**

Myiasis is a parasitic disease caused by the larvae of the fly *Cochliomyia hominivorax*, which results in significant morbidity and mortality, especially in domestic animals such as cattle and sheep, leading to substantial economic losses in the agribusiness sector and posing a health problem. The resistance of these parasites to conventional treatments, coupled with environmental and health concerns arising from the continuous use of certain insecticides, has prompted the search for new alternatives. Insect Growth Regulators (IGRs) are chemical compounds that interfere with the growth and development of these organisms, primarily targeting the immature forms. Among the main IGRs, novaluron, a chitin synthesis inhibitor, has shown greater efficacy in controlling dipterans. In the present study, first (L1) and third (L3) instar larvae of *C. hominivorax* were exposed to different concentrations of novaluron. The methodologies used were adapted for each stage: i) L1 larvae were exposed to larval diet supplemented with novaluron, and ii) L3 larvae were exposed using filter paper impregnated with the IGR. The life cycle was observed to determine at which stage the insecticidal effect of novaluron occurred. A mortality rate of 91.7% was observed for larvae exposed to 0.05 ppm of novaluron in the developmental assay. In the L3 assays, an activity of 94.1% against pupae was observed at a concentration of 100 ppm. The lethal concentrations for 50% of larvae and pupae were 0.010 ppm and 21 ppm, respectively. Based on these results, it can be concluded that novaluron exhibited activity against *C. hominivorax* larvae by interfering with the developmental cycle, demonstrating larvicidal and pupicidal effects on L1, as well as inhibiting adult emergence after L3 exposure.

**Keywords:** Benzoylphenylurea, Control, Development disruptors, Myiasis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica de *Chrysomya bezziana* (vermelho) e *Cochliomyia hominivorax* (laranja). Fonte: Boletim de Doenças de Animais Exóticos - nº 109.....5
- Figura 2.** Desenho experimental com L1. A - Adição do Ecogel ao meio larval após a impregnação com novaluron; B - Homogeneização com espátula de madeira; C - Incubação de larvas de primeiro ínstar (L<sub>1</sub>) de *Cochliomyia hominivorax* no meio larval; D - Recipientes após serem passados para vermiculita e mantidos em câmara climatizada. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.....18
- Figura 3.** Desenho experimental com L3. A - Impregnação do papel filtro sobre papel laminado; B - Larvas de terceiro ínstar abandonando espontaneamente o substrato; C - Coleta das pré-pupas com pinça entomológica ultrasensível. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.....20
- Figura 4.** Larvas de *Cochliomyia hominivorax* (compatíveis com L<sub>2</sub>) em meio larval impregnado por novaluron nas concentrações de 0,09 ppm (A) e 0,1ppm (B).....22
- Figura 5.** Pupas recuperadas após a exposição de larvas de primeiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* ao novaluron. (A) Controle; (B) Concentração de 0,05ppm; (C) Concentração de 0,07ppm e (D) Larvas mortas da concentração de 0,07ppm.....23
- Figura 6.** A - Larvas de terceiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* pós incubação, armazenadas em câmara climatizada. B - Gaiolas experimentais, sofrendo estimulação para postura. C - Meio de oviposição oferecido para moscas adultas com presença de massa de ovos. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.....30
- Figura 7.** Adultos de *Cochliomyia hominivorax* retidas no pupário. A - Visão lateral. B - Visão frontal. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.....31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Padrões macroscópicos para avaliação da atividade do Novaluron em L1 da espécie <i>Cochliomyia hominivorax</i> , obtidas da colônia do LQEPV.....	25
<b>Tabela 2.</b> Quantidade de larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> de primeiro ínstar que sobreviveram (ou foram capazes de pupar) após o tratamento com diferentes concentrações de Novaluron e a eficácia larvicida das formulações.....	25
<b>Tabela 3.</b> Quantidade de insetos adultos de <i>Cochliomyia hominivorax</i> , emergidos após a exposição a diferentes concentrações de Novaluron, avaliados a partir de larvas de primeiro ínstar e taxa de mortalidade.....	26
<b>Tabela 4.</b> Larvas de primeiro ínstar incubadas para avaliação da recuperação de adultos de <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....	27
<b>Tabela 5.</b> Larvas de terceiro ínstar incubadas para avaliação da recuperação de adultos de <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....	28
<b>Tabela 6.</b> Mortalidade de larvas de terceiro ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> submetidas a diferentes concentrações de Novaluron após 24 horas de exposição.....	29
<b>Tabela 7.</b> Taxa de inibição de desenvolvimento a partir de larvas de terceiro ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> submetidas a diferentes concentrações de Novaluron, até a fase de pupa.....	32
<b>Tabela 8.</b> Percentual de redução de peso das pupas recuperadas a partir de larvas de terceiro ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> submetidas a diferentes concentrações de novaluron.....	33
<b>Tabela 9.</b> Inibição de desenvolvimento a partir de larvas de terceiro ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> submetidas a diferentes concentrações de novaluron, até a fase adulta.....	34
<b>Tabela 10.</b> Análise de Probit do novaluron frente as larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....	35

## **LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS OU SÍMBOLOS**

**B.O.D** – Câmara incubadora B.O.D

**BPU** – benzoilfenil ureia

**IE** – Inibição da emergência

**IGR** – Inibidores do Crescimento dos Insetos

**ISQ** – Inibidor de Síntese de Quitina

**L1** – Larva de primeiro ínstar

**L2** – Larva de segundo ínstar

**L3** – Larva de terceiro ínstar

**LQEPV** – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

**SE** – Solução Estoque

**SM** – Solução mãe

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
<b>2.1 Moscas de Importância Médico-veterinária</b> .....	3
<b>2.2 Miíases</b> .....	3
<b>2.3 <i>Cochliomyia hominivorax</i></b> .....	4
2.3.1 <i>Distribuição Geográfica</i> .....	5
2.3.2 <i>Ciclo Biológico</i> .....	6
<b>2.4 Impactos Econômicos relacionados a Miíase</b> .....	8
<b>2.5 Controle</b> .....	9
2.5.1 <i>Técnica do Inseto Estéril</i> .....	10
<b>2.6 Reguladores de Crescimento de Insetos</b> .....	11
2.6.1 <i>Inibidores de síntese de quitina</i> .....	11
2.6.1.1 Novaluron .....	13
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	15
<b>3.1 Obtenção das larvas de <i>Cochliomyia hominivorax</i></b> .....	155
<b>3.2 Avaliação <i>in vitro</i> da Atividade do Novaluron sobre Larvas de 1º ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i></b> .....	15
<b>3.3 Avaliação <i>in vitro</i> da Atividade do Novaluron sobre Larvas de 3º ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i></b> .....	19
<b>3.4 Análise dos Dados</b> .....	20
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
<b>4.1 Atividade do Novaluron sobre larvas de 1º Ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i></b> .....	222
<b>4.2 Atividade do Novaluron sobre larvas de 3º Ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i></b> .....	277
<b>4.3 Concentrações Letais de Novaluron para <i>Cochliomyia hominivorax</i></b> .....	35
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	36
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	377
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	38
<b>8 APÊNDICES</b> .....	44

## 1 INTRODUÇÃO

*Cochliomyia hominivorax* é uma espécie de mosca produtora de miíase primária, vulgarmente conhecida como bicheira. Suas larvas são parasitos obrigatórios que se alimentam dos tecidos vivos de todos os animais de sangue quente, inclusive o homem.

Sua área de distribuição original estendia-se do Sul dos EUA e por toda a América Latina, desde o México até o norte do Chile e Argentina, mas devido a diversos programas de erradicação, foi eliminada dos Estados Unidos e América Central. As miíases provocadas pelas larvas de *C. hominivorax* causam grande morbidade e mortalidade, sobretudo em animais domésticos como bovinos e ovinos, acarretando grandes prejuízos econômicos ao agronegócio.

Essas larvas provocam miíases obrigatórias (biontófagas) e as práticas de rotina no manejo dos bovinos, presente na pecuária, como castração e descorna, predispõem os animais ao parasitismo. Os prejuízos ocasionados por essa mosca, especialmente à pecuária brasileira, são bastante expressivos, devido aos altos custos dos tratamentos normalmente realizados para prevenir e tratar os animais doentes. No Brasil, a estimativa de perdas determinada pela infestação por *C. hominivorax* gira em torno de 336 milhões de dólares. Além disso, há problemas decorrentes da mutilação dos animais, danos ao couro e mortalidade, que reduzem a produtividade e podem até mesmo afetar a fertilidade quando a miíase ocorre no escroto de reprodutores

No Brasil, os bezerros no período neonatal são mais susceptíveis as miíases, devido à atração da mosca pelo coto do cordão umbilical, região onde realiza a postura de ovos. O parasito também pode depositar seus ovos em locais recém manejados, como em casos de problemas no parto, como retenção de anexos fetais ou intervenções relacionadas ao manejo como castração, descorna ou ferimentos em cercas de arame farpado. A espoliação, causada por carrapatos, também aumenta a susceptibilidade a este agente parasitário, devido às feridas que normalmente aparecem no quadro. Caso o tratamento não seja realizado em tempo hábil a infestação poderá ocasionar a morte dos animais, principalmente dos jovens.

No Brasil, um dos tratamentos preconizados para o controle de miíases consiste na utilização de inseticidas sintéticos. Estes produtos são comumente conhecidos como “matabicheiras”, tendo em sua composição principalmente organofosforados e piretróides. No entanto, existem preocupações relacionadas ao aumento da resistência, além dos problemas ambientais e de saúde, associadas ao uso contínuo de alguns inseticidas neurotóxicos, sugerindo a necessidade de novos estudos para o controle deste parasito.

Mesmo com advento de novas moléculas, esses meios de controle devem ser investigados para que realmente reduzam ou eliminem a possibilidade de reinfestação. Alternativas vêm sendo estudadas e, dentre elas, os Reguladores de Crescimento dos Insetos, que são compostos químicos que interferem no crescimento e desenvolvimento fisiológico e morfológico do parasito durante os processos de metamorfose e muda, impedindo a emergência de adultos. Por agirem diretamente no sistema hormonal dos insetos, são considerados mais seletivos e específicos do que os inseticidas convencionais, sendo uma alternativa eficaz nos programas de controle de vetores e no manejo da resistência. Se utilizados nas doses recomendadas, não são tóxicos aos mamíferos e degradam facilmente, sendo benéfico ao ambiente.

Nos Estados Unidos os prejuízos gerados por essas miíases levaram ao desenvolvimento de um programa de erradicação, denominado *Sterile Insect Technique* (SIT) (em português, Técnica do Inseto Estéril) baseado na criação de mosca da espécie em laboratório e esterilização de machos com a utilização de raios gama. Os machos estéreis foram liberados no ambiente em grande quantidade e, como as fêmeas copulam uma única vez, ocorreu uma diminuição acelerada da população desses dípteros, levando a sua rápida erradicação nos Estados Unidos.

A busca de estratégias deve ser constante, no entanto, o desenvolvimento de novas formulações é um processo longo e oneroso. A avaliação da eficácia de produtos já existentes no mercado frente a novos parasitos-alvos pode demonstrar uma nova alternativa para o controle das populações de parasitos mais tolerantes aos antiparasitários. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* do Novaluron sobre formas imaturas de *C. hominivorax* na interrupção do desenvolvimento do ciclo biológico, determinando sua eficácia na inibição e as concentrações letais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Moscas de Importância Médico-veterinária

As moscas pertencem à ordem Diptera, a quarta maior ordem de insetos depois dos coleópteros, lepidópteros e himenópteros. Das 110.000 espécies de dípteros, somente cerca de vinte espécies distribuídas por dez famílias estão mais intimamente ligadas aos seres humanos nas áreas urbanas, sendo as mais importantes as famílias Muscidae, Fanniidae, Calliphoridae e Sarcophagidae (D'ALMEIDA; ALMEIDA, 1998).

Na subordem Muscomorpha são conhecidas 62 famílias com milhares de espécies de moscas saprófagas, necrófagas, predadoras ou hematófagas, muitas das quais possuindo grande importância biológica e/ou médico-veterinária para os seres humanos (NEVES, 2004; VIANNA et al., 2004). Algumas espécies de dípteros muscóides causam miíases obrigatórias ou facultativas nos animais e em seres humanos (MARCHIORI; SILVA, 2001), podendo também atuar como carreadores de diversos microrganismos patogênicos (CARVALHO; VON ZUBEN, 2006).

### 2.2 Miíases

Miíase (em grego, *myia*, mosca e *ase*, doença), termo definido por Zumpt (1895), é a parasitose de tecidos e órgãos de seres humanos e animais vertebrados vivos por larvas de dípteros, que em um curto período, causam lesões por se alimentam do tecido vivo ou morto do hospedeiro, sendo sua ocorrência mais frequente nas áreas rurais dos países tropicais (MARTINEZ et al., 2003). Os registros sobre a ocorrência das miíases datam do Século XVI, quando Frei Bernardino de Sahagún, que viveu de 1529 a 1590 na Nova Espanha, México, relatou a existência de "larvas que se criam nos braços e membros de coelhos e ratos", como "vermes metidos dentro da carne" (GUIMARÃES et al., 1983; BARILACHI, 2005).

As larvas de moscas que desenvolvem uma parte do seu ciclo ou completam ele dentro, ou sobre o corpo de um hospedeiro vertebrado, podem ser classificadas como causadoras de miíases (NEVES et al., 2011). As principais moscas relacionadas às miíases pertencem às famílias Oestridae, Sarcophagidae e Calliphoridae (HALL; WALL, 1995).

As miíases do tipo furunculóide, primárias, são provocadas por larvas biontófagas parasitárias de tecidos sadios, sendo as moscas das espécies *Dermatobia hominis*, *C. hominivorax* e *Oestrus ovis* as principais responsáveis por essas lesões (D'ALMEIDA, 1986). Outro tipo de miíase, secundária, decorre da invasão de tecidos necrosados por larvas

necrobiontófagas, sendo as mais frequentes as moscas dos gêneros *Sarcophaga*, *Lucilia*, *Chrysomya* e *Musca* (DEAR, 1981; LIMA, 1999;).

Bovinos, ovinos, equinos, suínos, caprinos e caninos são as espécies mais frequentemente identificadas como hospedeiras de miíases instaladas em ferimentos causados por amputação da cauda, castração, cortes com arame farpado, lesões por plantas espinhosas, umbigo de animais recém-nascidos, áreas lesadas por picadas de carrapatos e outros tipos de lesão (DIAZ, 1999).

### **2.3 Cochliomyia hominivorax**

Em março de 1858, Coquerel, um médico da marinha francesa, coletou algumas larvas de uma miíase dos seios frontais e nasais de um presidiário da Guiana Francesa. Da cultura destas larvas obteve formas adultas de um díptero que ele descreveu como *Lucilia hominivorax*. Em maio do mesmo ano, o autor publicou um segundo trabalho, no qual redescreveu a espécie e advertiu para o fato de ser aquela mosca diferente de "macellaria F." (AUBERTIN; BUXTON, 1934). Townsend (1915) descreveu o gênero *Cochliomyia*, tendo como espécie o tipo *Musca macellaria* F. por designação original.

