

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

**DISSERTAÇÃO**

**Padronização de Teste *in vitro* e Avaliação da Eficácia de  
Diferentes Concentrações de Piriproxifen no Controle de  
*Cochliomyia hominivorax***

**Monique Taveira Medeiros**

**2019**



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

**PADRONIZAÇÃO DE TESTE *in vitro*  
E AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE PIRIPROXIFEN NO CONTROLE DO  
DESENVOLVIMENTO DE *Cochliomyia hominivorax***

**MONIQUE TAVEIRA MEDEIROS**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Fábio Barbour Scott**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2019



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



ATA Nº 2817/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.035761/2024-91

Seropédica-RJ, 22 de julho de 2024.

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

**MONIQUE TAVEIRA MEDEIROS**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01/03/2019

*(Assinado digitalmente em 02/08/2024 11:21)*

FABIO BARBOUR SCOTT

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: ###736#0

*(Assinado digitalmente em 22/07/2024 14:55)*

THAIS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)

Matrícula: ###298#9

*(Assinado digitalmente em 22/07/2024 12:51)*

GABRIELA FERREIRA DE OLIVEIRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.137-##

*(Assinado digitalmente em 23/07/2024 13:49)*

ISABELLA VILHENA FREIRE MARTINS

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.547-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 2817, ano: 2024, tipo: ATA, data de emissão: 22/07/2024 e o código de verificação: 8e056728b2

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

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

M488p

MEDEIROS, Monique Taveira, 1986-  
Padronização de Teste in vitro e Avaliação da  
Eficácia de Diferentes Concentrações de Piriproxifen  
no Controle de Cochliomyia hominivorax / Monique  
Taveira MEDEIROS. - Seropédica, 2019.  
51 f.

Orientador: Fábio Barbour Scott.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, PPGCV, 2019.

1. Inibidores do crescimento dos insetos. 2.  
Análogo do hormônio juvenil dos insetos. 3. Controle  
da mosca da bicheira. I. Barbour Scott, Fábio, 1966-,  
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. PPGCV III. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador, Dr<sup>o</sup>. Fábio Barbour Scott, eu agradeço pela oportunidade de integrar a equipe do LQEPV, pela confiança, e por toda ajuda dedicada a mim durante esses anos.

Aos queridos amigos da nossa área de campo experimental, eu agradeço por ajudarem a tornar os dias mais leves e o trabalho mais fácil. Agradeço por terem feito parte dessa trajetória, contribuindo com meu crescimento pessoal e profissional. Sempre teremos histórias inesquecíveis pra lembrar. Agradeço aos funcionários Cláudio Satler, Reginaldo Santos, Sidinei Ramos, Inocêncio Garcia e Fabrício Silva, aos médicos veterinários, Raphael Comissário, Paloma Silvestre, Michelle Moura, Andressa Alves, Jéssica Dávilla, Camila Rodrigues e Marisa Rocha, aos estagiários Liz Waltenberg e Thiago Vieira.

À Dr<sup>a</sup>. Gabriela Ferreira de Oliveira, minha amiga, eu agradeço por todos os dias ter a oportunidade de aprender com ela, por todo incentivo em me fazer crescer e por toda ajuda em tudo que eu já achei que não conseguiria. Ao privilégio de tê-la como amiga, eu tenho eterna gratidão e lisonjeio.

Agradeço ao Lucca Francesco Cassano por toda ajuda na colônia de *C. hominivorax* e neste estudo, por todas as histórias e conversas que faziam parte das nossas tardes. Agradeço também a todas as pessoas que contribuíram com a manutenção da colônia durante esse tempo.

Agradeço a Dr<sup>a</sup>. Bárbara Rauta de Avelar por todo tempo e paciência que dedicou para me ensinar e me ajudar durante esses anos, mesmo passando do horário algumas vezes. Agradeço também a todos os alunos e funcionários do LQEPV por toda cooperação e por ajudarem a tornar a rotina e a convivência harmoniosas, dentre esses, agradeço às minhas amigas Paula de Abreu Moraes, Debora Azevedo Borges, Priscila Cardim Oliveira, Brena Gava, Rayane Assis, Rosangela Santos, aos meus amigos, Dr<sup>o</sup>. Diefrey Campos e Jaime Cardoso.

Agradeço a toda equipe do laboratório de farmacocinética do LQEPV, em especial à Melina Alves e Thais Paes por toda ajuda com equipamentos e diluições.

Agradeço a todos os professores que participaram de alguma forma e contribuíram com a minha formação durante esse período, dedicando tempo tirando dúvidas e incentivando o aprendizado. Dentre eles, agradeço a professora Dr<sup>a</sup>. Katherina Coumendouros, por todo o tempo que dedicou me ajudando com as moscas, a professora Dr<sup>a</sup>. Thais Ribeiro Correia Azevedo pelas ideias e por disponibilizar material. Agradeço também o professor Dr<sup>o</sup>. Carlos Wilson Gomes Lopes pelas histórias, dicas e conselhos.

Ao Bruno de Toledo Gomes eu agradeço pela parceria e companheirismo de sempre, pelo amor e pela amizade.

À minha mãe, Lêda Taveira Medeiros, eu agradeço por todo esforço que fez para me oferecer uma boa educação e por ser a minha maior incentivadora. À minha família eu agradeço pela ajuda, incentivo, torcida e carinho.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudo, e à FAPUR (Fundação de Apoio à Pesquisa da Universidade Rural) pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Arthur Santiago, eu agradeço pela competência, disponibilidade e paciência em me ajudar.

Estar feliz com o seu trabalho é a certeza de estar no caminho certo. Agradeço a todos os envolvidos com isso e à honra de poder aprender e crescer nessa Universidade.

E agradeço, por fim, aos responsáveis por esse amor e pela vontade de aprender sempre, os animais.

## BIOGRAFIA

Monique Taveira Medeiros nasceu na cidade de Barra do Piraí, RJ, no dia 26 de janeiro de 1986, filha de Lêda Taveira Medeiros e Cláudio Luiz Medeiros (*in memorian*). Em 2006 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Severino Sombra - Vassouras, RJ, onde cursou até o sétimo período até o ano de 2009. Em 2010, participou de processo seletivo de transferência externa e ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante a graduação, estagiou no laboratório de Imunologia da UFRRJ em 2011, foi monitora da disciplina de Virologia Veterinária nos anos 2012 e 2013 e estagiária do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária nos anos de 2013 a 2014. Graduiu-se em Medicina Veterinária em agosto de 2014. Em março de 2015 ingressou no Curso de Pós-Graduação – Residência em Área Profissional da Saúde, Programa de Residência em Medicina Veterinária – Área de Concentração Diagnóstico em Medicina Veterinária, Eixo Específico Parasitologia Animal. Em fevereiro de 2017 concluiu o Programa de Residência e em março do mesmo ano ingressou no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em nível de mestrado.

## RESUMO

MEDEIROS, Monique Taveira. **Padronização de teste *in vitro* e avaliação da eficácia de diferentes concentrações contendo piriproxifen no controle do desenvolvimento de *Cochliomyia hominivorax***. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

*Cochliomyia hominivorax* é a principal mosca causadora de miíases primárias e responsável por perdas econômicas expressivas na pecuária. Atualmente o tratamento e o controle desta enfermidade é realizado com uso de inseticidas sintéticos. Contudo, já existem relatos de desenvolvimento de resistência parasitária aos principais ativos utilizados para esta finalidade. Neste contexto, os reguladores de crescimento de insetos podem se tornar uma alternativa no controle destas populações resistentes, além de possuírem menor toxicidade para o ambiente e para mamíferos. O objetivo deste trabalho foi padronizar uma metodologia para teste *in vitro* para avaliar a atividade larvicida e sobre o desenvolvimento de larva a adulto para a mosca *C. hominivorax*. Assim como avaliar a eficácia *in vitro* do piriproxifen nas concentrações 0,05%, 0,15% e 0,45% frente a larvas de primeiro instar de *C. hominivorax*. A primeira etapa do experimento foi padronizar uma metodologia para o teste *in vitro* foram incubadas larvas de primeiro instar de *C. hominivorax*, mantidas em laboratório, em diferentes recipientes com diferentes quantidades de meio larval. No total foram utilizados oito grupos experimentais que variavam entre si pela quantidade de larvas incubadas (10 ou 20 larvas); quantidade de meio larval utilizado (10 ou 20g); e o recipiente em que o conjunto, larva + meio larval, foram alocados (placas de petri, frascos de 145 mL ou frascos de 200 mL). Todo experimento foi realizado em sextuplicata. O material foi incubado em câmaras climatizadas com temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $80 \pm 10\%$  de umidade relativa e avaliado diariamente para o desenvolvimento das larvas, formação das pupas e emergência das moscas adultas. A segunda etapa do teste, foi determinar a atividade do piriproxifen frente a larvas de *C. hominivorax*. Para isso 10 larvas de primeiro instar foram adicionadas a 20 g de meio larval acrescido de três diferentes concentrações de piriproxifen: 0,05; 0,15 e 0,45%. Todo experimento foi realizado em sextuplicata e em conjunto com um controle negativo e um placebo. O material foi incubado em câmaras climatizadas com temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $80 \pm 10\%$  de umidade relativa e avaliado diariamente para o desenvolvimento das larvas, formação das pupas e emergência das moscas. Para avaliar a variância estatística entre as médias de recuperação de pupas e média da recuperação dos adultos, utilizou-se o teste para dados não paramétricos, Kruskal Wallis. Em todas as análises foi considerado o nível de confiança de 95% ( $p \leq 0,05$ ). Como resultados da primeira etapa do teste foi possível perceber as larvas incubadas em placas de petri (independentemente da quantidade de larvas ou de meio) não conseguiram completar o ciclo biológico e se desenvolver até adultos. O melhor resultado foi obtido para o grupo que foi incubado 10 L1 em 10 g de meio larval no frasco de 145mL. Todas as três concentrações de piriproxifen avaliadas foram eficazes para inibir a emergência de moscas adultas. Com isso, é possível concluir que a metodologia que incubava 10 L1 em 10 gramas de meio larval em potes de 145 mL é a que melhor permite o desenvolvimento de larvas até moscas adultas sendo, portanto, a melhor metodologia avaliada neste trabalho para ser aplicada em um teste *in vitro*. Somado a isso, o piriproxifen nas concentrações de 0,05; 0,15 e 0,45% se mostraram eficaz em inibir o desenvolvimento de larva até a adultos da mosca *C. hominivorax*.

**Palavras-chave:** Inibidores do crescimento dos insetos; análogo do hormônio juvenil dos insetos; controle da mosca da bicheira.



## ABSTRACT

MEDEIROS, Monique Taveira. **Standardization of *in vitro* test and evaluation of the efficacy of different concentrations containing pyriproxifen in the control of the development of *Cochliomyia hominivorax***. 2019. Dissertation (Masters in Veterinary Sciences). Institute of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

*Cochliomyia hominivorax* is the main fly that causes primary myiasis and is responsible for significant economic losses in livestock. Currently, the treatment and control of this disease are carried out using synthetic insecticides. However, there are already reports of the development of parasitic resistance to the main activities used for this purpose. In this context, insect growth regulators can become an alternative to control these resistant populations, in addition to having less toxicity for the environment and for mammals. The objective of this work was to standardize a methodology for an *in vitro* test to evaluate the larvicidal activity and the development from larva to adult for the fly *C. hominivorax*. As well as evaluating the *in vitro* efficacy of pyriproxifen at concentrations 0.05%, 0.15% and 0.45% against first-instar larvae of *C. hominivorax*. The first stage of the experiment was to standardize a methodology for the *in vitro* test. First-instar larvae of *C. hominivorax*, kept in the laboratory, were incubated in different containers with different amounts of larval medium. In total, eight experimental groups were used, which varied according to the number of larvae incubated (10 or 20 larvae); amount of larval medium used (10 or 20g); and the container in which the set, larvae + larval medium, were stored (petri dishes, 145 mL pots or 200 mL pots). All experiments were performed in sextuplicate. The material was incubated in climate-controlled chambers with a temperature of  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  and relative humidity of  $80 \pm 10\%$  relative humidity and evaluated daily for larval development, pupa formation and emergence of adult flies. The second stage of the test was to determine the activity of pyriproxifen against *C. hominivorax* larvae. For this, 10 first-instar larvae were added to 20 g of larval medium plus three different concentrations of pyriproxifen: 0.05; 0.15, and 0.45%. Every experiment was performed in sextuplicate and together with negative control and a placebo. The material was incubated in climate-controlled chambers with a temperature of  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  and relative humidity of  $80 \pm 10\%$  relative humidity and evaluated daily for larval development, pupa formation, and the emergence of adult flies. To evaluate the statistical variance between mean pupal recovery and mean adult recovery, the Kruskal Wallis test for non-parametric data was used. In all analyses, the confidence level of 95% was considered ( $p \leq 0.05$ ). As a result of the first stage of the test, it was possible to see that the larvae incubated in petri dishes (regardless of the number of larvae or medium) were unable to complete the biological cycle and develop into adults. The best result was obtained for the group that was incubated 10 L1 in 10 g of larval medium in the 145mL pots. All three pyriproxifen concentrations evaluated were effective in inhibiting the emergence of adult flies. With this, it is possible to conclude that the methodology that incubates 10 L1 in 10 grams of larval medium in 145 mL pots is the one that best allows the development of larvae to adult flies, being, therefore, the best methodology evaluated in this work to be applied in an *in vitro* test. Added to this, pyriproxifen in concentrations of 0.05; 0.15 and 0.45% were effective in inhibiting the development from larva to adult of the *C. hominivorax* fly.