Em 1933, Cushing e Patton observaram que a mosca que exercia parasitismo nos Estados Unidos (EUA) não era *Cochliomyia macellaria* F. e sim outra, que denominaram de *Cochliomyia americana*. Aubertin e Buxton (1934), após examinarem três exemplares da coleção Bigot, concluíram que *C. americana* de Cushing e Patton (1933) era sinônimo de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858). O gênero *Cochliomyia* pertencente à família Calliphoridae, é constituído por quatro espécies: *C. hominivorax* (Coquerel), *C. macellaria* (Fabricius), *C. aldrichi* e *C. minima* (DEAR,1985). As duas primeiras estão relacionadas aos casos de miíases, porém, a que apresenta maior importância, é *C. hominivorax* (FAO, 1993).

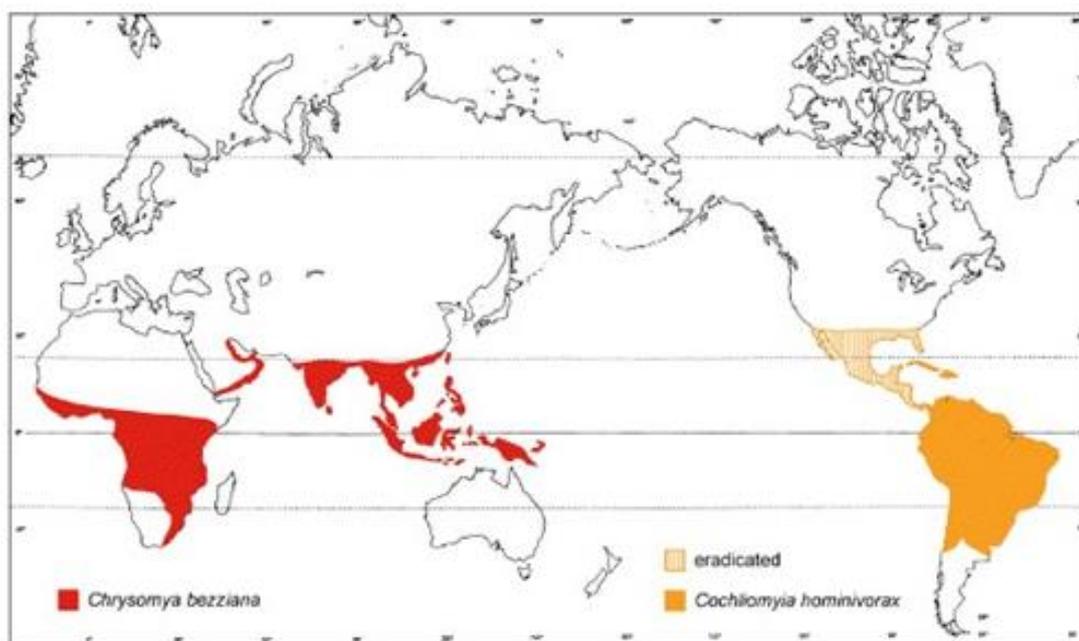
As moscas califorídeos são caliptradas de tamanho médio a grande (4 a 16 mm), com abdome arredondado ou oval, corpo de coloração escura com reflexos azuis metálicos, violáceos, esverdeados ou cúpricos, no tórax e abdome (CARVALHO; RIBEIRO, 2000; RODRIGUES-GUIMARÃES et al., 2001). Os reflexos azul-metálico do mesonoto apresentam padrão de três faixas negras longitudinais (sendo a do meio mais curta), basicosta preta, olhos de cor amarelo-avermelhado, cabeça amarelo-brilhante, parte inferior da parafrentália preta e pernas alaranjadas (MARCONDES, 2001; NEVES, 2004). Este inseto causa miíase primária ou bicheira nos animais domésticos, especialmente em bovinos, ovinos, equinos, caprinos e caninos, atacando principalmente nos meses mais quentes do ano (CRAMER-RIBEIRO et al., 2002).

Na Venezuela, os cães são os hospedeiros secundários mais importantes e dentre os animais selvagens de zoológicos, a maioria dos casos de míases ocorrem em felídeos (CORONADO; KOWALSKI, 2009).

### 2.3.1 Distribuição Geográfica

A mosca *C. hominivorax* é nativa das Américas (LELLO et al., 1982; MOYA-BORJA, 2003) e é endêmica na maioria das regiões do Brasil (MADEIRA et al., 1998). Embora seja encontrada em regiões com clima tropical e subtropical, a mosca também se desenvolve em locais de clima temperado, quando as condições climáticas são favoráveis (STUART et al., 1995). Historicamente, sua distribuição estendia-se desde a região central e sul dos Estados Unidos da América até o México, América Central, Caribe e América do Sul (HALL, 1991).

Como resultado de 45 anos de estudos sobre a biologia de *C. hominivorax* e participação ativa dos pecuaristas, a supressão e erradicação foram alcançadas nos Estados Unidos, no México, em Belize, na Guatemala, em Honduras, em El Salvador, na Nicarágua, na Costa Rica, no norte do Canal do Panamá, em algumas ilhas do Caribe e da Líbia e no norte da África, utilizando insetos estéreis, por meio da técnica de esterilização dos machos com radiação gama (VARGAS-TERÁN et al., 2005). Atualmente, uma instalação de biossegurança para criação em massa, esterilização e dispersão de bicheiras é mantida no Panamá para evitar a reintrodução na Colômbia (CONCHA et al., 2016). A distribuição atual desta espécie compreende o Caribe e a América do Sul, exceto Chile (FRESIA et al., 2011).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de *Chrysomya bezziana* (vermelho) e *Cochliomyia hominivorax* (laranja). Fonte: Boletim de Doenças de Animais Exóticos – nº 109.

Entretanto, o Brasil, e outros países da América do Sul, continuam sendo os locais mais acometidos por essa parasitose, levando a sérios prejuízos no (GRISI et al., 2002). A distribuição e quantidade de animais de produção e das populações de animais silvestres, as práticas de manejo, o movimento comercial de animais, a densidade de população humana, as condições socioeconômicas, os serviços públicos de saúde, a geografia e os fatores climáticos ditam a gravidade das infestações e a magnitude do problema econômico (VARGAS-TERÁN et al., 2005; ROBINSON et al., 2009). No entanto, entre essas variáveis, as condições climáticas constituem o principal fator de influência na epidemiologia de *C. hominivorax* (RAHN; BARGER, 1973; VARGAS-TERÁN et al., 2005).

A ocorrência de míases pode estar relacionada a dois fatores que influenciam diretamente a distribuição dos casos no território brasileiro. A maioria das ocorrências está localizada nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste, este fato está correlacionado a um rebanho bovino maior nessas regiões, representando 66% e 78% da população bovina nacional em 1980 e 2010, respectivamente (IBGE, 2018) e a um maior número de artigos científicos na área de ciências agrárias provenientes dessas regiões. Portanto, são necessários mais estudos para a determinação da distribuição mais completa desta praga, principalmente em regiões onde as informações são escassas ou simplesmente inexistentes. A ausência de confirmação da espécie, como observado em diversos relatos, também limita os estudos epidemiológicos (COSTA-JÚNIOR et al. 2019).

### **2.3.2 Ciclo Biológico**

As moscas são insetos holometabólicos e passam pelo processo de metamorfose completa. Durante seu desenvolvimento, passam por vários ínstares, que diferem a forma adulta alada, tanto na aparência como no comportamento, inclusive em relação ao seu habitat. O controle da metamorfose e ecdise é hormonal, realizado por glândulas que produzem os hormônios e os lançam diretamente na hemolinfa. Existem três tipos principais de hormônios envolvidos nesse processo: hormônio do cérebro, que comanda as células secretoras e o *corpus cardiacus*; o ecdisônio, que controla a ecdise; e o neotenim, o hormônio juvenil, que impede a transformação antecipada, mantendo as características larvais, já que uma mudança para a fase adulta, fora do período correto, originaria um adulto precoce, incapaz de se alimentar e se reproduzir (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2005).

A mosca *C. hominivorax*, é ovípara e, após a cópula, realiza a postura em massas compactas, com média de duzentos a trezentos ovos nas bordas de ferimentos da pele ou em mucosas de mamíferos de sangue quente. As larvas, com ajuda das enzimas proteolíticas

contidas na saliva, alimentam-se de fluidos corporais e de tecido muscular do hospedeiro, ficam agregadas e com as peças bucais voltadas para o interior da ferida, mantendo os espiráculos respiratórios voltados para o exterior. Estas lesões liberam um odor desagradável, que serve para atrair mais moscas, que fazem postura de mais ovos e outras espécies como *Phaenicia* spp., *Lucilia* spp. e *Cochliomyia macellaria*, que normalmente se proliferam em carcaças, mas podem crescer em animais vivos, originando miíases cutâneas secundárias (OLIVEIRA et al., 1982).

O período de incubação dos ovos varia entre 11 e 21 horas. Após a eclosão dos ovos as larvas penetram no tecido e iniciam o período parasitário. As larvas alimentam-se no hospedeiro por aproximadamente sete dias, e, durante esse período, crescem e sofrem mais duas mudas, para larva de segundo e terceiro estágio (L2 e L3). Em laboratório o período de L1 e L2 é de 24 horas, e de L3 entre quatro e cinco dias. O desenvolvimento de todos os estágios larvais se dá entre 4 e 8 dias, quando as larvas se desprendem do hospedeiro para a pupação. A L3 madura abandona a ferida e cai no solo, onde se enterra e se transforma em pupa, e esta, após um período de pupação, dará origem à mosca, reiniciando o ciclo.

Entre o último ínstar larval e o adulto ocorre um período de transição denominado de pré-pupa e, no final, acontece a formação das pupas. As larvas alteram seu comportamento, contraindo o volume corporal e parando de se alimentar. O tegumento escurece e torna-se mais vincado e, ao mesmo tempo, ocorrem profundas transformações internas (CARVALHO, 1986). Antes da total imobilidade, as larvas procuram um substrato mais seco e protegido para pupação, enterrando-se no solo por um período de aproximadamente uma semana, durante a qual respiram intensamente. Após esse período, as pré-pupas imobilizam-se e sofrem as transformações metamórficas que conduzem a formação da pupa coarctada, já que ficam encerradas no invólucro endurecido constituído pela exúvia larvar, o pupário em forma de barril, o qual vai se tornando mais escuro à medida que o processo de queima fenólica avança (COSTA et al., 2004; MARCONDES, 2001).

Após cinco ou seis dias, os adultos emergem do pupário por um opérculo circular com o auxílio do ptilineo, uma bolsa localizada acima da região onde são implantadas as antenas, que após a emergência se retrai e forma a fissura ptilineal, em formato de U invertido (MARCONDES, 2001). Em condições ótimas de temperatura e umidade do ar, o ciclo evolutivo total se completa em até 23 dias (MACHADO; RODRIGUES, 2002). Em condições favoráveis, normalmente na época de temperaturas mais elevadas, a fase de pupa ocorre em cerca de sete dias, enquanto nas épocas mais frias este período pode se estender por até dois

meses. O período de pupa varia de acordo com as condições ambientais (principalmente temperatura e umidade). O desenvolvimento é fortemente influenciado pelas condições climáticas do ambiente, sendo mais lento sob baixas temperaturas, mas não foi registrada a ocorrência de diapausa (HALL, 1991). Geralmente, sob condições ótimas, o ciclo de vida pode se completar em menos de três semanas (VARGAS-TERÁN et al., 2005).

Após emergirem, copulam no terceiro a quarto dia e, no sétimo dia de vida, podem realizar a primeira postura (LAAKE et al., 1936 apud CRYSTAL, 1967a). Machos e fêmeas adultas têm hábito diurno e podem voar mais de quarenta quilômetros de distância, sobreviver, em média, quatro semanas, sob temperatura de 25 °C e 70% de umidade relativa do ar (LEITE, 2004). Entre o 2° e 3° dia após a emergência inicia-se o período cópula, entretanto, fêmeas expostas a baixas temperaturas, iguais ou abaixo de 10 °C, morrem antes de copular. Os machos encontram-se aptos a copular entre o 4° e 6° dia da fase adulta (GUIMARÃES et al., 1983).

A parte mais importante do ciclo de *C. hominivorax*, que requer identificação, é a fase larval. Para realizar a identificação dos diferentes estádios larvais é necessário extrair as larvas da parte mais profunda da ferida infestada, evitando assim que sejam coletados os parasitos facultativos, como larvas de *C. macellaria*, que são superficialmente muito similares às larvas de *C. hominivorax* e podem eventualmente colonizar as partes rasas da ferida (GUIMARÃES et al., 1983).

## **2.4 Impactos Econômicos relacionados a Miíase**

As miíases podem causar enorme perda na qualidade do couro, devido à quantidade elevada de lesões na pele, causando depreciação da aparência, necessitando de um acabamento mais cuidadoso e especializado, elevando o custo unitário e total do couro (GUGLIELMONE, 2000; SILVA; DE LA RUE, 2002). Mesmo pequenas infestações de larvas podem ocasionar prejuízos à produção por conta dos danos causados à saúde dos animais, principalmente quando estão subnutridos ou estressados, sob condições inadequadas de manejo (GOMES et al., 1998; SANTOS et al., 2002).

As perdas econômicas causadas pelas miíases, associadas àquelas ocasionadas por ectoparasitos e endoparasitas, são fatores limitantes para a pecuária Brasileira (CARVALHO et al., 2009). Os gastos gerados pela *C. hominivorax* na pecuária brasileira são de R\$ 336, 62 milhões/ano (GRISI et al., 2014). As principais perdas estão relacionadas a mortalidade em bezerros recém-nascidos, redução na qualidade do couro e na produção de leite e carne (CARVALHO et al., 2009). Além das perdas econômicas, as miíases prejudicam também o bem-estar animal, pois, por menor que seja a infestação, atrapalham seus hábitos, incluindo sua

alimentação e descanso. Desta forma, a miíase é considerada uma praga, principalmente em criações de bovinos, ovinos, caprinos e suínos (VARGAS-TERÁN; HOFMANN; TWEDDLE, 2005).

Na pecuária, um inseto só é considerado praga quando sua população aumenta até causar um nível particular de dano, conhecido como "limiar de dano econômico". Quando este limiar é atingido, as medidas de controle (ou manejo) devem ser acionadas. *C. hominivorax* é classificada como praga constante porque está sempre presente na criação de animais, causando danos econômicos todos os anos, já que sua densidade populacional varia pouco de um ano para outro. *M. domestica*, *L. cuprina* e *C. megacephala* são consideradas pragas ocasionais por apresentarem baixa densidade populacional, porém, em condições ambientais favoráveis, podem aumentar suas populações rapidamente (ZUCCHI et al., 1999; CARVALHO et al., 2003).

A coexistência de cães e animais de fazenda como bois, cavalos, ovelhas e porcos em áreas rurais ou florestais, criam as condições ideais para a proliferação de moscas (CRAMER-RIBEIRO et al., 2002). Com o decréscimo do número de estábulos em áreas urbanas, acreditava-se que a abundância destes insetos diminuiria, porém, o aumento populacional humano, acaba proporcionando condições adequadas para o desenvolvimento das moscas, seja no lixo doméstico diário ou no corpo e nas fezes dos animais de estimação e de carga, que servem de substratos para a criação de suas larvas (D'ALMEIDA, 1994; OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

## **2.5 Controle**

O controle químico consiste na utilização de substâncias químicas, às quais se dá o nome de inseticidas. A prática de utilizar substâncias químicas, para a eliminação dos insetos, é antiga; em um papiro egípcio de 1500 a.C. já se encontram fórmulas para repelir ou matar vespas, pulgas e piolhos (MACHADO, 1987). Os inseticidas químicos convencionais usados no controle de vetores podem ser classificados em quatro classes de acordo com a natureza química: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, todos atuando de alguma forma no sistema nervoso do inseto (LARA; BATISTA 2002).

O controle químico continua sendo uma das principais estratégias de combate de vetores, embora sempre acompanhado do problema da contaminação ambiental e resíduos nos produtos pecuários (carne e leite), sem considerar os fatores de resistência crescentes. A situação se torna crítica devido ao aumento da resistência dos vetores aos inseticidas utilizados, associada à baixa quantidade de formulações de inseticidas novos, desenvolvidos e

comercializados para o controle (PAUL et al., 2006).

De acordo com Fontoura (2008), o uso de inseticidas alternativos para o controle de insetos, como toxinas de bactérias entomopatogênicas e reguladores do crescimento de insetos (IGR – Insect Growth Regulators), é urgente e surgem como uma ferramenta para o controle de vetores, em particular os de importância médica. Nas décadas de 1970 e 1980, foram desenvolvidas drogas específicas para o controle de larvas de dípteros. Substâncias como o metopreno, um regulador de crescimento, ou inibidores da síntese de quitina, como o diflubenzuron, não afetam o desenvolvimento das larvas de besouros e de outros inimigos naturais das moscas, que atuam na desintegração e incorporação do bolo fecal ao solo, porém, o uso de larvicidas nas rações pode causar o aumento da resistência ao produto, pelas larvas das moscas presentes no esterco (WRI, 2000).

### 2.5.1 Técnica do Inseto Estéril

Segundo a International Plant Protection Convention (FAO, 2005), a Técnica do Inseto Estéril (TIE) foi definida como um “método de controle de pragas usando liberações inundativas de insetos estéreis em área-ampla visando reduzir a fertilidade de uma população selvagem da mesma espécie”. Ao transferir espermatozoides com mutações letais dominantes (induzidas tradicionalmente por radiações ionizantes) para as fêmeas selvagens, a geração seguinte é inviabilizada. Basicamente, pode-se dizer que a TIE é composta de 3 etapas: produção em massa da espécie-alvo, esterilização dos insetos, e liberação no campo. A TIE não funciona quando as linhagens do inseto estéril e do selvagem são incompatíveis sexualmente (DYCK et al., 2005a).

Visando explorar essa potencial limitação, iniciaram-se diversos estudos buscando verificar o grau de variabilidade inter e intra-populacional de *C. hominivorax* de diferentes localizações geográficas. Na Venezuela, populações de laboratório foram estabelecidas (IAEA, 2004b). Pesquisas preliminares com “isozyme loci” evidenciaram que *C. hominivorax* deve formar uma única população panmítica nas Américas (AZEREDO-ESPIN, 1993; KRAFSUR; LESSINGER; AZEREDO-ESPIN, 2000; TAYLOR; PETERSON II, 1994; TAYLOR et al., 1996a; WHITTEN, 1993).

Infante-Malaquias et al. (1999) sugeriram que a América do Sul pode ser, na verdade, o centro de origem da espécie. Através de marcadores moleculares como *mtDNA* e microsátélites, foram encontradas pequenas diferenças entre populações no Uruguai e no Brasil (LYRA et al., 2005; IAEA, 2006; TORRES et al., 2007). Entretanto, ainda existe a necessidade de trabalhos que investiguem os resultados dos cruzamentos entre essas populações em laboratório e no

campo. A incompatibilidade entre a linhagem estéril e a selvagem de *C. hominivorax* também já foi constatada, com os machos selvagens rejeitando as fêmeas estéreis (IAEA, 2006).

Para que um programa de manejo integrado de pragas em área-ampla integrando a TIE tenha sucesso, existem vários pré-requisitos técnicos e gerenciais. Os requisitos técnicos incluem: disponibilidade de informações precisas e atualizadas para o desenvolvimento de uma estratégia apropriada, compatibilidade e competitividade adequadas entre a linhagem usada e os insetos selvagens da população-alvo, alta qualidade dos insetos estéreis liberados e um forte e contínuo sistema de monitoramento (MASTRANGELO, 2011).

## **2.6 Reguladores de Crescimento de Insetos**

Os IGR surgiram na década de 1970 como produtos que poderiam substituir os inseticidas convencionais (MARTINS; SILVA, 2004). São considerados a terceira geração de inseticidas (após os inorgânicos e os orgânicos sintéticos)(CASIDA; QUISTAD 1998).

Diferente do observado com os inseticidas químicos convencionais, os IGR atuam seletivamente no desenvolvimento, metamorfose e reprodução dos insetos-alvo, ao invés de promoverem intoxicação direta (HOFFMANN; LORENZ 1998; MARTINS; SILVA 2004). Os IGR não são necessariamente tóxicos aos insetos-alvo; ao invés disso, causam anormalidades que os impedem de sobreviver ou alcançar o estágio adulto (TUNAZ; UYGUN 2004). Apresentam grande atividade sobre os estágios imaturos de mosquitos e outros insetos interferindo no seu desenvolvimento e, com isto, reduzindo a emergência de adultos viáveis (“inibição da emergência”, ou IE).

Grande parte dos IGR são eficazes contra os vetores, incluindo aqueles que apresentam resistência aos inseticidas convencionais, devido ao seu mecanismo de ação ser distinto (SILVA; MENDES 2002; THAVARA et al., 2007). Os IGR podem ser divididos em três tipos, dependendo do seu modo de ação: os análogos e antagonistas de hormônio juvenil; análogos e antagonistas de ecdisona; e inibidores de síntese de quitina (GRAF, 1993; HOFFMANN, LORENZ 1998; KOSTYUKPVSKY; TROSTANETSKY, 2006). Um ponto positivo dos IGR é sua baixa toxicidade aos mamíferos e degradação rápida no ambiente (KOSTYKOVISKY; TROSTANETSKY, 2006).

### **2.6.1 Inibidores de síntese de quitina**

A quitina é o segundo polímero biológico mais abundante, depois da celulose. É o principal componente da cutícula que reveste externamente o corpo dos insetos. Também está presente em alguns tecidos como no papo, intestino anterior e posterior, formando uma camada

cuticular que os reveste internamente (TELLAM et al., 2000). É também parte da matriz peritrófica, que funciona como uma barreira entre o bolo alimentar e o epitélio do intestino médio (MERZENDORF; ZIMOCH, 2003). Outras estruturas do corpo dos insetos também têm quitina, como as traqueias, que apresentam um tubo cuticular (íntima) revestindo seu interior (TELLAM et al., 2000).

A quitina fornece ao exoesqueleto suporte mecânico e estrutural, funcionando como uma barreira de proteção contra as agressões ambientais. Devido à rigidez de seu exoesqueleto os insetos, para crescer, necessitam realizar mudas periódicas (BOGWITZ, 2005). Para produzir um novo exoesqueleto, são necessárias várias etapas que envolvem degradação da cutícula antiga, síntese dos componentes da nova cutícula e “montagem” da nova cutícula. No entanto, os processos de produção, transporte e deposição da quitina que comporá o exoesqueleto envolvem complexas transformações bioquímicas e biofísicas, intra e extracelulares, que na sua maioria permanecem não entendidas (COHEN, 2001; MENZENDORF, 2005).

A ausência de quitina nos vertebrados faz com que os inibidores de síntese de quitina (ISQ) possam ser usados como uma ferramenta específica para o controle de insetos e fungos. Os ISQ podem ser diferenciados em dois grandes grupos: os peptidil-nucleosídeos, que atuam sobre fungos, e as benzoilfenilureias (BPU), que possuem grande ação sobre insetos (COHEN, 2001; MERZENDORF; ZIMOCH 2003). Diversas substâncias são capazes de inibir a síntese de quitina em insetos; no entanto, a maior parte dos ISQ usados no controle de insetos pertencem ao grupo das benzoil-fenil-uréias (MERZENDORF 2005; MERZENDORF; ZIMOCH 2003), sendo o diflubenzuron o primeiro composto desse grupo comercializado como inseticida (TUNAZ; UYGUN, 2004).

Por interferir no metabolismo da quitina, que é crucial para o crescimento dos insetos, as benzoilfenilureias provocam alterações na formação da cutícula durante o desenvolvimento, podendo causar muda abortiva. Alterações em outras estruturas que possuem quitina na sua composição, como a matriz peritrófica, também podem ser observadas (MERZENDORF, 2005). Além dos efeitos sobre as larvas, pode ocorrer inibição da pupação e os adultos derivados de larvas sobreviventes de doses subletais podem ter várias alterações na sua morfologia e fisiologia.

As BPUs possuem efeito pronunciado sobre larvas, que não conseguem sobreviver à muda devido a malformações da nova cutícula (GRAF, 1993). A ação desses ISQ já foi comprovada sobre vários insetos. Charmillot et al. (2001) empregaram diflumuron,

hexaflumuron e triflubenzuron sobre *Cydia pomonella* e concluíram que essas substâncias possuem grande potencial larvicida e ovicida.

### 2.6.1.1 Novaluron

O novaluron é um novo ISQ utilizado na agricultura, exibindo grande eficácia contra larvas de Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera, consideradas pragas de colheita (MULLA et al., 2003a). Esse ISQ é pouco tóxico aos mamíferos e não tóxico para aves, vermes do solo e microflora (OMS, 2003). Apesar de o novaluron ter sido, por vezes, considerado tóxico aos invertebrados aquáticos, sua baixa persistência do produto em sistemas aquáticos indica que não há exposição crônica significativa e que os riscos a longo prazo aos crustáceos devem ser considerados aceitáveis (OMS, 2003).

Em um estudo de eficácia, realizado em bovinos no Brasil, a concentração de novaluron no plasma sanguíneo após um único tratamento tópico (pour-on) na dose de 2,5 ou 5,0 mg/kg resultou em níveis máximos de 378 e 396 ng/mL, respectivamente. Durante 42 dias para o primeiro tratamento e 28 dias para o segundo, a concentração plasmática do fármaco permaneceu acima de 100 ng (SOUZA, 2009).

Os dados do estudo de Souza (2009) sugerem que o novaluron administrado topicamente em bovinos é progressivamente absorvido no sangue durante os primeiros dias após o tratamento, sendo ingerido por carrapatos e larvas de carrapatos, semelhante ao que foi relatado para o fluazuron em bovinos. Não foram realizados estudos em bovinos para investigar o armazenamento do novaluron no organismo dos animais tratados. No entanto, em estudos realizados em cães e gatos, após administração tópica, foi observado que o Novaluron pode ser armazenado em tecidos como gordura corporal e couro (JUNQUERA et al., 2019).

O estudo de Cetim (2009) mostrou que o uso de Novaluron como inibidor da síntese de quitina de *Musca domestica* proporcionou um bom controle das larvas dessa espécie, reduzindo de forma significativa a emergência de adultos. No estudo, foram utilizadas diferentes concentrações do produto e o Novaluron causou mais de 80% de mortalidade larval em doses de 10 e 20 mg a.i./kg. Esse ISQ age por ingestão, como já foi verificado em larvas das espécies *Spodoptera littoralis* e *Helicoverpa armigera*, e por contato sobre *Bemisia tabaci* e *Trialeurodes vaporariorum* (ISHAAYA et al 1996; 1998). Esse inseticida mostrou eficácia igual ou superior a outros IGRs quando utilizados para controle de mosquitos nos EUA, como diflubenzuron e piriproxifen (MULLA et al., 2003a).

Com base na revisão de literatura exposta, o presente estudo buscou avaliar a atividade *in vitro* do Novaluron sobre as formas imaturas do *C. hominivorax*, interrompendo o

desenvolvimento do ciclo biológico e determinando sua eficácia na inibição e as concentrações letais. Essa pesquisa visa contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de controle dessa espécie de mosca, principalmente das formas imaturas, visando a redução dos prejuízos econômicos e dos impactos na saúde e bem-estar dos animais afetados pelas miíases.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção das larvas de *Cochliomyia hominivorax*

Para o desenvolvimento da pesquisa *in vitro*, foram utilizadas larvas de *C. hominivorax* provenientes da colônia estabelecida no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Para obtenção das larvas de primeiro ínstar foi fornecido um substrato de oviposição para gaiolas com fêmeas aptas a postura. O substrato de oviposição é composto de 20 g de carne moída disposta nas laterais de uma placa de Petri de plástico (10 cm x 10 cm x 2 cm) umedecida com sangue bovino com anticoagulante aquecido à temperatura de 35 °C. O sangue bovino utilizado nos substratos da colônia foi proveniente do excedente utilizado na preparação de substrato larval da colônia de pulgas.

Foi colocado sobre o meio, um pedaço retangular de papel filtro para evitar que a poça de sangue causasse a morte das moscas. O substrato de oviposição foi transferido para gaiolas e, em um intervalo máximo de 24h, as posturas foram retiradas. Os ovos e/ou larvas, quando presentes, foram removidos do substrato com auxílio de uma pinça e submetidas diretamente a dieta larval, em recipiente de polipropileno, com tampa telada e armazenados na B.O.D., em temperatura a 32°C (MASTRANGELO; BEZERRA; FERNANDES, 2014).

A formulação da dieta larval foi feita de acordo com o protocolo de Mastrangelo (2014) adaptado, devido as suas vantagens em comparação aos outros tipos de dieta, como: baixo custo, alta viabilidade larval e maior tempo de demanda nutricional das larvas, além de eliminar menos odores.

Para obtenção das larvas de terceiro ínstar (pré-pupas), material incubado em B.O.D. necessitou ser observado a cada 24 horas, adicionando maior quantidade de meio larval de acordo com a necessidade das larvas. Após 48 horas de incubação, de acordo com a presença e atividade de L3, o recipiente foi acondicionado em outro reservatório com vermiculita para possibilitar a migração e aprofundamento das larvas para consequente evolução para fase de pupa (TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940).

#### 3.2 Avaliação *in vitro* da Atividade do Novaluron sobre Larvas de 1º ínstar de *Cochliomyia hominivorax*

A princípio foram confeccionados recipientes para o meio larval, onde as larvas foram incubadas. Foram utilizadas 33 tampas com um furo de aproximadamente 2 cm de diâmetro e tecido *voile* colados com cola quente, para seus respectivos potes de 145 ml de polipropileno.

Os potes foram identificados e divididos em triplicatas, denominadas R1, R2, R3, para cada um dos grupos experimentais.

As formulações feitas a partir do Novaluron foram elaboradas com base nos estudos de Fontoura (2008) e Cetim (2009), realizados em dípteros. As concentrações utilizadas foram 0,0001ppm, 0,001ppm, 0,005ppm, 0,01ppm, 0,03ppm, 0,05ppm, 0,07ppm, 0,09ppm, 0,1ppm. Um grupo controle foi preparado somente com o meio larval e um grupo placebo com o meio larval acrescido do diluente utilizado na formulação do produto, preparado com acetona a 16%, acrescida de duas gotas de polissorbato 80 (Tween 80).