**Keywords:** Insect growth inhibitors; analogue of juvenile insect hormone; control of the pestle fly.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Média estatística dos resultados obtidos no teste para padronização <i>in vitro</i> para desafiar formas parasitárias da mosca <i>Cochliomyia hominivorax</i> e observação da continuidade do seu ciclo.....	22
<b>Tabela 2:</b> Média estatística dos resultados obtidos no teste <i>in vitro</i> com diferentes concentrações de piriproxifen desafiando larvas de primeiro ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> e observação da continuidade do seu ciclo.....	28

## ANEXOS

<b>Anexo A:</b> Recuperação de pupas e adultos em todas as repetições dos grupos do estudo de padronização do teste <i>in vitro</i> .....	36
<b>Anexo B:</b> Recuperação de pupas e adultos em cada repetição por grupo amostral do estudo desafiando larvas de primeiro ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> com diferentes concentrações de piriproxifen. ....	38
<b>Anexo C:</b> Médias dos valores recuperados por grupo experimental do estudo desafiando larvas de primeiro ínstar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> com diferentes concentrações de piriproxifen. ....	39

## **LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS**

LQEPV – Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

L1 – Larva de primeiro estágio

L2 – Larva de segundo estágio

L3 – Larva de terceiro estágio

IGR – Inibidores do Crescimento dos Insetos

JH – Hormônio juvenil

20E – 20 hidroxiectisona

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Um Pouco da História da Mosca <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Taxonomia e Nomenclatura.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 Distribuição .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4 Características Morfológicas .....</b>	<b>5</b>
<b>2.5 Mecanismo Hormonal dos Insetos .....</b>	<b>5</b>
<b>2.6 Ciclo de Vida .....</b>	<b>6</b>
<b>2.7 Importância Econômica.....</b>	<b>9</b>
<b>2.8 Miíase.....</b>	<b>10</b>
<b>2.9 Controle .....</b>	<b>11</b>
<b>2.9.1. Reguladores de crescimento de insetos: piriproxifen.....</b>	<b>12</b>
<b>2.9.2 Controle pelo programa da técnica do inseto estéril e fatores fundamentais para implementação .....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Manutenção da colônia de <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 Padronização do Estudo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.1 Análise Estatística do Estudo para Padronização do teste <i>in vitro</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 Metodologia do estudo <i>in vitro</i> desafiando larvas de primeiro instar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> frente a diferentes concentrações de piriproxifen .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.1 Análise estatística.....</b>	<b>17</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>4.1 Padronização do Estudo <i>in vitro</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>4.2 Atividade <i>in vitro</i> do piriproxifen frente a larvas de primeiro instar de <i>Cochliomyia hominivorax</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>29</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A mosca *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858), pertencente à família Calliphoridae, Ordem Diptera, é um parasita obrigatório de animais de sangue quente e suas formas larvais são responsáveis por causar miíase primária nos hospedeiros. Conhecida popularmente como a “mosca da bicheira”, pode realizar postura de até 450 ovos ao longo da vida, porém, copulam apenas uma vez. As fêmeas são atraídas por feridas e, na busca por animais com lesões, podem voar até 350 km.

Como consequência do seu parasitismo, ocorre aumento da mortalidade dos animais, gastos com inseticidas, medicamentos, serviços veterinários, mão-de-obra, inspeção e manejo dos animais, com consequências como diminuição do ganho de peso, da produção de leite e da qualidade do couro. Um animal adulto infestado com larvas de *C. hominivorax* pode morrer em cerca de sete a dez dias se não for tratado corretamente. O efeito sobre a vida selvagem pode ser mais devastador, por ser praticamente incontrolável e por esses animais não se beneficiarem do tratamento e das medidas de proteção disponíveis para os animais domésticos.

Atualmente, a produção animal tem grande importância na agricultura mundial. Nota-se um aumento na demanda das principais fontes de proteína para a população humana: carne, leite e ovos. E, para satisfazê-la, encontra-se uma diversidade de sistemas de produção animal nos diferentes continentes, incluindo a criação de gado, búfalo, ovelha, cabra, porco e ave em pequenas explorações agrícolas tradicionais e em pastoreio extensivo ou em sistemas de confinamento dependendo das circunstâncias locais. Nos países em desenvolvimento, a produção animal contribui de forma significativa para os suprimentos alimentares nacionais. Esta produção oferece segurança alimentar, renda em dinheiro para muitas pessoas da zona rural e benefícios para toda a economia. A pecuária aumenta a viabilidade econômica e a sustentabilidade do sistema agrícola.

O ano de 2017 foi, sem dúvida, um período desafiador para a pecuária brasileira. O cenário político econômico do país seguiu instável e apresentando dificuldades de recuperação, ainda que o PIB tenha reagido e apresentado crescimento de 1% (ABIEC, 2018).

Previsões feitas pelo Instituto Internacional de Pesquisa em Políticas Alimentares (IFPRI), Instituto Internacional de Pesquisa Pecuária (ILR1) e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), sugerem que, entre 1993 e 2020, o consumo mundial de carne dobrará de 180 para 300 milhões de toneladas, e a produção de leite aumentará de 400 a 650 milhões de toneladas (FAO, 2018). Para satisfazer essa demanda crescente, o mundo precisa encontrar mecanismos para desenvolver maiores eficiências de produção sem danificar o ambiente. Parte desse aumento na produtividade pode ser obtido com melhorias na saúde animal.

As doenças ecto e endoparasitárias são reconhecidas como principais fatores limitantes para a produção animal. Para o controle das infestações provocadas pelas formas larvais da mosca *C. hominivorax* são aplicados larvicidas tópicos ou sistêmicos. No Brasil, a maioria dos inseticidas utilizados para o controle da mosca pertencem à classe dos organofosforados, que já tiveram resistência comprovada em alguns trabalhos. O uso indevido de inseticidas pode vir a selecionar linhagens de insetos resistentes. A evolução da resistência a pesticidas e drogas por pragas e patógenos é um exemplo clássico de adaptação às mudanças ambientais e uma questão importante na saúde pública e na agronomia.

Os medicamentos utilizados no controle, além de representarem um grande prejuízo para o produtor, contribuem para a presença de resíduos indesejáveis na carne e no leite bovino. Além de todos estes aspectos indesejáveis do uso de inseticidas para os produtores e para os

consumidores dos produtos de origem animal, deve-se também considerar o impacto ambiental produzido pela utilização dessas substâncias

Uma categoria alternativa para controle de insetos vem sendo representada pelos chamados reguladores do crescimento de insetos (IGRs), constituída por um grupo de componentes que normalmente não matam o parasito alvo diretamente, mas interferem no seu crescimento e desenvolvimento. Agem principalmente sobre os estágios imaturos do parasito e por isso, não são os mais adequados para o rápido controle de populações estabelecidas de parasitos adultos.

O piriproxifen está incluído na classe dos IGRs por possuir ação análoga ao hormônio juvenil, mimetizando a atividade natural do hormônio e evitando a metamorfose do inseto. Uma vez que a larva esteja completamente desenvolvida, enzimas do sistema circulatório do inseto destroem o hormônio juvenil endócrino e, finalmente, ocorre o estágio adulto. O análogo do hormônio juvenil se liga aos receptores do hormônio juvenil e, por ser estruturalmente diferente, não é destruído pelas esterases do inseto. Como consequência, a metamorfose e o desenvolvimento para a fase adulta não prosseguem.

Essa dissertação tem por objetivo padronizar uma técnica para avaliar *in vitro* a atividade de inseticidas frente as formas larvais e seu desenvolvimento até adultos da mosca *C. hominivorax*, em seguida, e avaliar a eficácia do piriproxifen *in vitro* sobre o ciclo biológico da mosca o inseticida teve eficácia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Um Pouco da História da Mosca *Cochliomyia hominivorax*

Acredita-se que no decorrer da evolução das espécies, moscas que normalmente se alimentavam de matéria orgânica em decomposição passaram a ser atraídas por tecido animal em decomposição como, por exemplo, carcaças de animais. Em um estágio posterior, essas espécies passaram a depositar seus ovos em tecidos necrosados de animais vivos, onde as larvas se alimentavam, produzindo o que agora chamamos de miíases secundárias. Finalmente, algumas espécies adquiriram a capacidade de se alimentar em tecidos vivos, produzindo as chamadas miíases primárias (NEVES et al., 2011).

A ordem Diptera compreende as moscas verdadeiras, é uma das maiores ordens da classe Insecta, com mais de 120.000 espécies descritas e está dividida em três subordens, Cyclorrhapha, Brachycera e Nematocera. Todas as moscas apresentam ciclo de vida complexo com metamorfose completa. Como resultado, as desta ordem podem ser parasitas como larvas ou como adultas, porém raramente são parasitas em ambos os estágios do ciclo de vida (TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

A subordem Cyclorrhapha compreende moscas que são desde pequenas, até tamanho médio, com antenas curtas e com três segmentos, o último dos quais quase sempre contém um acessório em forma de pena, a arista. Os palpos maxilares são pequenos e as asas possuem nervuras cruzadas. Os díptera desta ordem de interesse veterinário dividem-se em três superfamílias: Muscoidea, Hippoboscoidea e Oestroidea. A superfamília Oestroidea, contém três famílias de importância: Oestridae, Calliphoridae e Sarcophagidae. A família Calliphoridae, conhecidas como varejeiras, correspondem a uma grande família, composta de mais de 1000 espécies divididas entre 150 gêneros. No mínimo 80 espécies foram registradas provocando miíase cutânea traumática. Essas espécies são encontradas amplamente em cinco gêneros importantes: *Cochliomyia*, *Chrysomya*, *Cordylobia*, *Lucilia* e *Calliphora*. A maior parte dessas espécies são invasoras facultativas primárias ou secundárias. Apenas duas espécies, *Chrysomya bezziana* e *Cochliomyia hominivorax*, são agentes obrigatórios de miíases, ou seja, causam miíase primária (TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

*Cochliomyia hominivorax* ocorre em números relativamente baixos na natureza em comparação com outras espécies de insetos (FAO, 1990; OLIVEIRA, 1980). As populações são agregadas ainda que móveis dentro de habitats favoráveis. Como resultado, nenhum inimigo natural específico para *C. hominivorax* adulta foi identificado (THOMAS; MANGAN, 1989).

Welch, em 1993, descreve a predação de moscas estéreis por aranhas. Formigas são predadores comuns das larvas que saem de feridas para pupar e foram observadas se alimentando de larvas em feridas. Não há dados que sugiram que os inimigos naturais sejam importantes para a dinâmica populacional de *C. hominivorax* na natureza (CABI, 2013). Na criação da mosca em laboratório, a predação por formigas é uma observação extremamente importante e deve-se ter precaução para evitar infestações que possam pôr em risco a progênie das gerações presentes.



## 2.2 Taxonomia e Nomenclatura

A taxonomia e nomenclatura desta espécie ficou muito confusa por mais de 100 anos. Cushing e Patton (1933) documentaram a diferença entre *Cochliomyia americana* e *Cochliomyia macellaria*, que serviu de base fundamental na erradicação da *Cochliomyia hominivorax* presente na América do Norte, América Central e partes do Caribe (CABI, 2013).