As soluções, preparadas no laboratório de farmacometria do LQEPV, necessitaram de três preparos para alcançar as concentrações finais desejadas no meio larval. A solução mãe (SM), continha apenas Novaluron e acetona na proporção de 1:1, a solução estoque 1 (SE<sub>1</sub>) foi preparada a partir da SM, com acetona a 16%, água e 2 gotas de Tween 80. Já a solução estoque 2 (SE<sub>2</sub>) foi preparada a partir da SE<sub>1</sub>, com acetona a 16%, 2 gotas de Tween 80 e água. Para as concentrações 0,0001ppm e 0,001ppm foram pipetadas alíquotas da SE<sub>2</sub> e para as demais foi utilizado a SE<sub>1</sub>.

Com base na metodologia proposta por Medeiros (2018) adaptada, 20mL da fase líquida do meio larval foi transferida para os recipientes de 145mL. As alíquotas foram retiradas proporcionalmente em relação às adições das diluições de cada concentração, respeitando o volume final de 20mL. Para as concentrações de 0,0001ppm, 0,001ppm, 0,005ppm, 0,01ppm, 0,03ppm, 0,05ppm, 0,07ppm, 0,09ppm, 0,1ppm foram retiradas 0,4mL, 0,360mL, 0,280mL, 0,20mL, 0,120mL, 0,040mL, 0,020mL, 0,20mL e 0,02mL respectivamente e, posteriormente, foram acrescidas as mesmas quantidades em mililitros da solução contendo o ativo. Após a adição das soluções, os recipientes foram agitados manualmente. Na sequência, foram adicionados 0,6g de ecogel (FORTH GEL®) em cada recipiente, sendo homogeneizados com uma espátula de madeira, até a total incorporação, para solidificar o meio.

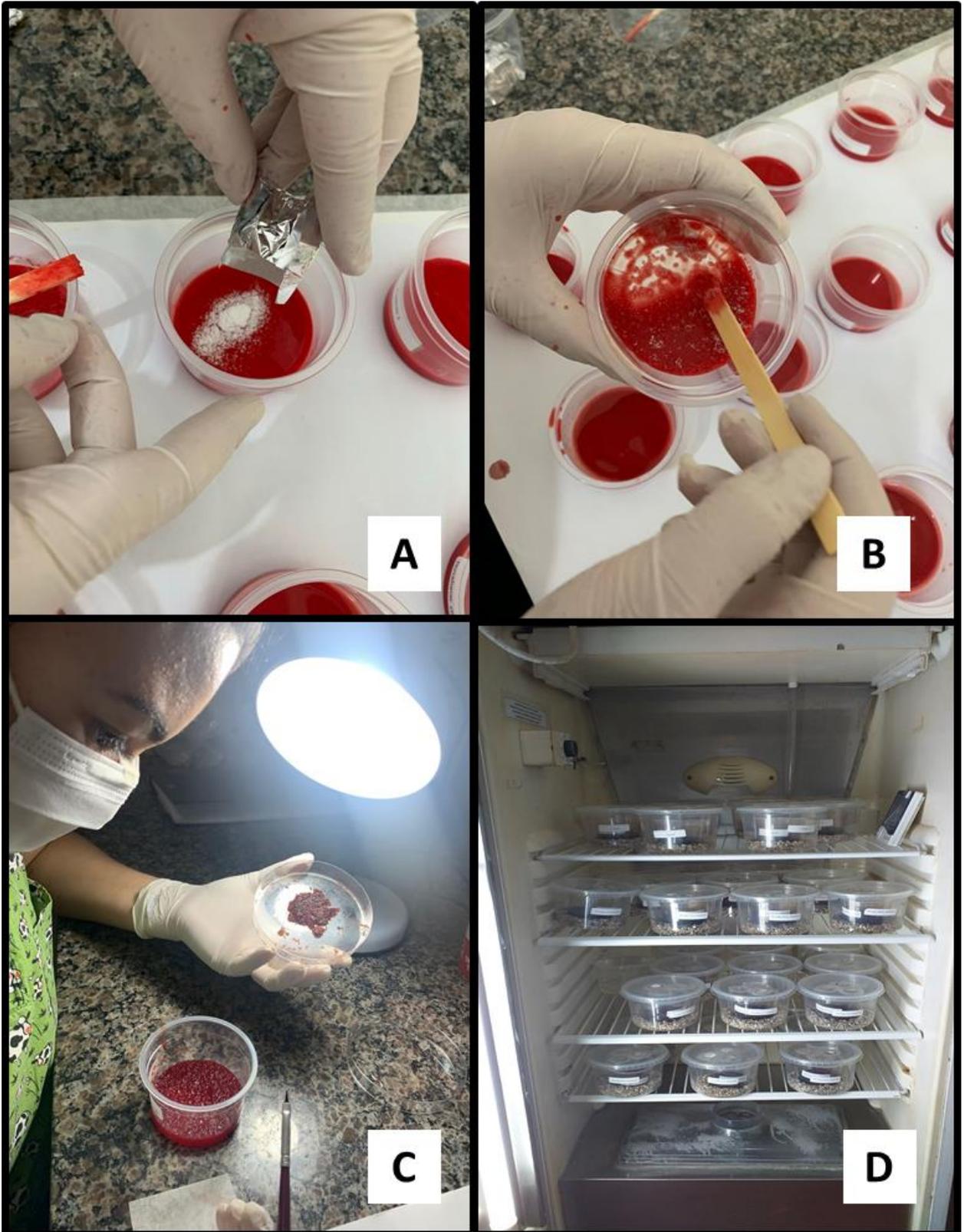
Foram adicionadas sobre o meio 10 espécimes L<sub>1</sub> de *C. hominivorax*, provenientes da colônia do laboratório, recuperadas sobre a dieta larval com auxílio de pincel n° 0, acondicionadas nos potes mantidos na B.O.D. a 35 °C e 80% de umidade. Para cada grupo experimental foi utilizado uma alíquota do meio larval (com as larvas recuperadas e em incubação do estudo) e um pincel, com o intuito de evitar contaminação por contato entre grupos de concentrações diferentes. A ordem de incubação foi iniciada pelo grupo controle, seguido do grupo placebo e das concentrações 0,0001ppm, 0,001ppm, 0,005ppm, 0,01ppm,

0,03ppm, 0,05ppm, 0,07ppm, 0,09ppm e 0,1ppm de Novaluron. Após a incubação o conjunto foi mantido na B.O.D. a 35 °C e 80% de umidade (MASTRANGELO, 2014).

Os espécimes foram avaliados após a incubação de 48 e 72 horas. Considerando o comportamento biontófago das larvas, durante a observação em 48 horas, foi adicionado 50% (10 g) do volume inicial de meio larval sem adição de Novaluron em todas as réplicas, para favorecer seu desenvolvimento. Após 72h de incubação, foi feita a transferência do recipiente de 145 mL sem tampa para dentro de um pote de polipropileno de 500 mL, contendo 10 g de vermiculita dispostos no fundo de cada pote. Na tampa do pote maior foram feitos três orifícios de aproximadamente dois cm de diâmetro devidamente telados com tecido *voile*, para favorecer o processo de pupação.

Os conjuntos de potes de 500 mL com os recipientes de larvas do estudo foram devidamente identificados e acondicionados na B.O.D. conforme mostra a Figura 2. Foram realizadas observações nos dias 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 14 após a incubação, para o acompanhamento do ciclo biológico. No 3º dia após a incubação, a temperatura e a umidade da B.O.D. foram alteradas para 32 °C e 60% de umidade, de acordo com as necessidades da fase do ciclo biológico em questão (FAO, 1990).

No 5º dia de incubação, os recipientes de 145 mL com meio larval foram retirados de dentro do pote de 500 ml. Nesse momento, foi realizada a catação das pupas com auxílio de pinça para procedimentos ultrasensíveis e pesagem de todas as repetições dos grupos experimentais no 7º dia após a incubação. A pesagem foi realizada em *pool* das amostras, ou seja, todas as pupas recuperadas em cada repetição foram pesadas juntas, com a utilização de uma balança de alta precisão.



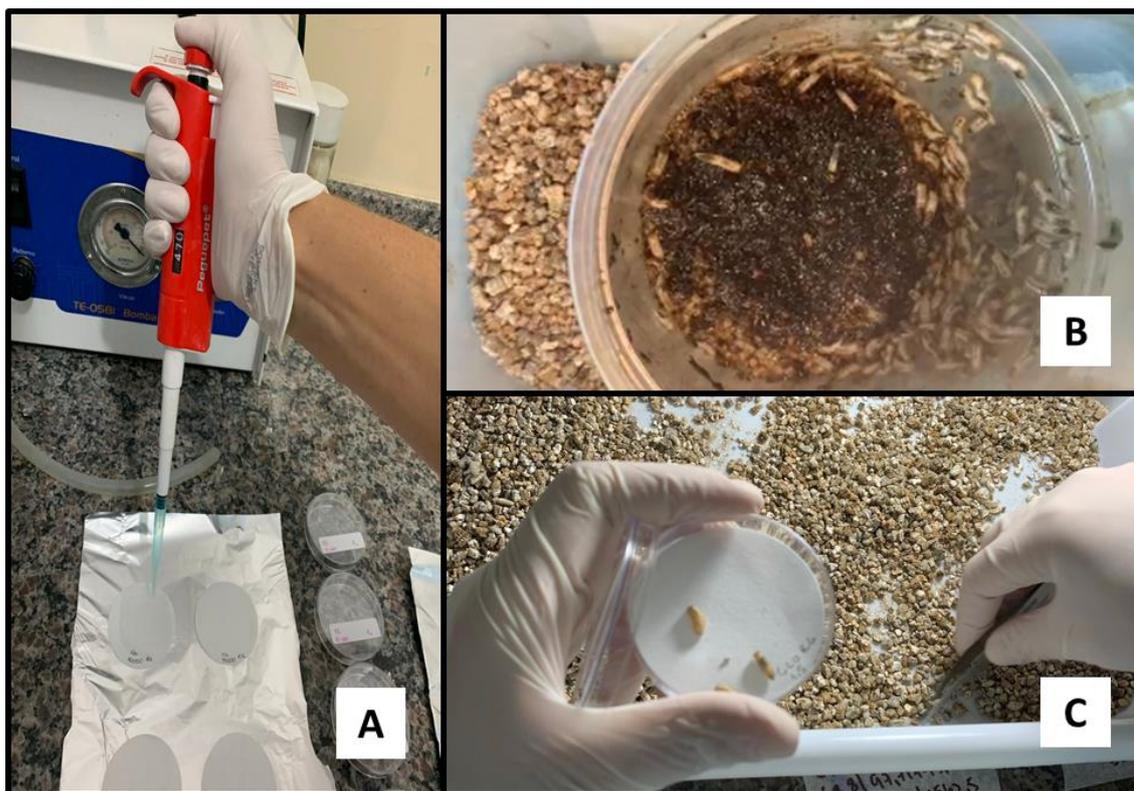
**Figura 2.** Desenho experimental com L1. A - Adição do Ecogel ao meio larval após a impregnação com novaluron; B - Homogeneização com espátula de madeira; C - Incubação de larvas de primeiro ínstar (L1) de *Cochliomyia hominivorax* no meio larval; D - Recipientes após serem passados para vermiculita e mantidos em câmara climatizada. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

### **3.3 Avaliação *in vitro* da Atividade do Novaluron sobre Larvas de 3º ínstar de *Cochliomyia hominivorax***

Para essa etapa, foram utilizadas placas de Petri (60mm x 15mm) e papel filtro impregnado, segundo a metodologia empregada por Chaaban (2008) adaptada. As faixas de concentração utilizadas para pré-pupas, foram maiores comparadas as das larvas de primeiro ínstar, sendo elas 5ppm, 10ppm, 25ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm, 500 ppm e 1000 ppm, totalizando 11 concentrações. Foi utilizado um grupo controle, contendo somente o disco de papel filtro, e um grupo placebo, contendo o disco de papel filtro acrescido do diluente utilizado na formulação das soluções (acetona PA).

Foram convencionadas dez réplicas para cada concentração (R1 a R10). Os discos de papel filtro e as placas de Petri (60mm x 15mm) foram devidamente identificadas. Após a identificação os discos de papel filtro foram dispostos sobre retângulos de papel laminado para impregnação. O volume de impregnação foi o mesmo para todas as réplicas e concentrações foram de 470µL. As larvas foram transferidas para o papel filtro depois de 30min após a impregnação, para evaporação da acetona e secagem do papel filtro.

As soluções foram produzidas no setor de Farmacometria do LQEPV/ UFRRJ, em duas concentrações diferentes (SE<sub>1</sub> e SE<sub>2</sub>), diluídas em acetona e homogeneizadas por um minuto no ultrassom. Para cada réplica utilizou-se 10 larvas, provenientes da colônia de *C. hominivorax* do LQEPV, que abandonaram o meio larval espontaneamente após 24 horas, aproximadamente, localizadas na vermiculita. A vermiculita, com as larvas, foi disposta em uma bandeja plástica para facilitar a visualização e apreensão das larvas com pinça entomológica para procedimentos ultrasensíveis (Figura 3).



**Figura 3.** Desenho experimental com L3. A - Impregnação do papel filtro sobre papel laminado; B - Larvas de terceiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* abandonando espontaneamente o substrato; C - Coleta das pré-pupas com pinça entomológica ultrasensível. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Após a incubação das larvas, as placas foram fechadas com auxílio de elásticos, organizadas em conjuntos de cinco placas cada, e acondicionadas na B.O.D. a 27°C e 60% de umidade (CHAABAN, 2008). Após 24 e 48 horas, foram realizadas observações após a incubação, para a verificação da viabilidade das larvas. No 5º dia, as pupas recuperadas foram pesadas por réplica e, no 6º dia, foram transferidas para gaiolas experimentais adaptadas. As gaiolas foram confeccionadas com caixas organizadoras, com capacidade de cinco litros (19cm x 19cm x 12,5cm). Onze dias após a incubação, foi quantificada a emergência de moscas adultas por réplica de cada concentração. Para a avaliação da eficácia do Novaluron na reprodução das moscas, foi ofertado meio de oviposição para estes espécimes, como descrito no item 3.1.

### 3.4 Análise dos Dados

Os dados obtidos nos ensaios com larvas de 1º ínstar e de 3º ínstar de *Cochliomyia hominivorax* foram submetidos a transformação logarítmica (log 10), seguida pela análise de variância de um critério (ANOVA) e teste t (“LSD - Low significance difference”). O nível de significância foi de 95% ( $p \leq 0,05$ ). O software, utilizado para as análises, foi o Bioestat 5.3 (AYRES et al. 2003). Os dados foram analisados em relação à atividade larvicida do Novaluron, à atividade na inibição do desenvolvimento de larva a pupa e da larva em adulto.