O nome *Callitroga* foi originalmente um nome dado por Schiner para espécies em sua coleção, mas nunca publicado. Brauer (1883) publicou o nome em seu tratado sobre habitats de larvas, com referência às espécies *Calliphora anthropophaga*. Ele afirmou que *C. anthropophaga* era o mesmo que *Compsomyia macellaria* e *Lucilia hominivorax*, e que esta espécie (sob qualquer um destes três nomes) era referida *Lucilia* de Osten Sacken, *Callitroga* de Schiner e *Musca* de autores anteriores (DEAR, 1985).

O nome *Callitroga* foi, portanto, publicado pela primeira vez em sinonímia e até 1964, o correto era tratá-lo como inválido no Código Internacional de Nomenclatura Zoológica. No entanto, uma emenda de 1964 validou qualquer nome publicado em sinonímia antes de 1961, desde que tivesse sido tratado como um nome disponível e citado com sua data original e autor. *Callitroga* cumpria estas condições, como Hall (1948) usou este nome para sua espécie de mosca. Portanto, *Callitroga* foi usado como o nome para o gênero referido como *Cochliomyia*. No entanto, a maior parte das publicações na época referem-se ao gênero *Cochliomyia*, incluindo vários catálogos e bibliografias, e como as espécies são de importância, foi preferível que o nome *Cochliomyia* continuasse em uso.

Um pedido foi feito à Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica para extinguir o nome *Callitroga* (DEAR, 1985). E então, o nome *C. hominivorax* definitivamente passou a ser o nome correto para a espécie (CABI, 2013).

## 2.3 Distribuição

A miíase provocada por *C. hominivorax* foi descrita pela primeira vez em 1857, infestando humanos na Ilha do Diabo na Guiana Francesa (VARGAS-TERÁN; HOFMANN; TWEDDLE, 2005).

Em 2018, os países da América do Norte (EUA, México), da América Central (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Panamá) e Caribe (Curaçao, Ilhas Virgens Britânicas e Porto Rico) foram consideradas áreas livres de *C. hominivorax* através da execução de programas de controle bem-sucedidos para erradicação. A mosca é endêmica em Cuba, Haiti, Jamaica, República Dominicana, Trindade e Tobago. Esses países fazem grandes esforços para obter seu controle e realizar negociações para o estabelecimento de programas para sua erradicação (BERGAMO, 2018).

Na América do Sul, os seguintes países e territórios são endêmicos: Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela. O único país da América do Sul que é livre da mosca é o Chile, sua última ocorrência foi registrada em 1947 (BERGAMO, 2018; CABI, 2013; FAO, 2018; VARGAS-TERÁN; HOFMANN; TWEDDLE, 2005).

Em julho de 2016, três casos de miíase grave foram encontrados em três animais domésticos, e em um cervo, na Flórida. Foi a primeira infestação na Flórida em 57 anos e a primeira infestação nos EUA em 34 anos após erradicação (DELGADO; HENNESSEY; HSI, 2016). Nenhum caso novo de bicheira tem sido relatado na Flórida desde 10 de janeiro de 2017, tornando-se área erradicada novamente em 2018 (BERGAMO, 2018).

## 2.4 Características Morfológicas

Os ovos são brancos brilhantes, com aproximadamente 1,04 mm de comprimento e 0,26 mm de diâmetro com formato cilíndrico, arredondados na extremidade posterior e achatados na extremidade anterior com uma costura dorsal que se estende da extremidade anterior quase até a extremidade posterior do ovo. Os ovos são colocados em um padrão paralelo em camadas coladas para formar uma massa que lhes dá a aparência de um telhado (CABI, 2013).

As posturas contêm de 10 a 400 ovos. Os ovos são geralmente colocados nas bordas das feridas, mas também podem ser colocados sobre ou perto dos orifícios do corpo do hospedeiro (CABI, 2013; CARVALHO; RIBEIRO, 2000; DEAR, 1985).

Outras moscas têm a tendência a fazer postura em cima de posturas já existentes na ferida do hospedeiro ou em cima de posturas colocadas no meio de oviposição criado no laboratório (MASTRANGELO, 2011; THOMAS; MANGAN, 1989).

As larvas de primeiro ínstar possuem aproximadamente 1,2 mm e 0,23 mm, comprimento e diâmetro, respectivamente. Quando recém-eclodidas são muito claras com estruturas internas visíveis, depois que se alimentam, crescem aproximadamente 3,6 mm e 0,57 mm, de comprimento e diâmetro, respectivamente. Larvas de segundo estágio podem chegar a aproximadamente 6,3 mm a 7,4 mm e 1,5 mm de comprimento e diâmetro, respectivamente. As larvas de terceiro ínstar chegam a aproximadamente 6,4 mm a 17 mm de comprimento e 1,6 mm a 3,5 mm de diâmetro, dependendo da dieta (BRITO et al., 2008).

Todos os estágios larvais têm bandas características de espinhos na maioria dos segmentos e um par de ganchos bucais, troncos traqueais principais e espiráculos. Troncos traqueais principais que partem dos espiráculos respiratórios possuem pigmentação castanho-escura ou negra (CABI, 2013; GUIMARÃES; PAPAVERO; PRADO, 1983a).

As pupas são em forma de barril e de cor castanha escura. Têm aproximadamente 10,2 mm e 4,3 mm de comprimento e largura, respectivamente (TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940).

A cor dos adultos é variável, variando de azul metálica a verde escuro, azul-acinzentado-claro, de azul-celeste a azul-escuro. Os adultos são aproximadamente duas a três vezes o tamanho de uma mosca doméstica (CABI, 2013). Na porção inferior da parafrontália possuem pêlos amarelos, faixa central do mesonoto mais curta, segmentos abdominais sem pilosidades; fêmeas com basicosta escura; machos com falosoma curvo. Palpos curtos e filiformes, nunca atingindo a margem do epistoma (BRITO et al., 2008; GUIMARÃES; PAPAVERO; PRADO, 1983b; OLIVEIRA, 1980)

## 2.5 Mecanismo Hormonal dos Insetos

A metamorfose é a estratégia de vida mais amplamente utilizada na história da evolução dos animais (TAYLOR; COOP; WALL, 2010), é uma adaptação biológica fascinante e altamente bem-sucedida, mas há muita incerteza sobre como ela evoluiu (TRUMAN et al., 2006). Insetos com metamorfose completa (holometabólicos) como as moscas, tem os estágios larval, pupal e adultos bastante diferentes, fato que permite-lhes poder separar os recursos necessários para o crescimento daqueles necessários para a reprodução, além de possuírem um ciclo de vida bem rápido (DEAR, 1985; TRUMAN; RIDDIFORD, 1999).

No processo de metamorfose dos insetos, há a presença de hormônios e há uma regulação endócrina relacionada ao crescimento e desenvolvimento. Após a descoberta de que

compostos que imitam a ação de hormônios juvenis poderiam ser usados como inseticidas seguros, numerosos análogos foram descobertos (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998), então, pesquisas agroquímicas resultaram na descoberta de novos inseticidas que imitam a ação de dois hormônios de crescimento e desenvolvimento de insetos, a hidroxisectsona (20E) e o hormônio juvenil (JH) (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

As explorações em diferentes habitats e fontes de alimento, nos diferentes estágios da vida do inseto, além de garantir elevado grau de adaptação, garantem um importante fator para a sobrevivência, a dispersão (BOWMAN, 2006).

O crescimento e o desenvolvimento dos insetos, que são pontuados por períodos de ecdise, são regulados pelo hormônio 20E, os JHs e hormônios pró-torácicos (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998). Embora haja diferenças específicas entre os mecanismos da metamorfose entre as espécies, sabe-se que esses três hormônios atuam concomitantemente (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012). No estágio adulto, esses hormônios também estão envolvidos na regulação da maturação reprodutiva. O processo de muda é iniciado e completado por um aumento e declínio no título de 20E e consequentemente a liberação do hormônio de eclosão. Quando uma larva se prepara para passar por uma ecdise larval, ela interrompe a alimentação. Entretanto, qualquer interferência na homeostase de um ou mais desses hormônios, com fontes exógenas ou com análogos sintéticos (agonistas ou antagonistas), resulta na ruptura ou crescimento anormal do inseto alvo (DHADIALLA; CARLSON; LE, 1998).

O JH é liberado pelas células do corpo alado no cérebro e tem por objetivo manter as características juvenis (imaturas) nos insetos em desenvolvimento, prevenindo a metamorfose a cada muda larval. Sendo assim, quando o 20E age sobre a epiderme e os níveis hemolinfáticos de hormônio juvenil estão altos, o inseto muda para outra forma, uma forma juvenil grande. Durante o período de alimentação entre as mudas, JH também é necessário para a manutenção da proliferação isomórfica dos discos imaginais, que são tecidos epiteliais desenvolvidos durante o primeiro estágio do ciclo de vida dos insetos holometabólicos e, finalmente, dão origem as principais partes do corpo como olhos, asas, pernas e genitália (TRUMAN et al., 2006).

Quando ectisona atua na ausência de JH, causa a cessação da alimentação e o início da busca de um lugar para pupação (MITSUI; RIDDIFORD, 1978; RIDDIFORD, 1976). No último estágio de larva, o corpo alado torna-se inativo e quando a ectisona é liberada, inicia-se a próxima muda com os níveis de hormônio juvenil baixos ou inexistentes. Nesse momento, a epiderme começará a produzir estruturas de pupa. Em insetos holometabólicos, a ectisona é secretada novamente no final da pupação e, como o hormônio juvenil não está presente, ela desencadeia a metamorfose para a forma adulta (HILL; WYSE; ANDERSON, 2012).

## **2.6 Ciclo de Vida**

A taxa reprodutiva das fêmeas é elevada e a oviposição pode chegar a até 450 ovos em intervalos de três a quatro dias, colocados na periferia de feridas ou orifícios e mucosas do corpo. Nas primeiras 24 horas após os ovos terem sido colocados, as larvas eclodem e passam a se alimentar dos tecidos vivos por cinco a oito dias até atingirem o terceiro estágio (L3) (MASTRANGELO, 2011). Hightower et al. (1972), estabeleceram três fases de crescimento larval: a 1ª seria caracterizada por um lento desenvolvimento de 0,3 a 0,11 mg com duração de três dias, a 2ª fase seria de crescimento crítico de 35 a 65 mg (suficiente para pupação), e a 3ª fase seria de crescimento pós-crítico, em que é determinado o tamanho do adulto. Oliveira (1980) concluiu que, em dieta artificial, o período larval varia de três a cinco dias. Mazza (1939) considerou que em condições de campo as larvas de 1º ínstar atingem 1,2 mm de comprimento por 0,23 mm de largura, as de 2º ínstar 4,85 mm de comprimento por 1,5 mm de largura, e as

de 3º ínstar 11,7 mm de comprimento por 2,55 mm de largura. Davis e Camino (1968) observaram o comprimento larval indo de um até 17 mm.

Em 50 culturas realizadas em meio artificial, nas quais foram criadas 7.768 larvas, o período larval variou entre três e cinco dias, tendo 8,26% abandonado o meio em três dias, 89,10% em 4 dias e 2,64% em cinco dias. Pode-se observar que nas primeiras 24 h após a eclosão, 61% das larvas já estavam no segundo estágio, e que nas 48 h, 50% delas haviam atingido o terceiro ínstar (THOMAS; MANGAN, 1989).

As larvas deixam as feridas para pupar no solo principalmente à noite, com pico entre a meia-noite e o começo da alvorada, e as fêmeas tendem a sair antes dos machos (MASTRANGELO, 2011). Segundo um estudo realizado nos Estados Unidos em 1940, Travis e colaboradores puderam observar que 89% das larvas quando caíam da ferida para pupar faziam migração lateral no solo, e a área em que foram encontradas foi considerada pequena, tendo como referência o local em que caíram do hospedeiro, chegando a 45 cm de distância. E a profundidade com que entraram no solo exposto ao tempo não ultrapassou 3,8 cm, porém, geralmente chegam a dois a três cm de profundidade (MASTRANGELO, 2011; TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940). Os autores notaram que as larvas tinham a tendência a pupar em partes da vegetação presente no solo, e onde essa vegetação era escassa, atingiam profundidades ligeiramente maiores (TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940). Após atingir a profundidade, viram-se no túnel criado e puparam em 24 h (MASTRANGELO, 2011).