Para todos os parâmetros, foi calculada a eficácia (percentual de inibição do desenvolvimento) utilizando a fórmula de Abbott (1925) representada por:  $[(\text{número médio de indivíduos vivos do controle} - \text{número médio de indivíduos vivos do tratado}) / \text{número de indivíduos do controle}] \times 100$ . Os dados foram submetidos a análise de PROBIT para obtenção das concentrações letais para L1 e L3 de *C. hominivorax*, com auxílio do programa computacional RStudio © 2009-2019 Versão 1.2.1335 Inc., pacote “Ecotoxicology” (CARVALHO et al., 2017).

Além da análise quantitativa dos dados, foi realizada uma análise descritiva das alterações observadas. Os parâmetros utilizados foram motilidade (movimentação no meio larval para larvas de 1º instar), tamanho e aspectos morfológicos das pupas recuperadas.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Atividade do Novaluron sobre larvas de 1º Ínstar de *Cochliomyia hominivorax*

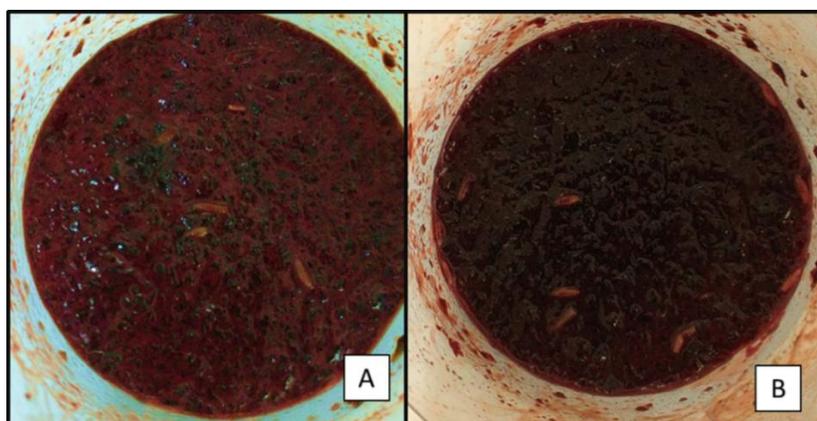
Em relação às observações relacionadas aos aspectos morfológicos e ao ciclo evolutivo de *C. hominivorax*, foram considerados três padrões macroscópicos, de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1.** Padrões macroscópicos para avaliação da atividade do Novaluron em L1 da espécie *Cochliomyia hominivorax*, obtidas da colônia do LQEPV.

Atividade das larvas
Larvas vivas com atividade normal
Larvas vivas com atividade reduzida
Larvas sem atividade (Mortas)

O tamanho e a atividade das larvas foram comparados com o controle e o padrão da colônia mantida no LQEPV, que geralmente tem um comportamento larval com movimentação no meio e nas paredes do recipiente e, quando estão paradas, apresentam um padrão de se agregar. Foram evitadas manipulações excessivas para evitar a morte dos espécimes, para não interferir nos resultados do estudo.

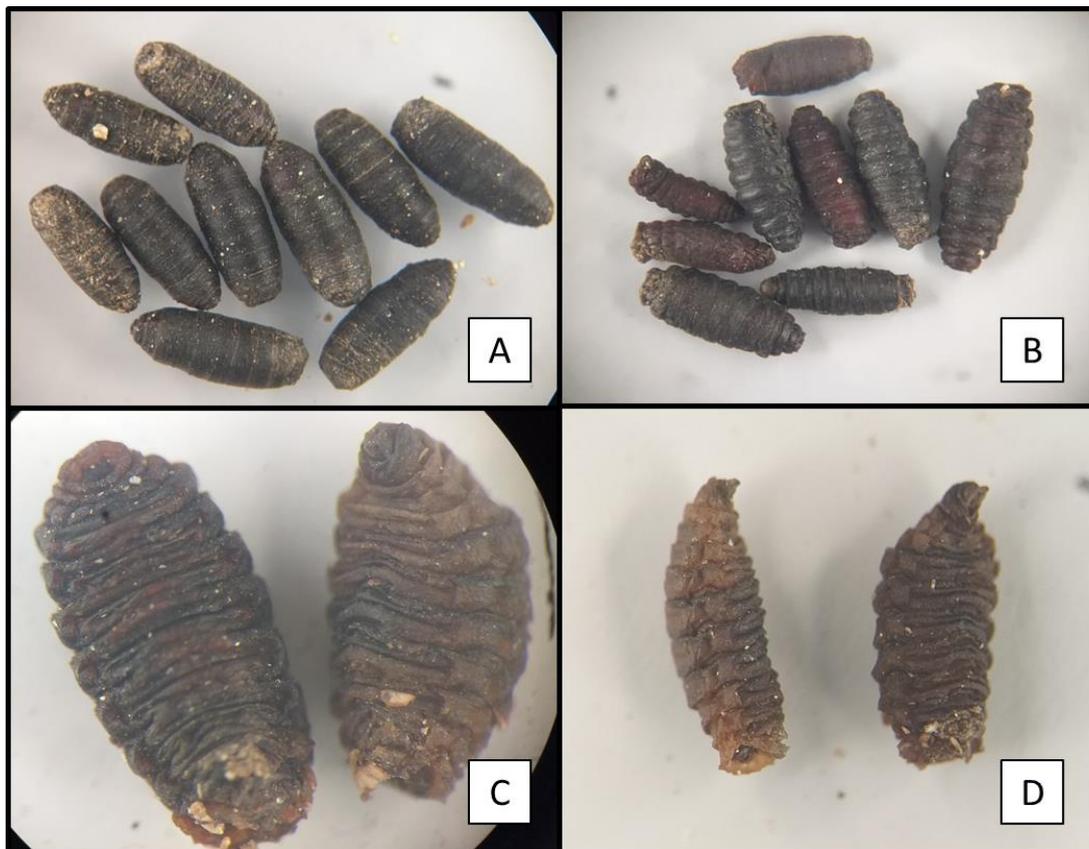
Na primeira observação, após 48 horas do início do experimento, quando foi adicionada 50% da dieta nas réplicas experimentais, as larvas apresentaram nas concentrações abaixo de 0,05 ppm (0,0001 ppm, 0,001ppm, 0,005ppm, 0,01ppm, 0,03ppm) tamanho compatível com larvas de segundo ínstar e atividade normais. A partir de 0,05ppm, foram observadas mudanças no padrão das larvas. Nas concentrações de 0,05ppm, 0,07ppm, 0,09 ppm e 0,1ppm, algumas larvas estavam sem atividade e apresentando tamanhos menores, não compatíveis com larvas de segundo ínstar. Na Figura 4, as concentrações de 0,07 ppm e 0,09 ppm apresentavam larvas mortas.



**Figura 4.** Larvas de *Cochliomyia hominivorax* em meio larval impregnado por Novaluron nas concentrações de 0,09 ppm (A) e 0,1ppm (B).

Após 72h de incubação as larvas foram transferidas para vermiculita (substrato que mimetiza o solo, facilitando o processo de pupação das larvas). Nesse momento foi realizada uma segunda análise qualitativa das larvas, que mantiveram os padrões descritos na primeira avaliação. As larvas presentes nas concentrações abaixo de 0,05 ppm apresentaram tamanho e atividades normais, já nas concentrações acima desses valores apresentaram larvas sem atividade, pequenas e imóveis, sugerindo a interferência do Novaluron na muda dos ínstares larvais e conseqüentemente morte.

No 5º dia após incubação, foi possível retirar o recipiente de 145 mL com meio larval de dentro do pote de 500 mL com 10 g de vermiculita dos grupos que não apresentavam mais larvas no meio larval. No sétimo dia, as pupas provenientes de cada concentração foram quantificadas por réplica, e pesadas em *pool* de amostras. As concentrações acima de 0,05 ppm ainda apresentaram larvas e não puderam ser pesadas, mas, nesse momento, foi possível realizar a manipulação das amostras. Foram encontradas nas concentrações de 0,05 ppm e 0,07 ppm alterações morfológicas nos espécimes. Após a pesagem, as pupas foram alocadas nas gaiolas experimentais para observação e quantificação da emergência dos adultos.



**Figura 5.** Pupas recuperadas após a exposição de larvas de primeiro instar de *Cochliomyia hominivorax* ao novaluron. (A) Controle; (B) Concentração de 0,05ppm; (C) Concentração de 0,07ppm e (D) Larvas mortas da concentração de 0,07ppm.

Na figura 5A, foi possível observar que as pupas do controle estavam com a morfologia e os tamanhos normais, apresentando formato de barril e de cor castanha escura, com aproximadamente 10,2 mm e 4,3 mm de comprimento e largura, respectivamente (TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940). Na concentração de 0,05 ppm, foi observada a má formação das pupas, como alterações de formato e tamanho (Figura 4B). Já na concentração de 0,07 ppm foi possível observar que as larvas entraram em processo de pupação, mas, não conseguiram completá-lo, gerando pupas malformadas (Figura 4C). Algumas larvas, mesmo iniciando o processo de pupação, morreram ainda na fase de larva, como demonstrado na Figura 4D, indicado pela persistência dos ganchos orais.

Os dados de pesagem não foram considerados, já que algumas concentrações ainda continham larvas. Nas observações preliminares da colônia mantida no laboratório, foi possível ver que as mesmas pupas, pesadas em dias diferentes, apresentaram variação no peso final. Sendo assim, a comparação dos pesos não seria um dado confiável. Segundo Kramer e Muthukrishnan, (1997), o metabolismo de quitina vem sendo considerado um excelente alvo para o controle seletivo de pragas. A inibição ou desregulação das enzimas chaves são importantes objetos para o desenvolvimento de inseticidas. As benzoilfenilurêias (ex. diflubenzuron, Novaluron, teflubenzuron, hexaflumuron, penfluron, triflumuron) são importantes inibidores da síntese de quitina.

A ausência desta cutícula, ou sua formação inadequada, faz com que o inseto desseque pela perda de umidade ou entre em um processo de inanição (COHEN, 2001). Segundo Merzendorf e Zimoch (2003), as quitinases dos insetos são cruciais no desenvolvimento pós-embrionário, especialmente durante a muda larval e a pupação. De acordo com avaliações visuais, as larvas estendiam-se no mesmo estágio larval ou morriam sem conseguir trocar de estágio, demonstrando a interferência do Novaluron no ciclo evolutivo.

O Novaluron demonstrou um efeito larvicida sobre larvas (L<sub>1</sub>) de *C. hominivorax* submetidas a dietas acrescidas de soluções acima de 0,05 ppm do IGR, como demonstrado na Tabela 2. Esse efeito também foi descrito por Cetim (2006) em estudo com *Musca domestica*, ambos submetidos a dietas impregnadas. Existem diferentes benzoilfenilurêias para controle dos insetos, disponíveis no mercado, todavia, o exato mecanismo de interferência destas drogas na via metabólica de síntese de quitina ainda não foi elucidado (COHEN, 2001).

**Tabela 2.** Quantidade de larvas de *Cochliomyia hominivorax* de primeiro ínstar que sobreviveram (ou foram capazes de pupar) após o tratamento com diferentes concentrações de Novaluron e a eficácia larvicida das formulações.

Réplicas	Concentrações (ppm)										
	Controle*	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,03	0,05	0,07	0,09	0,1	
1	10	10	10	10	10	10	2	0	0	2	
2	7	8	9	8	9	9	7	1	1	0	
3	7	9	9	7	10	9	7	3	0	2	
<b>Média aritmética</b>	<b>8,0<sup>ab</sup></b>	<b>9,0<sup>ab</sup></b>	<b>9,3<sup>ab</sup></b>	<b>8,3<sup>b</sup></b>	<b>9,7<sup>ab</sup></b>	<b>9,3<sup>a</sup></b>	<b>5,3<sup>b</sup></b>	<b>1,3<sup>c</sup></b>	<b>0,3<sup>c</sup></b>	<b>1,3<sup>c</sup></b>	
<b>Desvio padrão</b>	<b>1,7</b>	<b>1,0</b>	<b>0,6</b>	<b>1,5</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>2,9</b>	<b>1,5</b>	<b>0,6</b>	<b>1,2</b>	
<b>Eficácia média larvicida (%)</b>		<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>33,3</b>	<b>83,3</b>	<b>95,8</b>	<b>83,3</b>	

\*Solvente – Acetona PA; <sup>abc</sup>Médias nas colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

O percentual de inibição de pupação foi de 33,3% para a concentração 0,05 ppm, corroborando com as observações qualitativas descritas, nas avaliações de 48 e 72h, em que algumas larvas já apresentavam comportamento anormal e mortalidade de 83,3%, 95,8% e 83,3% nas concentrações de 0,07 ppm, 0,09 ppm e 0,1 ppm respectivamente, interferindo na pupação. Lohmeyer e Pound (2014) observaram o mesmo efeito do Novaluron sobre as moscas *Haematobia irritans*, *Musca domestica* e *Stomoxys calcitrans*, com uma mortalidade larval antes de atingir o ponto de pupação, como evidenciado pela redução nas pupas recuperadas em relação ao controle ou pupário deformado.

Para avaliação da emergência dos adultos e conseqüentemente o percentual de inibição de emergência (IE), as pupas foram retiradas das gaiolas no 14º dia, após a incubação das L1, e avaliadas segundo presença de opérculo e conteúdo pupal. Os adultos que iniciaram o processo de emergência, mas ficaram retidos no pupário foram considerados sem emergência. Os percentuais de IE mais expressivos começaram com 40% na concentração de 0,03ppm, seguido de 0,05ppm com 93,3% as demais concentrações acima de 0,05ppm, demonstraram uma IE de 100% (0,07, 0,09 e 0,1 ppm) (Tabela 3).

Lohmeyer e Pound (2012) também observaram a inibição da emergência das moscas *Haematobia irritans*, *Musca domestica* e *Stomoxys calcitrans* ao impregnar com 0,2g de Novaluron alguns substratos (esterco de vaca) para controle de larvas, os valores descritos na redução da emergência foram de 90, 93 e 98%, respectivamente.

**Tabela 3.** Quantidade de insetos adultos de *Cochliomyia hominivorax*, emergidos após a exposição a diferentes concentrações de Novaluron, avaliados a partir de larvas de primeiro ínstar e taxa de mortalidade.

Concentrações ppm( $\mu\text{g/g}$ )	Total de larvas incubadas	Número de adultos emergidos	Número de adultos não emergidos	Percentual de Inibição de Emergência(%)	Mortalidade corrigida (%)
Controle*	30	24	6	20	- - -
0,0001	30	22	8	26,7	8,3
0,001	30	24	6	20	0,0
0,005	30	21	9	30	12,5
0,01	30	27	3	10	-12,5
0,03	30	18	12	40	25,0
0,05	30	2	28	93,3	91,7
0,07	30	0	30	100	100,0
0,09	30	0	30	100	100,0
0,1	30	0	30	100	100,0

\*Solvente – Acetona PA

Foram encontrados para o controle (somente meio larval) e o placebo (meio larval acrescido de acetona 16% e 2 gotas de tween) valores relativamente baixos na recuperação de adultos, provenientes da incubação de larvas de primeiro ínstar. Tal fato pode ser atribuído ao estágio larval que apresenta uma menor tolerância a fatores externos como manipulação e troca de ambiente. Valores semelhantes de recuperação foram encontrados por Medeiros (2018), o percentual de emergência de adultos sobre larvas foi de 66,67% com média e desvio padrão de  $6,67 \pm 1,37$  e de adultos sobre pupas de 81,75% com média e desvio padrão de  $5,33 \pm 1,10$  no teste de padronização *in vitro* da metodologia de desafiar formas parasitárias da mosca *C. hominivorax*.

Tendo em vista a recuperação de adultos os dados de controle e de do placebo foram analisados, sendo demonstrado que não houve diferença significativa na recuperação de pupas e de adultos (Tabela 4).

**Tabela 4.** Quantidade de larvas de primeiro ínstar incubadas para avaliação da recuperação de adultos de *Cochliomyia hominivorax*.

Grupos	Nº de larvas incubadas	Nº de pupas recuperadas	Nº de adultos emergidos	Percentual de emergência de adultos (larvas)	Percentual de emergência de adultos (pupas)
<b>Controle</b>					
1	30	23	15	50,0	65,2
2	30	13	11	36,7	84,6
3	30	21	19	63,3	90,5
4	30	22	17	56,7	77,3
5	30	23	18	60,0	78,3
<b>Média</b>	<b>30</b>	<b>20,4</b>	<b>16</b>	<b>53,3</b>	<b>79,2</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0</b>	<b>4,2</b>	<b>3,2</b>	<b>10,5</b>	<b>9,4</b>
<b>Placebo</b>					
1	30	22	15	50,0	68,2
2	30	11	8	26,7	72,7
3	30	18	12	40,0	66,7
4	30	22	14	46,7	63,6
5	30	24	24	80,0	100,0
<b>Média</b>	<b>30</b>	<b>19,4</b>	<b>14,6</b>	<b>48,7</b>	<b>74,2</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0</b>	<b>5,2</b>	<b>5,9</b>	<b>19,7</b>	<b>14,8</b>
<b>Valor de p</b>		<b>0,7261</b>	<b>0,5181</b>		

Coluna com valor de  $p > 0,05$  as médias não diferem significativamente entre si.

#### 4.2 Atividade do Novaluron sobre larvas de 3º Ínstar de *Cochliomyia hominivorax*

As larvas de terceiro ínstar - L<sub>3</sub> (pré-pupas) foram submetidas a teste com papel filtro impregnado. Supõe-se que, ao abandonarem a ferida, podem ser consideradas mais resistentes do que as de primeiro ínstar, já que se apresentam em uma fase evolutiva que cessam a alimentação no hospedeiro e caem ao solo para pupação. Seguindo a mesma linha de avaliação de recuperação de adultos, os grupos (controle e o placebo) foram analisados e não apresentaram diferença significativa na recuperação de pupas e adultos a partir de larvas de 3º ínstar (Tabela 5). A acetona não influenciou na resposta do teste.

As faixas de concentração mais elevadas foram estipuladas devido à tolerância atribuída a essa fase e ao tempo reduzido de permanência das larvas com o ativo. As avaliações para determinação da viabilidade das L<sub>3</sub> com 24 e 48h após a incubação, consistiu na quantificação de vivos e mortos. Os conjuntos de placas foram retirados da B.O.D. (Figura 6A) após a remoção do elástico as placas foram abertas uma a uma e examinadas com auxílio de luminária. As larvas foram avaliadas relação ao aspecto morfológico e motilidade. Na primeira avaliação, com 24h, o percentual de mortalidade foi praticamente nulo em todas as concentrações, controle e placebo, e nenhuma pupa pode ser observada (Tabela 6).

**Tabela 5.** Quantidade de larvas de terceiro ínstar incubadas para avaliação da recuperação de adultos de *Cochliomyia hominivorax*.

Grupos	Nº de larvas incubadas	Nº de pupas recuperadas	Nº de adultos emergidos	Percentual de emergência de adultos (larvas)	Percentual de emergência de adultos (pupas)
<b>Controle</b>					
1	10	10	9	90,0	90,0
2	10	9	9	90,0	100,0
3	10	10	8	80,0	80,0
4	10	10	10	100,0	100,0
5	10	9	7	70,0	77,8
6	10	7	6	60,0	85,7
7	10	9	6	60,0	66,7
8	10	10	6	60,0	60,0
9	10	9	9	90,0	100,0
10	10	7	7	70,0	100,0
11	10	9	8	80,0	88,9
12	10	10	9	90,0	90,0
13	10	10	8	80,0	80,0
14	10	10	10	100,0	100,0
15	10	10	8	80,0	80,0
16	10	10	8	80,0	80,0
17	10	10	8	80,0	80,0
18	10	10	9	90,0	90,0
19	10	9	8	80,0	88,9
20	10	9	8	80,0	88,9
<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>8,8</b>	<b>8,1</b>	<b>80,5</b>	<b>89,6</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0</b>	<b>0,9</b>	<b>1,2</b>	<b>11,9</b>	<b>11,1</b>
<b>Placebo</b>					
1	10	9	7	70,0	77,8
2	10	8	5	50,0	62,5
3	10	10	9	90,0	90,0
4	10	8	7	70,0	87,5
5	10	9	9	90,0	100,0
6	10	9	6	60,0	66,7
7	10	9	6	60,0	66,7
8	10	10	6	60,0	60,0
9	10	10	6	60,0	60,0
10	10	10	9	90,0	90,0
11	10	10	10	100,0	100,0
12	10	10	8	80,0	80,0
13	10	10	8	80,0	80,0
14	10	10	9	90,0	90,0
15	10	10	9	90,0	90,0
16	10	10	7	70,0	70,0
17	10	10	6	60,0	60,0
18	10	10	8	80,0	80,0
19	10	10	8	80,0	80,0
20	10	10	9	90,0	90,0
<b>Média</b>	<b>10</b>	<b>9,6</b>	<b>7,6</b>	<b>76</b>	<b>79,1</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0</b>	<b>0,7</b>	<b>1,4</b>	<b>14,3</b>	<b>13,2</b>
<b>Valor de p</b>		<b>0,331</b>	<b>0,256</b>		

Coluna com valor de  $p > 0,05$  as médias não diferem significativamente entre si.

**Tabela 6.** Mortalidade de larvas de terceiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* submetidas a diferentes concentrações de Novaluron após 24 horas de exposição.

Réplicas	Larva de <i>Cochliomyia hominivorax</i> / Concentrações (ppm)											
	Controle*	5	10	25	50	75	100	150	200	250	500	1000
1	9	10	9	10	10	10	10	10	10	9	10	10
2	10	10	9	10	10	9	10	10	10	10	10	10
3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
5	10	10	10	10	9	10	10	10	10	9	10	10
6	10	10	10	10	9	10	10	10	9	10	10	9
7	10	10	10	10	9	10	10	9	9	10	10	10
8	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	10	9
9	10	10	10	10	9	10	10	10	10	10	10	10
10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Média aritmética</b>	<b>9,9<sup>a</sup></b>	<b>10<sup>a</sup></b>	<b>9,8<sup>a</sup></b>	<b>10<sup>a</sup></b>	<b>9,6<sup>a</sup></b>	<b>9,9<sup>a</sup></b>	<b>10<sup>a</sup></b>	<b>9,8<sup>a</sup></b>	<b>9,8<sup>a</sup></b>	<b>9,8<sup>a</sup></b>	<b>10<sup>a</sup></b>	<b>9,8<sup>a</sup></b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,4</b>
<b>Percentual médio de atividade larvicida (%)</b>	<b>#</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,0</b>	<b>3,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>1,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,0</b>

\*Solvente – Acetona PA; <sup>ab</sup>Médias com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05). Valor de p=0,2115.



**Figura 6.** A - Larvas de terceiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* pós incubação, armazenadas em câmara climatizada. B - Gaiolas experimentais, sofrendo estimulação para postura. C - Meio de oviposição oferecido para moscas adultas com presença de massa de ovos. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

Após 48h de exposição (segunda avaliação), a mortalidade foi semelhante aos valores observados na rotina da colônia (cerca de 10%). Nas concentrações entre 5 e 100 ppm, incluindo controle e placebo, ainda havia presença de larvas ativas e ausência de pupas. Nas concentrações acima de 100 ppm, a maioria das larvas já tinha iniciado o processo de pupação. No 5º dia as pupas foram pesadas, por réplica em todas as concentrações e os valores estão expressos na Tabela 7.

Foi observada a redução do peso das pupas em relação ao grupo controle de 38,9% e 37,5%, para as concentrações de 250 ppm e 1000 ppm, respectivamente. A partir de 100 ppm, as pupas estavam visivelmente menores e algumas apresentavam má formação, como descrito no tópico anterior (Tabela 8). No 6º dia, as pupas foram transferidas para as gaiolas experimentais e foi possível observar as primeiras emergências de adultos. Para avaliação do percentual de inibição de emergência, as pupas foram retiradas das gaiolas e quantificadas de acordo com presença de opérculo. Moscas que iniciaram a emergência e ficaram retidas no pupário foram consideradas sem emergência (Figura 8).

Com o intuito de verificar a interferência do Novaluron na reprodução das moscas, após a quantificação da emergência de adultas, foi empregado o protocolo utilizado na colônia para maturação ovariana das fêmeas, seguido de estimulação para postura (Figura 6B). Todas as fêmeas emergidas de indivíduos expostos às concentrações menores que 100 ppm realizaram postura (Figura 6C). As posturas foram incubadas em meio larval e o desenvolvimento da

progênie foi completo chegando às moscas adultas. Com base nesses dados ainda não é possível afirmar que o Novaluron tem efeito na reprodução, sendo necessários mais estudos na área.



**Figura 7.** Adultos de *Cochliomyia hominivorax* retidas no pupário. A - Visão lateral. B - Visão frontal. Fonte: Arquivo pessoal, 2021.

O Novaluron é um inibidor da síntese de quitina que atua por contato e ingestão. Tem como alvo os estágios imaturos do inseto que sintetizam ativamente a quitina. Diversos estudos mostraram que o Novaluron é um importante larvicida contra formas imaturas de flebotomíneos e várias espécies de mosquitos (MULLA et al., 2003, ARREDONDO-JIMENEZ; VALDEZ-DELGADO, 2006, MASCARI et al., 2007, MASCARI; FOLHA, 2010). Essa atividade também pode ser observada nas larvas de 1º ínstar, mas não para as larvas de 3º ínstar, quando utilizado nas concentrações empregadas no presente estudo.

O Novaluron teve uma eficácia de 98,6% na concentração de 1000 ppm (Tabela 9). Segundo Lohmeyer e Pound (2014), fezes de bezerros tratados com duas faixas de concentração (0,4mg/kg e 0,6mg/kg de dieta/dia a 0,67% de Novaluron) apresentaram uma inibição da emergência de 100% para *Stomoxys calcitrans*. Nesse caso, a presença de pupários deformados indicou que o Novaluron teve um efeito regulador de crescimento de insetos nas larvas de mosca-dos-estábulo em desenvolvimento. É possível observar que as duas concentrações, 25 e 75 ppm diferem bastante do resultado esperado e uma possível explicação pode ser o preparo das soluções, como a etapa de solubilização, interferindo na resposta do teste.

O Novaluron, utilizado inicialmente como defensivo agrícola, pertence a classe de inseticida fisiológico do grupo químico Benzoilfenilureia [Concentrado Emulsionável (EC)]. Sua apresentação comercial é em solução, já o ativo utilizado nos testes apresenta-se em pó e sua diluição é feita em acetona, devido à natureza da molécula ou a apresentação haja uma interferência na solubilização.

**Tabela 7.** Taxa de inibição de desenvolvimento a partir de larvas de terceiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* submetidas a diferentes concentrações de Novaluron, até a fase de pupa.

Réplicas	Pupas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> / Concentrações (ppm)											
	Controle*	5	10	25	50	75	100	150	200	250	500	1000
1	9	10	9	10	10	10	10	10	10	9	10	10
2	8	10	9	10	9	9	10	10	10	10	10	10
3	10	10	10	10	7	10	10	10	10	10	10	10
4	8	9	8	9	9	10	10	9	10	10	10	10
5	9	10	8	10	7	10	10	6	8	9	10	10
6	9	10	9	10	9	10	10	10	9	10	10	9
7	9	10	10	10	8	10	10	9	8	10	10	10
8	10	9	10	10	10	10	10	9	9	10	10	8
9	10	10	10	10	8	10	10	10	10	10	10	10
10	10	10	8	10	10	10	10	8	10	9	10	10
<b>Média aritmética</b>	<b>9,2<sup>a</sup></b>	<b>9,8<sup>a</sup></b>	<b>9,1<sup>a</sup></b>	<b>9,9<sup>b</sup></b>	<b>8,7<sup>a</sup></b>	<b>9,9<sup>b</sup></b>	<b>10<sup>b</sup></b>	<b>9,1<sup>a</sup></b>	<b>9,4<sup>a</sup></b>	<b>9,7<sup>a</sup></b>	<b>10<sup>b</sup></b>	<b>9,7<sup>a</sup></b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,8</b>	<b>0,4</b>	<b>0,8</b>	<b>0,3</b>	<b>1,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,0</b>	<b>1,2</b>	<b>0,8</b>	<b>0,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,6</b>
<b>Percentual médio de inibição de desenvolvimento (%)</b>	<b>#</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,0</b>	<b>5,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>1,1</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>

\*Solvente - Acetona PA. <sup>ab</sup>Médias nas colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

**Tabela 8.** Percentual de redução de peso das pupas recuperadas a partir de larvas de terceiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* submetidas a diferentes concentrações de Novaluron.

Réplicas	Peso das pupas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> (g) / Concentrações (ppm)											
	Controle*	5	10	25	50	75	100	150	200	250	500	1000
1	0,359	0,383	0,364	0,358	0,353	0,25	0,332	0,292	0,275	0,286	0,300	0,251
2	0,34	0,408	0,366	0,380	0,301	0,247	0,220	0,305	0,282	0,283	0,294	0,270
3	0,521	0,391	0,385	0,344	0,236	0,279	0,253	0,331	0,327	0,221	0,289	0,234
4	0,360	0,338	0,380	0,340	0,330	0,269	0,331	0,282	0,317	0,249	0,294	0,286
5	0,390	0,374	0,295	0,367	0,277	0,301	0,283	0,132	0,287	0,202	0,258	0,268
6	0,370	0,372	0,387	0,386	0,326	0,284	0,326	0,35	0,224	0,235	0,293	0,167
7	0,329	0,360	0,395	0,368	0,337	0,329	0,271	0,275	0,213	0,276	0,254	0,247
8	0,417	0,331	0,418	0,353	0,360	0,243	0,253	0,260	0,272	0,207	0,303	0,185
9	0,423	0,361	0,407	0,405	0,315	0,228	0,247	0,320	0,289	0,258	0,322	0,275
10	0,416	0,370	0,378	0,319	0,358	0,326	0,246	0,284	0,300	0,183	0,235	0,272
<b>Média aritmética</b>	<b>0,393<sup>a</sup></b>	<b>0,369<sup>a</sup></b>	<b>0,378<sup>a</sup></b>	<b>0,362<sup>a</sup></b>	<b>0,319<sup>a</sup></b>	<b>0,276<sup>b</sup></b>	<b>0,276<sup>b</sup></b>	<b>0,283<sup>b</sup></b>	<b>0,279<sup>b</sup></b>	<b>0,240<sup>b</sup></b>	<b>0,284<sup>b</sup></b>	<b>0,246<sup>b</sup></b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,056</b>	<b>0,023</b>	<b>0,033</b>	<b>0,025</b>	<b>0,039</b>	<b>0,035</b>	<b>0,040</b>	<b>0,060</b>	<b>0,036</b>	<b>0,036</b>	<b>0,027</b>	<b>0,040</b>
<b>Percentual de redução sobre o peso das pupas (%)</b>	<b>#</b>	<b>6,2</b>	<b>3,9</b>	<b>7,9</b>	<b>18,8</b>	<b>29,9</b>	<b>29,7</b>	<b>28,0</b>	<b>29,1</b>	<b>38,9</b>	<b>27,7</b>	<b>37,5</b>

\*Solvente - Acetona PA. <sup>ab</sup>Médias nas colunas com letras iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

**Tabela 9.** Inibição de desenvolvimento a partir de larvas de terceiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* submetidas a diferentes concentrações de Novaluron, até a fase adulta.