Davis e Camino (1968) relataram um comprimento pupal de  $10,2 \pm 0,8$  mm, e peso de pré-pupas entre 77 e 94,4 mg. A duração do período pupal varia de uma a oito semanas dependendo do tipo de solo, temperatura e umidade. Oliveira (1980) observou que o período pupal de 50 culturas variou de seis a 10 dias (26° C e 80% de umidade relativa). Segundo Laake et al. (1936), o período de pré-pupa pode durar de sete horas a três a dois dias, o de pupa, sete a 54 dias dependendo da estação do ano. Brody e Rogers (1945) registraram, durante o inverno na Flórida, um período pupal de até 78 dias. Parman (1945) e Flitters e Benschoter (1968) afirmaram que a temperatura média crítica de sobrevivência de pupas está entre 9 - 10 °C.

Thomas (1989) relatou que pupas em solo expostas diretamente ao sol sofreram 77% de mortalidade. E em locais protegidos, a mortalidade representada pela não emergência dos adultos foi de 25%. Os níveis de umidade foram de influência mínima, embora a mortalidade tenha sido alta com chuvas fortes mesmo em locais não expostos pelo sol (THOMAS, 1989). Já foi observado que pupas apresentaram viabilidade de 70% depois de serem mantidas por um mês à temperatura constante de 5 °C (ELWAER; ELOWI, 1991). Segundo Chirico et al. (1994), pupas irradiadas no 5º dia do estágio podem ser armazenadas até  $132 \pm 2$  h a 10 °C sem comprometer a qualidade dos adultos significativamente. Segundo os mesmos autores, pupas irradiadas também podem ser mantidas a 35 °C durante as últimas 36 h do estágio pupal sem haver perda substancial da qualidade das moscas, mas já a 40 °C a emergência de adultos cai para apenas 0,3% ou menos. A maior taxa de maturação dos ovos foi verificada a 32,2 °C, e temperaturas acima desta estressam o inseto, aumentam o tempo necessário para completar a pré-vitelogênese e a vitelogênese (ADAMS, 1979a).

Quando a mosca adulta está pronta para emergir, ela o faz inflando o saco ptileal membranoso situado na frente da cabeça, o qual então empurra para fora uma tampa circular na extremidade anterior da pupa (TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

Quase 70% das pupas emergiram aos sete dias e, mais de 98% emergiram entre o 7º e o 8º dias, coincidindo com as observações encontradas na literatura (BUSHLAND; HOPKINS, 2015; TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940).

Aos cinco dias de idade, as pupas tinham o peso médio de 50,01 mg, oscilando de 42,20 a 58,25 mg/pupa. Comparando o peso médio das pupas com o peso médio das larvas que abandonavam o meio de crescimento, constatou-se uma queda de peso de 18,21% entre uma

fase e outra. Baumhover, em 1963 registrou uma queda de peso de 19,7% entre estes dois períodos.

As visitas às feridas dos hospedeiros desempenham duas funções na biologia da mosca da bicheira, a de nutrição, e de oviposição. Dados obtidos através da marcação de moscas em um estudo realizado no México no ano de 1986, mostraram que as visitas das fêmeas às feridas somente para se alimentarem ocorreu em 62,3% do tempo observado (THOMAS; MANGAN, 1989).

As moscas são anautógenas, têm a necessidade de ingerir aminoácidos para completar a maturação (THOMAS; MANGAN, 1989). Mackley e Snow (1982) encontraram apenas uma pequena porcentagem de fêmeas que ovipositaram uma segunda vez quando mantidas em uma dieta de mel e água. A ingestão de carboidratos é essencial tanto para a sobrevivência quanto para a reprodução (CHEN et al., 2014). *Cochliomyia. hominivorax* tem uma exigência proteica muito pequena em comparação com outras moscas varejeiras. Barton Browne et al. (1986) mostraram que, para *Lucilia cuprina* (Wiedermann), uma única refeição proteica é insuficiente para completar o desenvolvimento do ovo. Além disso, Vogt et al. (1985) concluíram que os fluidos da ferida eram uma fonte insignificante de proteína para ela. *Cochliomyia. hominivorax* também se alimenta de néctar de flores e de esterco na natureza, ambas fontes frascônicas de proteína (MASTRANGELO, 2011; TEIXEIRA, 2013; THOMAS, 1993).

As visitas de alimentação são simples e curtas em duração; as fêmeas absorvem a descarga serosa da ferida infestada e saem após cinco a seis minutos. Visitas de oviposição duram aproximadamente 15 minutos. A deposição da massa de ovos é precedida pela limpeza do abdômen, esforço do ovipositor e busca de um local de oviposição adequado. (THOMAS; MANGAN, 1989).

As diferenças no comportamento foram avaliadas com a evolução reprodutiva da mosca adulta na tentativa de dar sentido às observações aparentemente contraditórias de *C. hominivorax* no campo e no laboratório e apontar as ambiguidades. O comportamento da mosca muda à medida que ela amadurece, de modo que seu lugar, em resposta ao meio ambiente depende em grande parte de sua idade. A sequência de eventos que caracterizam a maturação da mosca adulta resulta em uma série cronológica de fases no ciclo de vida do adulto. Cada fase tem um conjunto característico de respostas comportamentais e processos fisiológicos. Além disso, cada fase ocorre em um ambiente ecológico diferente. Depois que as moscas emergem das pupas, estas fases são: fase adolescente, fase sexualmente madura, e a fase reprodutiva. Na fêmea as duas fases iniciais duram dois a três dias cada. A fase reprodutiva alterna entre estágios oviposicional e interoviposicional de três dias de periodicidade. O macho adulto amadurece e permanece na fase sexualmente madura após dois a três dias na fase de adolescência (THOMAS, 1993). Os machos criados no laboratório são mais sexualmente agressivos do que os nativos selvagens (THOMAS, 1993).

Nos estudos de longevidade de moscas de laboratório, as moscas viveram até 50 dias e produziram até 11 posturas. Os dados mostraram que o intervalo entre as posturas indica que as fêmeas selvagens têm um ciclo de oviposição de três dias. Isto está de acordo com o comportamento de cepas laboratoriais relatadas, que ovipositaram a cada dois e três dias em oposição a novas cepas que ovipositaram apenas a cada quatro e cinco dias. Neste caso, a adaptação laboratorial pode ter sido um desvio em direção ao invés de um comportamento normal (THOMAS, 1993; THOMAS; MANGAN, 1989).

As características biológicas de *C. hominivorax* favorecem sua erradicação, dentre esses fatores: possui ciclo biológico curto, suficiente para detectar presença e aplicar medidas de controle, como diagnóstico e tratamento; não requer vetores para sua propagação, uma vez que produz as infestações diretamente; capacidade de apresentar sinais clínicos característicos; as pessoas que lidam com o manejo de animais os reconhecem facilmente à campo e podem relatar aos responsáveis sobre os animais afetados; o diagnóstico no laboratório não requer

equipamento sofisticado e caro e sua identificação no estado larval é simples; as fêmeas são monogâmicas e os machos polígamos que permitem o desenvolvimento de técnicas de controle biológico bem sucedidas para sua eliminação (FAO, 2018).

Como as condições favoráveis de hospedeiro e clima coincidem, o frascional de crescimento da população de *C. hominivorax* é considerável. Além de serem transportadas a grandes distâncias nas feridas dos hospedeiros, as moscas adultas podem migrar até 290 km em menos de duas semanas (THOMAS, 1993).

Além da temperatura, a chuva seria um dos fatores limitantes da sobrevivência da mosca na natureza. As temperaturas extremamente altas não impedem o aumento da população, desde que, a umidade seja favorável (OLIVEIRA, 1980). Os autores admitem um limiar crítico de 35°C para a sobrevivência de *C. hominivorax*. Neste nível, a temperatura do solo, a 2,5 cm de profundidade, chega a 40°C, causando sérios prejuízos às pupas. A atividade da mosca diminui com ventos de 8 a 10 km/h e elas não conseguem voar com ventos de velocidade acima de 24 km/h (KOUBA, 2004).

Hightower e Alley (1963), empregando armadilhas com fígado, constataram que, nas regiões semi-áridas e sem água corrente, as moscas *C. hominivorax* se agrupavam próximo aos reservatórios de água. Quando havia água corrente, elas se dispersavam até 1,3 a 1,6 km ao longo desta água. A atividade da mosca diminuiu com o tempo quente e seco, aumentando depois das chuvas. As baixas temperaturas de inverno e os períodos secos e quentes foram os dois fatores climáticos mais importantes para a sobrevivência da mosca.

Segundo Linquist (1955), a maioria das larvas que abandona as feridas é destruída por formigas. Em geral, só 5 a 20% chegam à fase adulta, sendo este um dos elementos determinantes do relativamente baixo número de *C. hominivorax* na natureza.

## **2.7 Importância Econômica**

No Continente Americano a estimativa da população animal em 2016 (bovinos, equinos, suínos, ovinos, caprinos) foi de 840 milhões de cabeças; já a estimativa da população humana foi de 873,8 milhões de pessoas em 2017. Neste contexto, o número de animais das espécies mencionadas anteriormente que não sofrem da doença porque estão em países livres de *C. hominivorax* seriam 320,6 milhões de cabeças; já o de seres humanos que não estão em risco seriam 453,3 milhões. Em contraste, no mesmo ano, nos países endêmicos considerando as mesmas espécies de animais domésticos, somavam 519,4 milhões de cabeças e 420,5 milhões de seres humanos suscetíveis à doença (FAO, 2018).

A FAO estima que até o ano de 2050 a população mundial será de 9,6 bilhões. Para satisfazer a demanda de alimentos de produtos de origem animal da população, será necessário aumentar a produção de carne de frango em 170%, produtos lácteos entre 80 e 100%, carne bovina e ovina e carne de porco de 65 a 70% (FAO, 2018).

Os principais danos causados por *C. hominivorax* ao setor pecuário são: morte de animais recém-nascidos, estresse e aumento da mortalidade, diminuição na produção de carne e leite, despesas para a inspeção diária dos animais em busca de feridas, gastos com aplicação de tratamento preventivo ou curativo. Alguns fatores complicadores do parasitismo podem ser vistos em extensas criações ou locais de difícil acesso, como dor e estresse adicional durante o tratamento de feridas, suscetibilidade a outras doenças, danos ao couro, alteração no bem-estar dos animais, despesas com serviços médico veterinários, demonstrando que as repercussões econômicas e sociais são um obstáculo ao comércio internacional de animais, principalmente pelo risco de detecção de resíduos na carne, leite ou no meio ambiente (BARROS; VAZQUEZ, 2004; FAO, 2018).

Utilizando dados coletados por meio de pesquisas e de estudos econômicos realizados no Caribe durante a década de 80, o autor estimou o custo anual com a bicheira em vários países em US \$ 4,82-10,71 por cabeça. Se uma média de 7,76 dólares por animal por ano é tido como o custo, então os custos anuais da bicheira na América do Sul podem chegar a US \$ 3.500.000 milhões (VARGAS-TERÁN; HOFMANN; TWEDDLE, 2005).

Em 2002, Grisi e colaboradores estimaram as perdas econômicas decorrentes do parasitismo por larvas de *C. hominivorax* em aproximadamente 150 milhões de dólares. Em 2014, as perdas econômicas foram reavaliadas e dessa vez, Grisi e colaboradores estimaram um prejuízo anual de aproximadamente 337 milhões de dólares somente em decorrência da infestação de umbigos de bezerros recém-nascidos por larvas de *C. hominivorax*, levando em consideração custos com tratamento e eventuais mortes de animais. Os autores ainda sugerem que as implicações econômicas certamente sejam maiores, mas que são praticamente impossíveis de estimar danos causados pelo parasitismo em animais adultos devido à falta de informações específicas (GRISI et al., 2002, 2014).

O Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil da pecuária chegou a R\$ 400,7 bilhões, 30% do agronegócio brasileiro em 2016. A cadeia produtiva da pecuária do Brasil movimentou mais de R\$ 483,5 bilhões em 2015, registrando um crescimento de mais de 27% sobre o ano anterior.