Réplicas	Adultos emergidos / Concentrações (ppm)											
	Controle*	5	10	25	50	75	100	150	200	250	500	1000
1	7	10	1	7	0	2	0	0	0	0	1	0
2	5	9	5	6	0	0	0	0	0	0	0	0
3	9	8	6	8	0	1	0	0	1	0	0	0
4	7	7	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9	7	3	5	1	1	0	0	0	0	0	1
6	6	8	5	7	0	2	0	1	1	1	0	0
7	6	5	4	7	0	2	1	0	0	1	0	0
8	6	7	4	7	0	1	1	0	0	0	0	0
9	6	6	5	8	1	1	1	0	0	2	1	0
10	9	4	5	2	2	2	0	0	0	1	3	0
<b>Média aritmética</b>	<b>7,0<sup>a</sup></b>	<b>7,1<sup>a</sup></b>	<b>4,0<sup>b</sup></b>	<b>6,4<sup>a</sup></b>	<b>0,4<sup>b</sup></b>	<b>1,2<sup>c</sup></b>	<b>0,3<sup>b</sup></b>	<b>0,1<sup>b</sup></b>	<b>0,2<sup>b</sup></b>	<b>0,5<sup>b</sup></b>	<b>0,5<sup>b</sup></b>	<b>0,1<sup>b</sup></b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>1,5</b>	<b>1,8</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>0,7</b>	<b>0,8</b>	<b>0,5</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,7</b>	<b>1,0</b>	<b>0,3</b>
<b>Percentual médio de inibição de desenvolvimento (%)</b>		<b>0,0</b>	<b>42,9</b>	<b>8,6</b>	<b>94,3</b>	<b>82,9</b>	<b>95,7</b>	<b>98,6</b>	<b>97,1</b>	<b>92,9</b>	<b>92,9</b>	<b>98,6</b>

\*Solvente – Acetona PA; <sup>ab</sup>Médias aritméticas com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si (p>0,05).

### 4.3 Concentrações Letais de Novaluron para *Cochliomyia hominivorax*

Para larvas de primeiro ínstar de *C. hominivorax*, o valor da CL<sub>50</sub> obtida foi de 0,010 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) com valor mínimo de 0,005 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ) e máximo de 0,02 ppm ( $\mu\text{g/g}$ ), com intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de regressão obtido foi de 0,957, sugerindo uma linearidade dos resultados (mortalidade) (Tabela 10). Cetim (2006) apresentou em seu trabalho, assim como no presente estudo, que o ensaio com alimentação das larvas demonstrou uma atividade larvicida mais efetiva, obtendo uma CL<sub>50</sub> de 1,66mg a.i./kg para larvas de *Musca domestica* após 72h da incubação no meio acrescido de Novaluron.

Para larvas de terceiro ínstar de *C. hominivorax*, o valor da CL<sub>50</sub> obtido foi de 0,42  $\mu\text{g/cm}^2$ , com valor mínimo de 0,32  $\mu\text{g/cm}^2$  e máximo de 0,54  $\mu\text{g/cm}^2$  e intervalo de confiança de 95%. O coeficiente de regressão obtido foi de 0,984, sugerindo uma linearidade dos resultados (mortalidade). Os dados obtidos no presente estudo claramente indicam que Novaluron tem ação larvicida em *C. hominivorax*. Além disso, verificou-se que os métodos de aplicação de alimentação e contato sobre estádios larvais diferentes, obtiveram um resultado dose-resposta, no qual a maior atividade larvicida encontrou-se nas maiores concentrações utilizadas, e que ambas as estratégias poderiam ser empregadas no controle da infestação por larvas de *C. hominivorax*.

**Tabela 10.** Análise de Probit do Novaluron frente as larvas de *Cochliomyia hominivorax*.

Parâmetros	Larva de 1º ínstar	Larva de 3º ínstar
Faixa	0,005-0,07 ppm	0,1-0,2 $\mu\text{g/cm}^2$ (5-100 ppm)
CL <sub>50</sub> (IC 95%)	0,01ppm (0,005-0,02)	0,42 $\mu\text{g/cm}^2$ (0,32-0,54)
Slope	1,77	1,45
Coeficiente de Variação (Intercepto)	8,28	5,54
R <sup>2</sup>	0,957	0,984
Qui-quadrado	22,328	67,611
p	1,000	1,000

## 5 CONCLUSÕES

O Novaluron demonstrou atividade na inibição do desenvolvimento de *Cochliomyia hominivorax* e ação larvívica sobre larvas de primeiro ínstar em baixas concentrações.

O Novaluron demonstrou ter atividade pupívica pós-exposição de larvas de terceiro ínstar de *C. hominivorax*. Foi possível observar alterações morfológicas em pupas recuperadas a partir de larvas de primeiro ínstar expostas ao Novaluron.

As concentrações CL<sub>50</sub> são menores para larvas de primeiro ínstar do que para as larvas de terceiro ínstar de *C. hominivorax*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os riscos e prejuízos acarretados pelo parasitismo causado pelas formas larvais da mosca *C. hominivorax* colocam a comunidade científica e organizações mundiais na busca de novos métodos para prevenir, controlar, ou até mesmo erradicar esse parasito. Atualmente, os controles efetivos contra miíases são curativos, a base de tratamentos tópicos contendo organofosforados e os preventivos que normalmente utilizam avermectinas injetáveis, que apresentam toxicidade para o meio ambiente e para os animais a serem tratados.

Sendo assim, o Novaluron, torna-se uma alternativa em busca de ativos mais seguros, eficazes e práticos, destacando-se entre os outros por permitiria investir em um produto contendo esta molécula, uma vez que neste primeiro estudo contra formas imaturas de *C. hominivorax*, mostrou-se eficaz agindo como larvicida e pupicida frente a larvas de primeiro ínstar e pupicida para as de terceiro ínstar interferindo na emergência dos adultos.

É importante que outros estudos sejam conduzidos com o Novaluron associado a outro IGR, ou até mesmo a um inseticida adulticida, na tentativa de eliminar as larvas logo no seu primeiro estágio larval, para minimizar os prejuízos causados pelo seu parasitismo. Dessa forma, seria interessante também administrar Novaluron de forma tópica para observarmos a eficácia do tratamento em todas as fases do parasito na tentativa de eliminar a larva, de preferência no primeiro estágio, estabelecendo uma curva plasmática do ativo no organismo do hospedeiro, tornando o controle do parasitismo mais efetivo, seguro e sustentável.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265-266; 1925.
- AUBERTIN, D.; BUXTON, P. A. *Cochliomyia* and myiasis in tropical America. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 245-254, 1934.
- AYRES, M.; AYRES JR, M; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Sociedade Civil Mamirauá/Imprensa Oficial do Estado do Pará, Belém, 5ª Edição, 324 p., 2007.
- BARILACHI, A.G. Le miasi. **Italian Journal of Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 64-78; 2005.
- BORJA, G. E. M. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas? **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 32, p. 131–138, 2003.
- CARVALHO, J.R.; PRATISSOLI, D.; VIANNA, U.R.; HOLTZ, A.M. **Análise de probit aplicada a bioensaios com insetos**. Colatina: IFES, 102p. 2017.
- CARVALHO, José Passos de . **Introdução à entomologia agrícola**. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 361p. 1986.
- CARVALHO, M. H. D.; VON ZUBEN, C. J. Demographic aspects of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) adults maintained under experimental conditions: reproductive rate estimates. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 457-461, 2006.
- CARVALHO, R. A. et al. Molecular characterization of esterase E3 gene associated with organophosphorus insecticide resistance in the New World screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, p. 86-91, 2009.
- CETIN, Huseyin; ERLER, Fedai; YANIKOGLU, Atila. Larvicidal activity of Novaluron, a chitin synthesis inhibitor, against the housefly, *Musca domestica*. **Journal of Insect Science**, v. 6, n. 1, p. 50, 2006.
- COHEN, Ephraim. Chitin synthesis and inhibition: a revisit. **Pest management science**, v. 57, n. 10, p. 946-950, 2001.
- CONCHA, Carolina et al. A transgenic male-only strain of the New World screwworm for an improved control program using the sterile insect technique. **BMC biology**, v. 14, n. 1, p. 1-13, 2016.

- CORONADO, A.; KOWALSKI, A. Current status of the New World screwworm *Cochliomyia hominivorax* in Venezuela. **Medical and veterinary entomology**, v. 23, p. 106-110, 2009.
- 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, p. 548-562, 2019.
- CRAMER-RIBEIRO, Bianca Chiganer et al. Inquérito sobre os casos de miíase por *Cochliomyia hominivorax* em cães da zona sul do município do Rio de Janeiro no ano 2000. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, p. 171-175, 2002.
- CRYSTAL, Maxwell M. Longevity of screw-worm flies, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel)(Diptera: Calliphoridae): effect of sex and grouping. **Journal of Medical Entomology**, v. 4, n. 4, p. 479-482, 1967.
- CUSHING, Emory C.; PATTON, W. S. Studies on the higher Diptera of medical and veterinary importance: *Cochliomyia americana* sp. nov., the screw-worm fly of the New World. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 539-551, 1933.
- D'ALMEIDA, J.M. Substratos para criação de dípteros caliptrados em área rural do Estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.9, n. 1-2, p. 13-22; 1986
- DALBEM, C.A.G. Miíase vulvar: relato de caso. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 4, p. 291-295; 2003.
- D'ALMEIDA, J. M.; ALMEIDA, J.R de. Nichos tróficos em dípteros caliptrados, no Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, p. 563-570, 1998
- DEAR, J.C. A revision of the New World *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3,n. 3, p. 109-169; 1981.
- DHADIALLA, T. S.; CARLSON, G. R.; LE, D. P. New Insecticides With Ecdysteroidal and Juvenile Hormone Activity. **Annual Review of Entomology**, v. 43, n. 1, p. 545–569, 1998.
- DIAZ, I. A.C. Ectoparasitosis humanas: estado atual en el Uruguay. **Boletim Chileno de Parasitologia**, v. 54, n. 3-4, p. 61-64; 1999.

DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Taylor & Francis, p 1216, 2021.

FAO. Manual for the Control of the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax*, Coquerel. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Roma, p. 1-105, 1990.

FAO: Manual for the Control of the Screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel), vol. 2. Guide for the identification of flies in the genus *Cochliomyia* (Diptera: Calliphoridae). **Food and Agriculture Organization of United Nations** 18pp. Rome, Italy, FAO. (1993)

FONTOURA, Nathalia Giglio. Efeito do Novaluron-um inibidor da síntese de quitina-sobre *Aedes aegypti* em laboratório e simulado de campo. 2008.

FRESIA, Pablo et al. Genetic structure and demographic history of new world screwworm across its current geographic range. **Journal of medical entomology**, v. 48, n. 2, p. 280-290, 2011.

GOMES, A. et al. Flutuação populacional da mosca *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae) capturada em armadilhas orientadas pelo vento (WOT), no município de Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 41-45, 1998.

GRAF, J. F. The role of insect growth regulators in arthropod control. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 471–474, 1993.

GRISI, L. et al. Reavaliação do potencial impacto econômico de parasitos de bovinos no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 150-156, 2014.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8–10, 2002.

GUGLIELMONE, A. Alternativas a los piretroides sintéticos para el control de ectoparásitos de los bovinos en la Argentina. **Actas 14º Jornadas de Farmacología y Toxicología Veterinaria**, Tandial, p. 12, 2000.

GUIMARAES, J. H. Taxonomy of Brazilian flies of the genus *Lespesia* Robineau-Desvoidy (Diptera, Tachinidae). **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 35, n. 2, p. 11-30, 1983.

HALL, M.; WALL, R. Myiasis of humans and domestic animals. **Advances in Parasitology**, v. 35, p. 257-334, 1995.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística –**Pesquisa pecuária municipal** [online]. Rio de Janeiro: IBGE; 2018 . Available from: <https://www.ibge.gov.br>

JUNQUERA, Pablo et al. Benzoylphenyl ureas as veterinary antiparasitics. An overview and outlook with emphasis on efficacy, usage and resistance. **Parasite**, v. 26, 2019.

LEITE, A. C. R., Biologia e controle de *Cochliomyia hominivorax* (Díptera: Calliphoridae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 13.; SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE RICKETISIOSES, 1., Ouro Preto, MG. **Anais...** Ouro Preto: CBPV, 2004.

LIMA, M.A.M. **Aspectos da biologia de *L. cuprina* e estudo comparativo das miíases causadas por *Lucilia cuprina* e *Cochliomyia hominivorax* em ovinos artificialmente infestados**. Dissertação de Mestrado, UFRRJ. 119 p., 1999.

LOHMEYER, K. H. et al. Efficacy of Novaluron as a feed-through for control of immature horn flies, house flies, and stable flies (Diptera: Muscidae) developing in cow manure. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 4, p. 873-877, 2014.

LOHMEYER, K. H.; POUND, J. M. Laboratory evaluation of Novaluron as a development site treatment for controlling larval horn flies, house flies, and stable flies (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 647-651, 2012.

MACHADO, M. L. da S; RODRIGUES, E. M. P. Emprego do nitenpyram como larvicida em miíases caninas por *Cochliomyia hominivorax*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 1, p. 59-62, 2002.

MACHADO, Paulo de Almeida. O homem e os insetos, passado, presente, futuro. **Revista de Saúde Pública**, v. 21, p. 474-479, 1987.

MADEIRA, N. G.; AMARANTE, A. F. T.; PADOVANI, C. R. Effect of management practices on screw-worm among sheep in São Paulo State, Brazil. **Tropical animal health and production**, v. 30, n. 3, p. 149-157, 1998.

MARCONDES, C.B. **Entomologia Médica e Veterinária**. São Paulo: Atheneu, p.125-147. 2001

MARTINEZ, C.A.R.; ROMANI, G.; PRIOLLI, D.G.; CAMPOS, A.A.; CARNEIRO, V.P.P.; MASTRANGELO, T.; BEZERRA, F.; FERNANDES, T. Determinação da temperatura base para o desenvolvimento embrionário da mosca-da-bicheira. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 44, n. 2, p. 346–351, 2014.

MASTRANGELO, T. A. **Metodologia de produção de moscas estéreis de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae) no Brasil**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MULLA, Mir S. et al. Laboratory and field evaluation of Novaluron, a new acylurea insect growth regulator, against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 28, p. 241-254, 2003.

NEVES, D. P.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. Parasitologia humana. ed. **Editora Atheneu**, 2011.

NEVES, David Pereira. Parasitologia humana. In: **Parasitologia humana**. p. 428-428. 2004.

OLIVEIRA, C. M. B. **Biologia, flutuação populacional e patologia da *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae)**. 1980. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 1980.

OLIVEIRA, NA da S. A percepção dos resíduos sólidos (lixo) de origem domiciliar, no Bairro Cajuru-Curitiba-PR: um olhar reflexivo a partir da educação ambiental. **Curitiba/PR**, 2006.

RAHN, James J.; BARGER, Gerald L. Weather conditions and screwworm activity. **Agricultural Meteorology**, v. 11, p. 197-211, 1973.

SILVA, L.V.; DE LA RUE, M.L. Lesões da mosca-dos-chifres na pele de bovinos e impacto na indústria do couro. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 1039-1043; 2002.

SOUZA G.S. **Avaliação da atividade do Novaluron, sobre *Boophilus microplus* (Canestrini) em bovinos de corte naturalmente infestados**. Dissertação: Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2009.

STUART, M. A. et al. Determination of a relationship between soil moisture and screwworm fly (Diptera: Calliphoridae) activity. **Australian Journal of Entomology**, v. 34, n. 1, p. 1-5, 1995.

TOWNSEND, C.H.T. A new generic name for the screw-worm fly. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, v. 5, n. 20, p. 644-646, 1915.

TRAVIS, Bernard V.; KNIPLING, E. F.; BRODY, Arthur L. Lateral Migration and Depth of Pupation of the Larvae of the Primary Screwworm *Cochliomyia americana* C. and P. **Journal of Economic Entomology**, v. 33, n. 6, p. 847-850, 1940.

TRIPLEHORN, Charles A.; JOHNSON, Norman F.; DRAFT, Donald Joyce. **Borrór e introdução de DeLong ao estudo de insetos**. 2005.

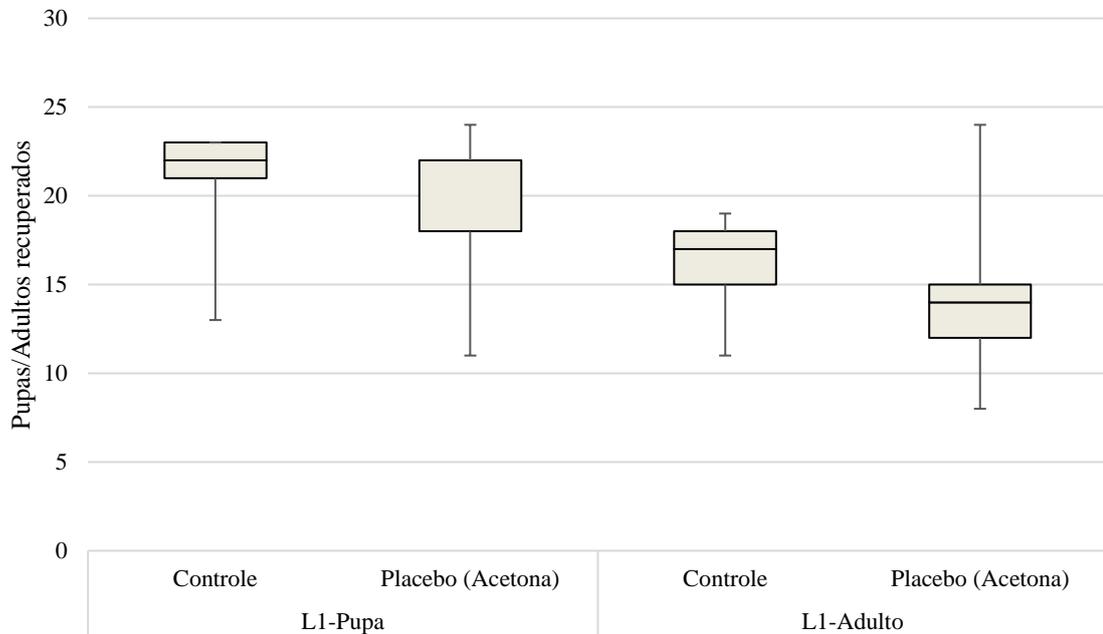
VARGAS-TERÁN, M.; HOFMANN, H. C.; TWEDDLE, N. E. Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In: **Sterile insect technique**. Springer, Dordrecht. p. 629-650, 2005.

VIANNA, E.E.S.; COSTA, P.R.P.; FERNANDES, A.L; RIBEIRO, P.B. Abundância e flutuação populacional das espécies de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v.94, p.231-234, 2004.

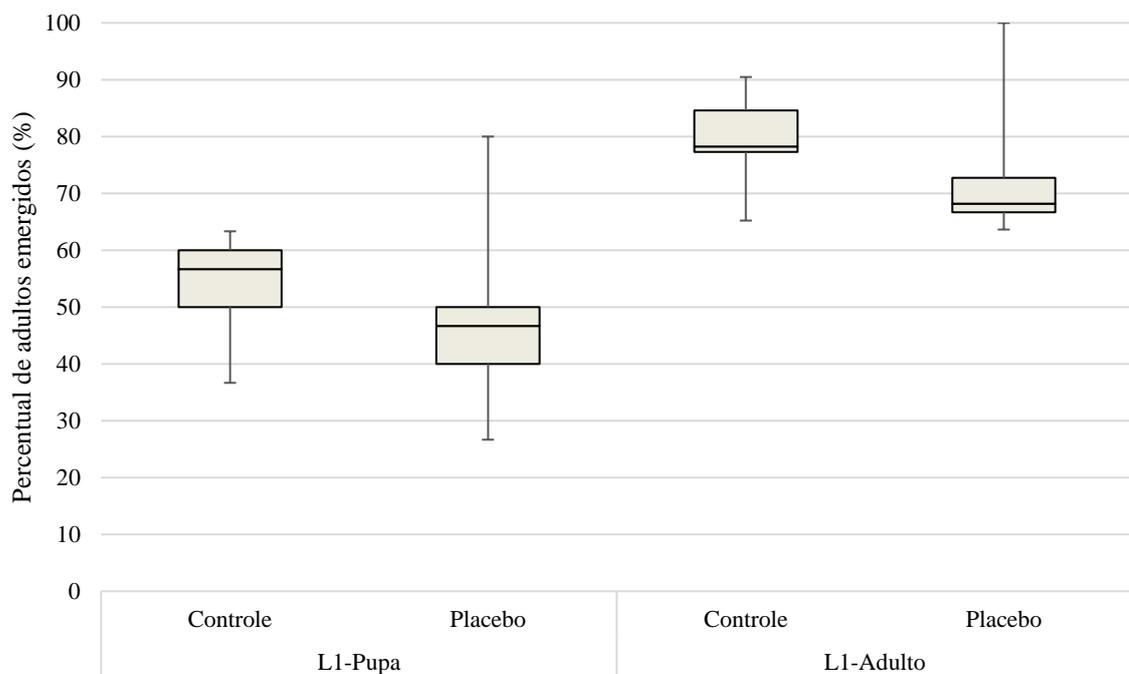
ZUMPT, F. **Myiasis in Man and Animals in the Old World. A Textbook for Physicians, Veterinarians and Zoologists.**, Butterworth & Co. 1965, 267 p.

## APÊNDICES

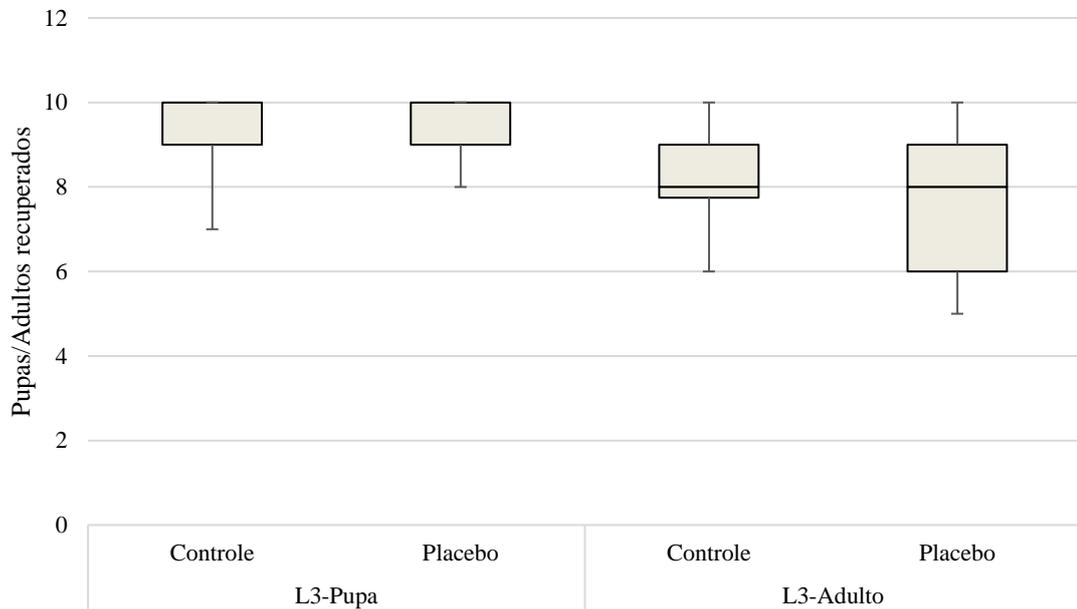
**APÊNDICE 1** – Recuperação de pupas e adultos de *Cochliomyia hominivorax* a partir da incubação de larvas de primeiro ínstar.



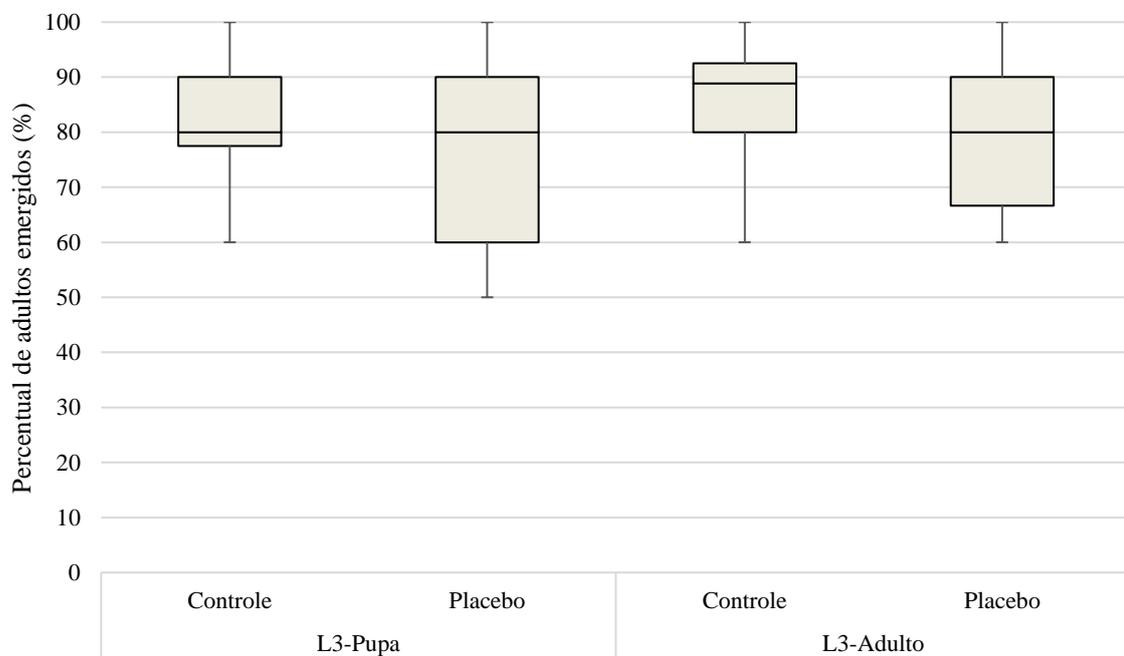
**APÊNDICE 2** – Percentual de adultos recuperados de *Cochliomyia hominivorax* recuperados a partir da incubação de larvas de primeiro ínstar e a partir de pupas recuperadas.



**APÊNDICE 3** – Recuperação de pupas e adultos de *Cochliomyia hominivorax* a partir da incubação de larvas de terceiro ínstar.



**APÊNDICE 4** – Percentual de adultos recuperados de *Cochliomyia hominivorax* recuperados a partir da incubação de larvas de terceiro ínstar e a partir de pupas recuperadas.



**APÊNDICE 5** – Bioensaio realizado com larvas de 1º ínstar de *Cochliomyia hominivorax* expostas ao Novaluron.

Réplicas	Pupas de <i>Cochliomyia hominivorax</i> recuperadas/ Concentrações (ppm)						
	Controle*	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
1	7	4	3	3	4	0	0
2	4	5	2	4	0	0	0
3	7	4	3	4	1	0	0
4	6	9	1	2	0	0	0
5	9	6	0	0	0	0	0
6	7	3	1	1	0	0	0
<b>Média</b>	<b>6,7<sup>a</sup></b>	<b>5,2<sup>a</sup></b>	<b>1,7<sup>b</sup></b>	<b>2,3<sup>b</sup></b>	<b>0,8<sup>b</sup></b>	<b>0,0<sup>b</sup></b>	<b>0,0<sup>b</sup></b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>1,6</b>	<b>2,1</b>	<b>1,2</b>	<b>1,6</b>	<b>1,6</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>Percentual de inibição de pupação (%)</b>	<b>---</b>	<b>22,9</b>	<b>75,1</b>	<b>65,2</b>	<b>87,6</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>
<b>Total de adultos emergidos</b>	<b>26</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Nº médio de adultos emergidos</b>	<b>4,3<sup>A</sup></b>	<b>1,3<sup>B</sup></b>	<b>0,8<sup>B</sup></b>	<b>0<sup>B</sup></b>	<b>0<sup>B</sup></b>	<b>0<sup>B</sup></b>	<b>0<sup>B</sup></b>
<b>Eficácia (%)</b>	<b>---</b>	<b>60</b>	<b>80,3</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

\*Solvente – Acetona PA. <sup>ab</sup>Médias das pupas com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ); <sup>AB</sup>Médias dos adultos com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p>0,05$ ).

**APÊNDICE 6** – Análise de Probit do apêndice 5.

Parâmetros	Pupa	Adulto
Faixa	0,05 – 0,1 ppm	
CL50	0,05ppm	0,04ppm
(IC 95%)	(0,053-0,061)	(0,037-0,050)
Slope	9,62	10,89
Coefficiente de Variação (Intercepto)	16,922	19,538
R <sup>2</sup>	0,887	0,842
Qui-quadrado	19,968	6,726
<i>p</i>	0,9995	0,849