O Brasil atualmente é líder no “ranking” mundial em produção de bovinos, sendo o maior exportador global de carne bovina, com 9,56 e 1,88 milhões de toneladas produzidas e exportadas, respectivamente, e ainda ocupa a posição de quarto maior produtor mundial de leite, com 23 milhões de vacas ordenhadas e mais de 34 bilhões de litros produzidos em 2015.

Em virtude da baixa qualidade do couro produzido e dos descompassos entre a oferta nacional e a demanda pelo produto, o Brasil deixa de ganhar cerca de US\$ 900 milhões anuais. Aproximadamente 85,0% dos couros produzidos apresentam defeitos e, destes, 60,0% ocorrem dentro das propriedades rurais e 40,0% no transporte da propriedade para o curtume (CABI, 2013).

## 2.8 Miíase

Entende-se por miíase a infestação de órgãos ou tecidos de animais hospedeiros pelos estágios de larva de dípteros, que pelo menos durante certo período, se alimentam de tecido necrótico ou vivo do hospedeiro, de suas substâncias corporais líquidas ou do alimento por ele ingerido. Dessa forma, larvas de moscas que completam seu ciclo, ou pelo menos parte do seu desenvolvimento dentro ou sobre o corpo de um hospedeiro vertebrado podem ser classificadas como causadoras de miíases (NEVES et al., 2011). Existem várias classificações para miíases, conforme sua localização, a biologia da mosca e o tipo de tecido em que ocorre. Quanto ao local de ocorrência, elas podem ser: cutâneas, subcutâneas, cavitárias (nariz, boca, seios paranasais), oculares, anais, vaginais, etc ... (SCHOLL; COLWELL; CEPEDA-PALACIOS, 2019). O termo miíase tem a etimologia: *myie* = moscas; *ase* = doença. Em geral, os hospedeiros são mamíferos, ocasionalmente aves, e menos comumente anfíbios ou répteis.

O parasitismo por larvas de dípteros no homem e nos animais despertaram a atenção de vários cronistas e missionários na América Latina, desde a época da colonização. No século XVI é possível encontrar várias referências à presença de larvas no corpo do homem ou dos animais (GUIMARÃES; PAPAVERO; PRADO, 1983a). Frei Bernardino de Sahagún, que viveu na Nova Espanha (México), de 1529 a 1590, dizia sobre a existência de "vermes que são criados nos braços ou membros de coelhos e ratos"; esses vermes podiam ser vistos “presos dentro da carne e olhos para fora”. Estas larvas, certamente de *Cuterebra*. Frei Bernardino descreve a abertura da ferida onde habita a larva, e seus espiráculos respiratórios, referindo como se “olhassem para fora”. Pedro de asma de Xara y Zejo, em carta de 26 de dezembro de

1568, endereçada ao médico sevilhano Nicolás Monardes, menciona a presença de larvas de dípteros encontradas em feridas, sem dúvida referindo-se a *Cochliomyia*. Gabriel Soares de Souza, descrevendo a Bahia em 1587, foi um dos primeiros a citar as bicheiras por *Cochliomyia* e seu tratamento: extrato de fumo ou petume, e relacionava a ocorrência com pessoas descuidadas (GUIMARÃES; PAPAVERO; PRADO, 1983a).

Atualmente, é considerada uma condição frequente e grave em populações rurais e socioeconomicamente desfavorecidas. No Brasil, está incluída na lista de doenças que requerem notificação mensal de qualquer caso confirmado (MAPA, 2013). No entanto, sua incidência não pode ser estabelecida, porque há subnotificação no diagnóstico, aliado ao fato de que na maioria dos países não é de notificação obrigatória (FAO, 2018).

## 2.9 Controle

Atualmente, os métodos de controle de *C. hominivorax*, no Brasil estão pautados principalmente em produtos químicos com atividade larvicida. Os primeiros e até hoje os mais utilizados comercialmente são os inseticidas que contêm organofosforados, com os pontos negativos de possuírem uma eficácia residual relativamente curta e sem a função de evitar reinfestações (AMOS, 2009).

Dos 59 produtos designados como mata-bicheira licenciados pelo Ministério da Agricultura, 42 têm organofosforados em sua composição (BERGAMO, 2018). Há ainda a evidência de que *C. hominivorax* esteja se tornando resistente aos produtos à base de organofosforados utilizados em seu controle, já que esses produtos não mais impedem que elas venham a fazer nova postura no local tratado, como anteriormente se verificava. Suspeita-se que esses produtos já não têm a função de repelir as moscas (CARVALHO, 2007; CARVALHO; TORRES; AZEREDO-ESPIN, 2006; SILVA; AZEREDO-ESPIN, 2009).

Em estudo investigativo sobre possíveis mutações em populações de *C. hominivorax*, encontrou-se amplamente a mutação do gene W251S da enzima carboxilesterase E3, relacionado com resistência principalmente a dimetil-OP (organofosforado) e recentemente com piretróides. Essa mutação parece conferir à enzima a capacidade de hidrolisar compostos piretróides, além de organofosforados (SILVA, 2009).

Outra abordagem tornou-se disponível no mercado no início da década de 80, as lactonas macrocíclicas, com excelentes propriedades endectocidas e uma ação residual maior (AMOS, 2009). Porém, estudos demonstram resíduos de lactonas macrocíclicas nas carcaças, que variam de acordo com a via de administração, sendo mais persistentes quando administradas por injeção subcutânea, em comparação à aplicação “pour-on”. Dessa forma, períodos de carência mais longos, na faixa de 34 - 45 dias, são necessários para garantir que os resíduos de lactonas macrocíclicas estejam abaixo dos limites máximos aceitáveis após o tratamento injetável.

A ivermectina, moxidectina e eprinomectina, em formulações “pour-on”, têm períodos de carência de 28, 14 e 17 dias, respectivamente. Contudo, a doramectina é muito mais persistente do que outras formulações “pour-on”, e um período de carência de 35 dias é necessário (DANAHER et al., 2006).

Tendo visto as dificuldades existentes, onde uma delas é o efeito amplo e tóxico dos pesticidas desenvolvidos até o momento, que eram direcionados não somente para o parasita alvo, mas também para outros insetos, e também por persistirem no meio ambiente e, algumas vezes, acabarem sendo passados pela cadeia alimentar apresentando perigo para outros organismos, incluindo o homem. (WILLIAMS, 1967).



### 2.9.1. Reguladores de crescimento de insetos: piriproxifen

Devido às dificuldades relacionadas à resistência aos principais produtos larvicidas utilizados, e enquanto a possibilidade da erradicação pela técnica do inseto estéril não é uma realidade no Brasil, outras alternativas para o controle têm representado relevância. Como alternativa mais segura, os IGRs são uma categoria para controle de insetos, constituída por um grupo de componentes que normalmente não matam o parasito alvo diretamente, mas interferem no seu crescimento e desenvolvimento (BERGAMO, 2018).

Designado para descrever uma nova classe de compostos bio-rationais (STAAL, 1975), o termo IGR – insect growth regulator, são compostos químicos à base de plantas levemente alterados ou moléculas produzidas à partir de produtos naturais, com propriedades resultantes bem similares ao composto natural (GRAF, 1993). Da mesma forma, moléculas semelhantes aos químicos baseados em micro-organismos também são consideradas bio-rationais (DEBOUN; FRANCES; STRICKMAN, 2014).

Entretanto, por consequência do aumento da demanda pública por tecnologias mais seguras, e mecanismos de ação mais seletivos, reduzindo os riscos para organismos que não fossem alvo do controle, para o meio ambiente e para os seres humanos, houve o aumento dos esforços na pesquisa por moléculas com diferentes mecanismos de ação, por órgãos-alvo alternativos no inseto e com abordagens totalmente diferentes de controle (OLIVEIRA, 2017). Os reguladores de crescimento de insetos na sua grande maioria, preenchem esses requisitos, pois abordam outros órgãos alvos que não o sistema nervoso central, exibindo uma maior atividade e mostrando um perfil muito mais seguro por agirem, principalmente, no desenvolvimento embrionário larval e ninfal, interferindo na metamorfose e reprodução (GRAF, 1993). Têm como característica marcante não causar a morte do parasito alvo diretamente, mas sim interferir no seu crescimento e desenvolvimento, atuando principalmente nos estágios imaturos (TAYLOR; COOP; WALL, 2010).

Williams (1967), denominou os IGRs como pesticidas de terceira geração. O primeiro efeito dos IGRs e também o mais observado em insetos é uma morfogênese anormal do tegumento, geralmente irreversível. Muitas espécies produzem formas extra larvais, ninfais e pupais em resposta à exposição aos IGR, onde tornam-se gigantes, mas com formas quase perfeitas em uma escala intermediária entre forma imatura e adulta do inseto (GRAF, 1993). Além do mais, o período de maior sensibilidade para inibição da metamorfose é o último estágio larval ou ninfal (e a pupa em holometabólico). E, a intensidade e a caracterização da resposta dependerão da espécie, da escolha do momento da aplicação, da dose, do modo de administração, do tipo de composto (OLIVEIRA, 2017).

O piriproxifen é um IGR cuja atividade imita o hormônio juvenil e tem seu efeito primário no alvo, bloqueando o desenvolvimento do estágio pupa/adulto, embora os efeitos na embriogênese e na reprodução também sejam conhecidos (SHAH et al., 2015). Os mosquitos são altamente sensíveis ao piriproxifen. O controle duradouro de espécies de *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* foi relatado após o tratamento desafiando larvas (SHAH et al., 2015).

O estado de resistência cruzada ao piriproxifen é incerto. Tolerância foi observada em várias cepas resistentes em *Musca domestica*. Nesses testes, algumas moscas selvagens emergiram do meio tratado na dose mais baixa (12 mg/litro). (GEDEN; DEVINE, 2012).

### 2.9.2 Controle pelo programa da técnica do inseto estéril e fatores fundamentais para implementação

Frente a todos esses desafios relacionados ao controle e tratamento, e pela gravidade que esse parasitismo pode gerar nos animais parasitados, tomando proporções de epidemias rapidamente e mortalidade em animais com múltiplas infestações, assim como todos os prejuízos gerados com perdas na produção e gastos com medicamentos, alguns pesquisadores concluíram que reduzir ou eliminar a população de insetos seria uma solução melhor do que tratar topicamente os animais após estes serem infestados pelas larvas, motivando iniciativas envolvendo a esterilização de machos e a implementação de um programa de erradicação através da liberação de insetos estéreis (AMOS, 2009b; BOWMAN, 2006).

Os principais beneficiários diretos da eliminação de *C. hominivorax* são a pecuária e os produtores. No entanto, benefícios diretos e indiretos resultam para a comunidade como um todo, como o aumento da disponibilidade de animais e produtos lácteos produzidos localmente e pelo aumento da disponibilidade de animais. A nível nacional, os benefícios econômicos surgiriam devido a uma melhor integração na agricultura e pecuária. Também consideram-se os benefícios para a saúde pública para a comunidade (FAO, 2018).

Alguns fatores são fundamentais para o sucesso da implementação de um programa baseado na SIT. Dentre eles, a necessidade de baixa densidade populacional previamente à liberação das moscas estéreis no campo (KNIPLING, 1955), fator este fortemente dependente do uso de inseticidas químicos na primeira etapa do programa de controle; e a delimitação de regiões e escalas geográficas adequadas, que podem ser determinadas a partir de estudos sobre a estrutura genética das populações de interesse (BERGAMO, 2018).

A técnica do inseto estéril SIT (da expressão inglesa “Sterile Insect Technique”) foi idealizada por Knipling, em 1937. O objetivo inicial era a liberação de um grande número de machos estéreis no campo durante várias gerações sucessivas, tendo como consequência uma supressão na densidade populacional da mosca da bicheira (KNIPLING, 1955). A liberação de machos esterilizados por radiação gama é a forma de controle mais eficiente (BAUMHOVER et al., 1955; GUIMARÃES; PAPAVERO, 1999). Essa prática só é possível porque as fêmeas de *C. hominivorax* copulam uma só vez durante sua vida (CRYSTAL, 1969), ou seja, toda fêmea que copular com um macho estéril não deixará descendentes.

Estima-se que os benefícios anuais ao produtor com a erradicação da mosca sejam: nos EUA – US\$ 796 milhões; no México - US\$ 292 milhões e na América Central - US\$ 77,9 milhões. Na Líbia, estima-se que a relação benefício/custo foi de 5:1 na zona infestada e de 10:1 em todo o país. Caso fosse erradicada na América do Sul, estima-se que a cada ano US\$ 3.592 milhões poderiam ser economizados (VARGAS-TERÁN; HOFMANN; TWEDDLE, 2005).

Segundo Pontes et al. (2009), o custo pela erradicação da mosca no Brasil custaria R\$10.000.000 ao ano. No Oriente, a erradicação da mosca foi considerada o programa internacional de saúde animal de maior sucesso organizado pelas Nações Unidas. (KOUBA, 2004).

O programa pode fornecer benefícios consideráveis que são difíceis de quantificar economicamente, tanto benefícios ambientais associados ao uso reduzido de produtos químicos e impacto sobre a vida selvagem e, possivelmente, benefícios para a saúde pública. Na América do Sul, com a possível exceção do Chile, não há barreiras naturais conhecidas para impedir a propagação da mosca entre os países. A menos que existam barreiras, para fins de erradicação, toda a América do Sul deve ser considerada como uma região. Uma vez iniciado, o programa teria que ser progressivo até que todo o continente (e, portanto, o Hemisfério Sul) esteja completamente livre da mosca (CABI, 2013).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Manutenção da Colônia de *Cochliomyia hominivorax*

A criação de *C. hominivorax* em laboratório teve início a partir da coleta de larvas de terceiro instar (L3) provenientes de feridas de bovinos infestados naturalmente. Após a coleta, as larvas de terceiro instar foram encaminhadas ao Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) do Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Em seguida, estas foram higienizadas com água corrente, secas com papel absorvente e acondicionadas em caixa plástica com o fundo preenchido por uma grossa camada de vermiculita (com finalidade de mimetizar o solo e facilitar a pupação) e tampa telada para permitir a circulação do ar e acondicionadas em temperatura ambiente até a emergência das moscas adultas.

As moscas começaram a emergir do pupário a partir do 8º dia. Para alimentação das moscas adultas foi oferecido açúcar mascavo petrificado ralado em placa de petri e para garantir a umidade e fonte de água um frasco de plástico com algodão hidrófilo embebido com água filtrada. A troca da dieta e da fonte de água era realizada duas vezes por semana. A manutenção da colônia foi realizada através de estimulações para oviposição de fêmeas adultas, e consequente incubação do material recuperado em câmaras climatizadas do tipo B.O.D. (da expressão inglesa “Biological Oxygen Demand”) na temperatura de  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade  $80 \pm 10\%$  (MASTRANGELO, 2011).

Para estimular a maturação ovariana das fêmeas foi oferecido sangue de bovino (oriundo da sobra do sangue destinado para a manutenção de *Ctenocephalides felis felis* – aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais com número de protocolo 4313110419) com anticoagulante (Solução de CPDA - Dextrose anidra USP 2900 mg, citrato de sódio  $2 \text{ H}_2\text{O}$  2630 mg, ácido cítrico anidro 300 mg, adenina 27,5 mg, fosfato de sódio monobásico  $\text{H}_2\text{O}$  222 mg, água para injetáveis q.s.p. 100 ml). Esse sangue obtido através da coleta em bovinos não tratados com nenhum parasiticida nos últimos 45 dias, utilizando bolsa de transfusão. O sangue (20 ml) era adicionado em um pedaço de algodão com 5 cm de diâmetro, acondicionado em placa de petri de polipropileno (10cm x 10cm x 2cm) e oferecido para as moscas emergidas nas gailoas a partir do 5º dia de vida.

Após completarem a maturação ovariana, fêmeas adultas foram estimuladas a fazer oviposição colocando-se 20 g de carne bovina moída acrescida de 5 mL sangue bovino com anticoagulante alocados em placas de petri de polipropileno (90x15cm) e aquecidos à temperatura de aproximadamente a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $80 \pm 10\%$  de umidade relativa. Tiras de papel filtro (Whatman nº1 80g) eram colocadas na superfície do meio de oviposição para evitar que as poças de sangue ocasionassem, eventualmente, a morte das moscas. Em seguida, foi acondicionado câmaras climatizadas com temperatura em torno de  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $80 \pm 10\%$  de umidade relativa. Após algumas horas o meio foi avaliado quanto a presença de posturas. Os ovos e/ou larvas, quando presentes, foram removidos do substrato com auxílio de colher e colocados diretamente na dieta larval, em recipiente de polipropileno, com tampa telada e armazenados em câmara climatizadas com temperatura a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $80 \pm 10\%$  de umidade relativa (MASTRANGELO; BEZERRA; FERNANDES, 2014).

A formulação da dieta larval foi adaptada de Mastrangelo (2014), de acordo com suas vantagens em comparação a outros tipos de dieta, como o baixo custo, alta viabilidade larval, e por atender às demandas nutricionais das larvas por mais tempo, além de emitir menos odores. Para obter 1 L de dieta larval foram utilizados os seguintes ingredientes: 220 g de sangue bovino, 600 ml de água destilada, 40 g de leite em pó desnatado, 30 g de gel para plantio (Forth Gel<sup>®</sup>), 3 ovos inteiros e 1 ml de formol. Os componentes foram adicionados individualmente até completa homogeneização da mistura com auxílio de um homogeneizador mecânico.

O material incubado em câmaras climatizadas foi observado a cada 24 horas, adicionando maior quantidade de meio larval de acordo com as necessidades das larvas. Após 48 horas de incubação, de acordo com a presença e atividade de L3, o recipiente era acondicionado em outro frasco contendo 4 cm de vermiculita para possibilitar a migração e aprofundamento para consequente evolução para fase de pupa (TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940).

Após quatro dias, o material era recuperado da vermiculita por catação manual com o auxílio de pinça para procedimentos ultrassensíveis. As pupas eram pesadas para quantificação de indivíduos, para cada seis gramas pesados, tinha uma média estimativa de 100 pupas. E posteriormente acondicionadas em gaiolas adaptadas em caixas organizadoras de polipropileno com capacidade para 20 L (com dimensões 32 cm x 22 cm x 26 cm).

### **3.2 Padronização do Estudo *in vitro***

Para padronização do método *in vitro* foram realizados testes em diferentes recipientes com diferentes quantidades de meio larval, utilizando larvas de primeiro estágio (L1) de *C. hominivorax* obtidas da colônia mantida em nosso laboratório, que foram recuperadas diretamente do meio larval com o auxílio de pincel nº 0. Foram preparados oito grupos experimentais, com seis repetições cada, identificadas como R1, R2, R3, R4, R5 e R6.

Grupo 1: 10 L1 incubadas em 10g de meio larval;  
Grupo 2: 20 L1 incubadas em 10g de meio larval;  
Grupo 3: 10 L1 incubadas, em 20g de meio larval;  
Grupo 4: 20 L1 incubadas, em 20g de meio larval;  
Grupo 5: 10 L1 incubadas em 10g de meio larval;  
Grupo 6: 10 L1 incubadas em 20g de meio larval;  
Grupo 7: 20 L1 incubadas em 10g de meio larval;  
Grupo 8: 20 L1 incubadas em 20 g de meio larval.

Nos grupos 1 a 4 as larvas foram incubadas em placas de petri de polipropileno (90 x 15cm) e vedadas nas bordas laterais utilizando massa para modelar. Nos grupos 5 e 6 as larvas foram incubadas em frascos de polipropileno de 145 ml com furo na tampa de aproximadamente 2 cm de diâmetro telado com tecido de poliamida. Nos grupos 7 e 8 as larvas foram incubadas em frasco de polipropileno de 200 ml com furo na tampa de aproximadamente 2 cm de diâmetro telado com tecido poliamida.

Todos os grupos foram mantidos em câmaras climatizadas com temperatura variando a  $35\pm1^{\circ}\text{C}$  e umidade relativa de  $80\pm10\%$  (MASTRANGELO; BEZERRA; FERNANDES, 2014) e observados diariamente por 14 dias. Após a observação de 48 horas foi acrescido 50% do volume final do meio nos potes em que haviam larvas vivas, e os recipientes foram acondicionados dentro de frascos de polipropileno com volume de 500 mL acrescido de 10 gramas de vermiculita onde foi acompanhado o processo de pupação e emergência de moscas adultas.

### **3.2.1 Análise Estatística do Estudo para Padronização do teste *in vitro***

Para análise estatística dos dados utilizou-se o programa estatístico computacional BioStat 5, no qual verificou-se a normalidade dos dados para a recuperação de pupas e de adultos por meio do teste D'Agostino Person. Para avaliar a variância estatística entre as médias de recuperação de pupas e média da recuperação dos adultos, utilizou-se o teste para dados não paramétricos, Kruskal Wallis. Em todas as análises foi considerado o nível de confiança de 95% ( $P \leq 0,05$ ).

### **3.3 Metodologia do estudo *in vitro* desafiando larvas de primeiro instar de *Cochliomyia hominivorax* frente a diferentes concentrações de piriproxifen**

Para a avaliação *in vitro* do piriproxifen sobre o desenvolvimento das larvas de *C. hominivorax* foram preparados 32 frascos de 145 mL de polipropileno, com um orifício de aproximadamente 2 cm de diâmetro recoberto por tecido poliamida. Em cada frasco foi acrescido 20 g de meio larval e, com auxílio de um pincel número zero, 10 larvas de primeiro instar de *C. hominivorax*. O teste foi realizado utilizando um controle negativo: que consistia na incubação das larvas contendo apenas o meio larval; placebo onde as larvas foram incubadas com o diluente utilizado para as preparações das soluções contendo piriproxifen; e as concentrações de piriproxifen (0,05%, 0,15% e 0,45%). Todo o teste foi realizado em sextuplicata (R1, R2, R3, R4, R5 e R6).

Para incorporação das diluições, a dieta larval recém preparada foi encaminhada ao setor de farmacometria do LQEPV/UFRRJ para pesagem em balança analítica, adição das formulações contendo piriproxifen e homogeneização em incubadora shaker (Cienlab – modelo CE720) 250 rpm, a 38°C. Posteriormente, as larvas foram colocadas sobre a dieta larval de cada grupo experimental com o auxílio de pincel nº0. A incubação iniciou com o grupo controle, posteriormente, as larvas foram incubadas no grupo placebo, seguida pelo grupo contendo 0,05% de piriproxifen, grupo 0,15% de piriproxifen e 0,45% de piriproxifen. Todos os frascos foram condicionados em câmaras climatizadas a  $35 \pm 1^\circ \text{C}$  e  $80 \pm 10\%$  de umidade relativa (ELWAER; ELOWNI, 1991; MASTRANGELO; BEZERRA; FERNANDES, 2014).

As observações após a incubação foram realizadas nos seguintes tempos: 30 minutos; 12 h; 24 h e 48 h. Após a observação de 48 horas, adicionou-se 50% (10 g) do volume inicial de meio larval sem adição de piriproxifen em nenhum grupo experimental, para favorecer o desenvolvimento das larvas. Além disso, nesse momento houve também a transferência do frasco inicial de 145 ml para dentro de um frasco de polipropileno de 500 ml, com três orifícios de aproximadamente 2 cm de diâmetro na tampa devidamente telados com tecido de poliamida, com 10 g de vermiculita dispostos no fundo de cada frasco. Para cada repetição, em todos os grupos experimentais, as tampas dos frascos de 145 ml foram retiradas e os frascos transferidos para dentro dos frascos de 500 ml, respectivamente para cada repetição, para permitir a saída das larvas e consequente pupação.

Os conjuntos de frascos de 500 ml juntamente com os frascos que continham as larvas do estudo foram devidamente identificados e acondicionados em câmaras climatizadas. Foram realizadas observações nos dias 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11 e 14 após a incubação para acompanhamento do comportamento do ciclo.

No terceiro dia após a incubação, a temperatura e a umidade relativa da câmara climatizada foram alteradas para  $32 \pm 1^\circ \text{C}$  e  $60 \pm 10\%$ , respectivamente, de acordo com as

necessidades da fase do ciclo biológico em questão (FAO, 1990). A partir do quinto dia após incubação, foi possível retirar o frasco de 145 ml com meio larval de dentro do frasco de 500 ml com 10 g de vermiculita dos grupos que não haviam mais a presença de larvas no meio larval, exceto no grupo com a concentração 0,45% de piriproxifen que ainda haviam larvas ativas. No sétimo dia após incubação, foi realizada a catação e contagem das pupas, com auxílio de pinça entomológica para procedimentos ultrassensíveis. Em seguida, foi realizada a pesagem, em balança analítica, do número total de pupas recuperadas em cada repetição do experimento realizada repetições dos grupos experimentais que haviam pupas. Todos os grupos continuaram sendo observados todos os dias até observação da emergência dos adultos.

A partir do décimo quarto dia as moscas recuperadas nas repetições de cada um dos grupos experimentais foram lavadas com álcool etílico 70%, com auxílio de peneira, secas em papel toalha, pesadas e identificadas em macho ou fêmea e individualmente dispostas alfinetadas em uma caixa entomológica.

### 3.3.1 Análise estatística

Para análise estatística dos dados utilizou-se o programa estatístico computacional BioStat 5, no qual verificou-se a normalidade dos dados para os pesos das pupas por meio do teste D'Agostino Person.

A análise de variância entre as médias de recuperação de pupas, média do peso do pool e peso individual de pupas utilizou-se o teste para dados não paramétricos, Kruskal Wallis. Em todas as análises foi considerado o nível de confiança de 95% ( $P \leq 0,05$ ).

Para os percentuais individuais de evolução de larva até pupa, de pupa até adulto e de larva até adulto, considerando o caso que este universo deve ficar restrito de 0 a 100% e o desvio padrão apresentar valores que levariam a variações fora desse intervalo (0 a 100%), em torno da média para qualquer grupo experimental. Os dados foram submetidos a transformação angular usando  $\text{Arcsen } \sqrt{X}$  onde X seria expresso em %/100, ou seja,  $X \leq 1$ . Posterior a transformação dos dados, estes foram submetidos através de análise de variância seguida do teste LSD.

O nível de eficácia larvicida e adulticida foi calculado baseado na seguinte fórmula:

$$\text{Eficácia (\%)} = \frac{\text{Controle} - \text{Tratado}}{\text{Controle}} \times 100$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Padronização do Estudo *in vitro*

O primeiro passo do estudo foi encontrar um recipiente que abrigasse de forma eficiente as larvas de primeiro estágio recém eclodidas, que pelo fato de serem muito pequenas, bastante enérgicas, terem um comportamento de rastejar, e por possuírem ganchos orais, conseguem se ancorar e fugir da maioria dos recipientes em que são incubadas, modificando o número amostral e, conseqüentemente, interferindo no resultado.

O segundo passo foi ajustar a quantidade de meio larval necessária para o desenvolvimento ótimo do número de larvas. Devido à dificuldade de restrição das larvas dentro dos recipientes, optou-se por não realizar furos para entrada de oxigênio nas placas de petri utilizadas para a incubação das larvas dos grupos 1 a 4.

Nos grupos 5 a 8, incubados em frascos de plástico, observou-se uma boa capacidade de vedação das amostras através da tampa, o que impossibilitou a fuga das larvas. Já o furo na tampa coberto por tecido forneceu uma circulação de ar desejável o que possibilitou um desenvolvimento das larvas incubadas em cada repetição.

Na primeira observação, 24 horas após a incubação das larvas, em todas as repetições do grupo 1 foram visualizadas larvas ativas, exceto na repetição R6 onde visualizou-se apenas uma larva sem motilidade, aparentemente morta. No grupo 2, também foi possível observar larvas ativas em todas as repetições, exceto nas repetições R4, R5 e R6 onde foram quantificadas 4, 6 e 4 larvas, respectivamente, sem motilidade. No grupo 3, foram observadas larvas ativas nas repetições R1, R2, R3, R4 e R5, e larvas sem motilidade nas repetições R2 e R5. Na repetição R6, só foram visualizadas larvas sem motilidade, sendo que 4 foram visualizadas entre a tampa da placa de petri e a massa de modelar. No grupo 4, só foram visualizadas larvas com motilidade nas repetições R1 e R2 e nas repetições R3, R4, R5 e R6 só foram visualizadas larvas sem motilidade, sendo que a maioria foi encontrada entre a tampa da placa de petri e a massa de modelar. No grupo 5, em todas as repetições haviam larvas ativas, e nenhuma foi visualizada sem motilidade. No grupo 6, foram visualizadas larvas ativas em todas as repetições, e, nas repetições R1, R3 e R4 também havia a presença de larvas sem motilidade. No grupo 7, havia a presença de larvas ativas e sem motilidade em todas as repetições. E no grupo 8 também foram visualizadas larvas ativas e sem motilidade em todas as repetições, exceto na repetição R3 que só foram visualizadas larvas ativas.

Na observação dos grupos 24 horas após a incubação das larvas, pôde-se notar que o meio larval presente nas repetições dos grupos incubados em placas de petri (Grupos 1 a 4) escureceu mais rápido em comparação aos outros grupos. Tal fato sugere que a falta de oxigênio tenha acelerado o processo de putrefação dos componentes do meio larval. Também foi possível observar que a umidade do interior da placa de petri, na temperatura necessária para o desenvolvimento larval, favoreceu o derretimento da massa de modelar. Esse fato pode ter sido determinante para algumas larvas terem sido encontradas sem motilidade, aparentemente mortas, entre a tampa da Placa e a massa de modelar. As larvas presentes nas repetições dos grupos com placas de petri contendo 20 g de meio larval (Grupos 3 e 4) foram mais difíceis de serem visualizadas devido ao volume de meio e tamanho das larvas, apesar de já serem L2, estimadas pelo tamanho e tempo de vida.

A observação diária de atividade e motilidade das larvas de cada grupo em cada repetição foi subjetiva, de modo que por mais que não tenhamos encontrado larvas vivas ou

mortas na superfície do meio larval, estas poderiam estar inseridas mais profundamente no meio e impossíveis de serem observadas sem que houvesse a manipulação do meio larval, o que foi descartado pelo perigo de, mesmo que acidentalmente, ao manipular o meio alguma larva fosse morta. Dessa forma, já que não foi possível manusear o meio larval das repetições dos grupos para facilitar a visualização, essa representação pode resultar em dados imprecisos, tendo sido utilizada apenas para ter um acompanhamento estimado do desenvolvimento larval.

Na observação após 48 horas da incubação das larvas, em todas as repetições dos grupos 1, 2, 3 e 4, incubados em placas de petri, foram visualizadas larvas sem motilidade. As tampas das Placas estavam condensadas e estufadas, como se os gases resultantes da putrefação do meio larval no interior da placa tivesse forçado a tampa para fora. Nos grupos 5, 6, 7 e 8 havia presença de larvas ativas em todas as repetições, sendo que nas repetições R3 e R6 do grupo 5, na repetição R1 do grupo 6, nas repetições R2, R4, R5 e R6 do grupo 7 e nas repetições R5 e R6 do grupo 8, também haviam larvas sem motilidade.

A metodologia com a utilização da placa de petri mostrou-se eficaz desafiando larvas frente a inseticidas larvicidas, em que o método de avaliação sejam observações em tempos mais curtos do que 48 horas, como o estudo realizado por Beraldo et al., (2010) e metodologia descrita por Chagas, (2008). E, há de se considerar a utilização da placa de petri desafiando os estágios larvais separadamente, assim, o período de observação mais curto após o desafio, favorece a utilização das mesmas.

Os grupos incubados nas placas de petri continuaram sem a presença de larvas ativas em nenhuma repetição durante observação no 3º dia após a incubação das larvas.

O meio larval presente encontrava-se com aspecto pútrido e visivelmente consumido pelas larvas, se tornando cada vez mais escasso nos grupos incubados com 10 g de meio larval (grupos 5 e 7), e havia a presença de larvas (L3) ativas em todas as repetições. Nos grupos 6 e 8 também havia larvas (L3) ativas em todas as repetições, porém, a quantidade maior de meio larval (20 g) nos frascos dificultou a visualização das mesmas.

No 4º dia após a incubação, havia larvas ativas em todas as repetições dos grupos 5, 6, 7 e 8. Nas repetições R3 e R4 do grupo 5, foram visualizadas 3 pupas formadas em cada repetição. As larvas presentes nas repetições dos grupos 7 e 8 encontravam-se rastejando pela parede do frasco, indicando que a necessidade de migração das larvas do meio larval completar mais uma etapa do ciclo, a pupação. A quantidade de meio larval, já em estado avançando de putrefação, continuou dificultando a visualização das larvas nos grupos contendo 20 g de meio larval, demonstrando que o consumo do meio larval vai diminuindo de acordo com o desenvolvimento da L3, de modo que elas vão cessando a ingestão à medida da necessidade de migrar do local parasitado para iniciar o processo de pupação, e demonstrou, corroborando com a literatura, que o período de maior ingestão de meio larval, assim como na natureza, de tecidos vivos na ferida de um hospedeiro parasitado, é a fase de recém L3 (AMOS, 2009; OLIVEIRA, 1980).

No 5º dia após incubação, no grupo 5 foram quantificadas 5, 4, 7, 5, 6 e 2 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. E ainda foram visualizadas 1, 1 e 5 larvas com motilidade nas repetições R1, R4 e R6. No grupo 6, foram quantificadas 2, 3, 5 e 2 pupas nas repetições R1, R3, R5 e R6, respectivamente. E ainda havia larvas ativas em todas as repetições. No grupo 7, foram encontradas 2, 1, 1 e 4 pupas nas repetições R1, R2, R3 e R4, respectivamente, e também se notou a presença de larvas ativas em todas as repetições. No grupo 8, não foi possível visualizar nenhuma pupa, porém, havia larvas ativas em todas as repetições.

O grupo 5 foi o primeiro a apresentar pupa no 4º dia após incubação nas repetições R3 e R4, com a presença de 3 pupas em cada repetição, demonstrando que 10g de meio larval pode ser suficiente para o desenvolvimento de 10 larvas recém eclodidas até a fase de pré-pupa. O tempo em que ocorreu a metamorfose está de acordo com o esperado dentro do ciclo biológico



da mosca, porém, pode-se suspeitar que a menor oferta de alimento possa ter contribuído para acelerar o processo de desenvolvimento do ciclo, já que o grupo 7, que também continha 10g de meio larval e 20 larvas (L1) incubadas começou a apresentar formação de pupas no 5º dia após a incubação, entretanto, nesse mesmo dia experimental, o grupo 6, onde haviam 20g de meio larval e 10 larvas (L1) incubadas também havia a presença de pupas, o meio larval presente já encontrava-se em estado avançado de putrefação, e a quantidade não consumida pelas larvas dificultava a quantificação exata das mesmas. Em nenhum momento a tampa dos frascos foi aberta, para que não houvesse interferência no ciclo de vida desses insetos.

A observação realizada no grupo 7, foi que mesmo contendo a mesma quantidade de meio larval do grupo 5 (10 g), que foi o primeiro grupo a apresentar pupas, a disposição do meio foi diferente, já que no frasco de 200 ml, o meio larval foi disposto mais espaçado na base, tornando-se mais seco ao passar dos dias.

No 6º dia após a incubação foi possível quantificar mais pupas presentes nas repetições dos grupos. No grupo 5 foram quantificadas 6, 4, 7, 5, 7, 3 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, e ainda haviam 1, 1 e 3 larvas com motilidade nas repetições R1, R4 e R6, respectivamente. No grupo 6 foram quantificadas 5, 8, 9, 4, 5 e 5 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, com presença de larvas ativas nas repetições R4, R5 e R6. No grupo 7, quantificou-se 16, 11, 10, 9, 7 e 7 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente e ainda haviam larvas ativas nas repetições R1, R5 e R6. O grupo 8 permaneceu com a visualização de larvas ativas em todas as repetições.

Os grupos 5 e 6, que foram utilizados frascos de polipropileno de 145 ml, e no grupo 7, que foram utilizados frascos de polipropileno de 200 ml, tiveram uma recuperação mais rápida de pupas em relação ao grupo 8.

No 7º dia após incubação, foi observado que nos grupos 5 e 7, não havia mais larvas ativas no meio larval e foram quantificadas 8, 4, 8, 6, 7 e 7 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, no grupo 5 e 17, 9, 10, 9, 12 e 14 pupas, nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, no grupo 7. No grupo 5 haviam 2 pupas com alteração de tamanho, uma na repetição 1, e outra na repetição 5. No grupo 6 foram quantificadas 5, 8, 9, 6, 5 e 8 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, e ainda havia a presença de larvas ativas, porém com pouca motilidade, nas repetições R4 e R5. E, no grupo 8, a visualização foi apenas de larvas ativas rastejando pela parede do frasco, quantificadas totalizando 8, 9, 13, 13, 11 e 8 larvas (L3) nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. O meio larval encontrou-se em estado de putrefação mais avançado.

No 8º dia após incubação, as moscas começaram a emergir das pupas no grupo 5. Foram quantificadas um total de 8, 4, 8, 6, 7 e 7 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, e 2 moscas vivas em cada repetição R3 e R4. E na repetição 5, uma pupa tinha alteração de tamanho. No grupo 6 foram quantificadas 5, 8, 9, 7, 6 e 8 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo 7 a quantificação foi 17, 9, 10, 9, 12 e 14 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. O grupo 8 permaneceu com larvas ativas em todas as repetições, totalizando 9, 6, 5, 13, 12 e 7 larvas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, e 6, 8, 1 e 1 pupas nas repetições R2, R3, R5 e R6, respectivamente.

No 9º dia após incubação, pôde-se observar que a quantificação das pupas no grupo 5 continuou igual ao dia anterior, porém, houve a presença de mais moscas vivas, totalizando 2, 4, 7, 2 e 2 moscas nas repetições R1, R2, R3, R4 e R5, respectivamente. Da repetição R6 não havia emergido nenhuma mosca. No grupo 6, a quantificação de pupas também foi igual ao do dia anterior, e só havia a presença de 4 moscas vivas na repetição R5. No grupo 7 a quantificação das pupas também permaneceu a mesma do dia anterior, sendo que na repetição 6, das 14 pupas quantificadas. No grupo 8, a quantificação de larvas (L3) com motilidade totalizou 1, 7 e 5 larvas nas repetições R1, R4 e R5, e as pupas totalizaram 12, 12, 15, 4, 8 e 11 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente.

No 10º dia após incubação, haviam 2, 4, 7, 2, 3 e 3 moscas vivas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, do grupo 5, respectivamente. No grupo 6 foram quantificadas moscas vivas nas repetições R3, R5 e R6 apenas, totalizando 3, 2 e 5 moscas em cada repetição, respectivamente. No grupo 7 haviam 3, 2, 3, 4, 2 e 5 moscas vivas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. E no grupo 8 não haviam moscas emergidas em nenhuma repetição, foram quantificadas 13, 12, 15, 14, 14 e 11 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, sendo que na repetição R4 havia uma larva (L3) sem motilidade.

A partir do 11º dia as moscas começaram a morrer no grupo 5, sendo contadas 4, 4, 4, 3, 1 e 6 moscas vivas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6. No grupo 6 haviam 1, 6, 7, 2, 4 e 5 moscas vivas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6. No grupo 7 haviam moscas vivas, totalizando 8, 4, 10, 5, 2 e 5 moscas nas repetições 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. A observação do grupo 8 foi a mesma do dia anterior.

No 12º dia após incubação, haviam 2, 1 e 2 moscas vivas nas repetições R1, R5 e R6, respectivamente, no grupo 5. No grupo 6, haviam 1, 2, 3 e 5, e, 3, 4, 3 e 5 moscas vivas nas repetições 2, 3, 4 e 6, respectivamente. No grupo 7 foram quantificadas 6, 4, 8, 2, 3 e 6 moscas vivas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6.

No 13º dia após incubação, durante observação dos grupos experimentais, notou-se que todas as moscas das repetições do grupo 5 haviam morrido, exceto 1 mosca da repetição R6. Totalizando 5, 4, 7, 4, 4 e 5 moscas mortas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo 6, a maior parte das moscas também foram visualizadas mortas, sendo quantificadas 2, 5, 7, 5 e 4 moscas mortas nas repetições R1, R2, R3, R5 e R6, e, 1, 3 e 1 mosca viva nas repetições R2, R4 e R6, respectivamente. No grupo 7, haviam 2, 2, 3, 1 e 2 moscas vivas nas repetições R1, R2, R3, R5 e R6, respectivamente. Já no grupo 8, as moscas começaram a emergir, totalizando 1, 3, 3, 1 e 1 mosca viva, nas repetições R1, R2, R3, R5 e R6, respectivamente. A repetição 4 permaneceu apenas com 15 pupas, sem a presença de moscas emergidas.

No 14º dia após a incubação, foram observadas apenas moscas mortas nos grupos experimentais. O grupo 5 totalizou com 5, 4, 7, 4, 4 e 6 moscas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. O grupo 6 ficou com 2, 7, 7, 3, 5 e 5 moscas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. O grupo 7 totalizou 9, 6, 10, 6, 5 e 10 moscas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo 8 ainda haviam moscas vivas, não sendo possível quantificar o número exato de moscas emergidas.

A partir do 15º dia após incubação, as observações realizadas nos grupos 5, 6, 7 e 8 permaneceram as mesmas.

No 16º dia após incubação, as observações permaneceram as mesmas nos grupos 5, 6, 7 e 8.

No 17º dia após a incubação foi realizada a última observação dos grupos, já que todas as moscas estavam mortas e pôde-se obter uma quantificação mais segura em relação ao número real de moscas emergidas. Os grupos 5, 6 e 7 permaneceram com o mesmo número de moscas das observações anteriores. O grupo 8 totalizou 7, 9, 10, 6, 7 e 5 moscas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente.

A média percentual de recuperação de pupas foi de 66,6%, 71,6%, 59,1% e 65,8% nos grupos 5, 6, 7 e 8, respectivamente, e a recuperação de adultos a partir das pupas recuperadas foi de 81,7%, 65,6%, 66,5% e 55,9% nos grupos 5, 6, 7 e 8, respectivamente. Os grupos 1, 2, 3 e 4 não tiveram recuperação de pupas, já que todas as larvas de todas as repetições morreram 48 horas após a incubação.

Pode-se observar que, nos grupos 5 e 6, em que foram utilizados frascos de polipropileno de 145 ml e no grupo 7, em que foi utilizado frasco de polipropileno de 200 ml, houve uma recuperação mais rápida de pupas em relação ao grupo 8, que também utilizou o frasco de polipropileno de 200 ml.

O grupo 8 teve o desenvolvimento mais lento em todas as repetições em relação aos outros grupos experimentais, possivelmente pela umidade excessiva devido à quantidade de meio larval presente dentro do frasco que prejudicou a etapa da pupação (THOMAS, 1989; TRAVIS; KNIPLING; BRODY, 1940), já que até o 9º dia após incubação ainda havia larva ativa nas repetições, apesar de terem sido observadas pupas à partir do 8º dia após incubação, ou seja, também de acordo com o ciclo biológico.

As moscas começaram a emergir no grupo 5 a partir do 8º dia, no grupo 6 a partir do 9º dia, no grupo 7 a partir do 10º dia, e no grupo 8 a partir do 13º dia. Sugerindo que os grupos em que foram utilizados os frascos de 145 ml foram mais adaptáveis ao ciclo da mosca, favorecendo o desenvolvimento mais rápido em relação aos grupos em que foram utilizados os frascos de 200 ml, porém, estes também se mostraram eficazes para o acompanhamento do ciclo.

O valor real referente ao total de moscas emergidas em cada repetição de cada grupo experimental foi obtido após a morte de todas as moscas e consequente facilitação da quantificação por permitir uma melhor visualização com a abertura das tampas dos frascos.

Sabe-se que a manutenção do ciclo da mosca até a fase adulta em um único habitat não condiz com o comportamento normal esperado por ela na natureza, já que a larva é biontófaga, ou seja, até completar o desenvolvimento larval, necessita se alimentar de tecido vivo (BRITO et al., 2008; OLIVEIRA, 1980), e dentro dos frascos o meio larval sem ser acrescido ou trocado, vai se tornando pútrido. E sua fase de pupa é realizada no solo, e não no mesmo ambiente em que ocorre o seu desenvolvimento larval., portanto, o valor real de recuperação de pupas não pode ser comparado com uma evolução de desenvolvimento natural. Esse estudo foi realizado para obter informações a respeito do suporte nutricional necessário e quantidade de larvas incubadas necessárias dentro do frasco para se obter um desenvolvimento favorável para a seguinte fase, que é a de pupa. Para em seguida, conseguir utilizar esses resultados para realizar um teste *in vitro*, desafiando as larvas da mosca, acrescentando o inseticida no meio larval e acompanhar o seu desenvolvimento até a fase adulta.

O limiar crítico do teste foi conseguir manter o mesmo número de larvas incubadas nas repetições dentro das Placas de Petri e dos frascos de polipropileno, já que o maior problema nas tentativas ocorridas em ensaios anteriores realizados em nosso laboratório era evitar a fuga das larvas (L1) recém-eclodidas incubadas nas amostras. Portanto, os dois tipos de frascos utilizados nos grupos 5, 6, 7 e 8, foram eficientes na vedação e, consequentemente, eficientes para a reprodução do ciclo de vida do inseto em laboratório.

A diferença no percentual médio de recuperação de pupas e adultos das repetições dos grupos 5, 6, 7 e 8 não foi muito significativa, entretanto, o frasco de 145 ml mostrou-se melhor por ser mais fácil de trabalhar pelo tamanho, pela facilidade de transferência desse para outro frasco caso seja necessário acompanhar a evolução do desenvolvimento larval até a próxima fase da mosca e por ser mais barato quando comparado ao frasco de 200 ml.

Na análise estatística, como pode ser observado na Tabela 1 abaixo, não houve diferença estatística na média de recuperação de pupas e adultos entre grupos 1 a 4, já que todas as larvas morreram a partir do 2º dia de incubação, não havendo recuperação de nenhuma pupa, e consequentemente nenhuma mosca adulta. Entre os grupos 5 a 8, a diferença estatística na recuperação de pupas e adultos também não foi significativa, apesar do grupo 6 ter tido uma melhor recuperação de pupas, e o grupo 5 ter tido uma melhor recuperação de adultos em relação ao número de pupas recuperadas.

**Tabela 1:** Média estatística dos resultados obtidos no teste para padronização *in vitro* para desafiar formas parasitárias da mosca *Cochliomyia hominivorax* e observação da continuidade do seu ciclo.

Grupos	Recuperação de Pupas	Recuperação de Adultos
--------	----------------------	------------------------

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

<sup>a b</sup> - Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

#### 4.2 Atividade *in vitro* do piriproxifen frente a larvas de primeiro instar de *Cochliomyia hominivorax*

A primeira observação foi realizada 30 minutos após a incubação das larvas e nos grupos controle, placebo e no G 0,45% foi possível observar larvas ativas se movimentando no meio larval. Nos grupos G 0,05% e G 0,15% também foi possível observar as larvas ativas, porém, de uma forma diferente, uma vez que muitas apresentavam-se rastejando pela parede do frasco, como se estivessem tentando fugir do meio larval tratado. As repetições onde havia larvas rastejando pela parede do frasco foram, no grupo G 0,05% R1, R2, R3, R4, R5 e R6 com 4, 4, 7, 4, 5 e 5 larvas (L1), respectivamente. E no grupo G 0,15% R1, R2, R3, R4, R5 e R6, com 6, 5, 5, 3, 7 e 2 larvas, respectivamente.

A segunda observação foi realizada 12 horas após a incubação das larvas. Nos grupos controle e placebo, as larvas continuaram ativas, exceto na repetição 6 do grupo controle onde havia uma larva imóvel aparentemente morta na parede do frasco. No grupo G 0,05%, foram observadas 10, 6, 8, 8 e 3 larvas rastejando pela parede do frasco nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo G 0,15% só foram observadas larvas rastejando pela parede do frasco nas repetições R1, R4 e R5, com um total de 3, 2 e 4 larvas respectivamente. No grupo G 0,45% notou-se a presença de larvas rastejando na parede do frasco nas repetições R1, R2, R3, R5 e R6, com 5, 2, 3, 3 e 4 larvas, respectivamente.

Nas 24 horas após a incubação, durante observação dos grupos, pôde-se notar presença de larvas ativas rastejando no meio larval em todas as repetições de todos os grupos. No grupo controle foi identificada uma larva imóvel aparentemente morta na repetição R2, e no grupo placebo uma larva imóvel na repetição R3. Também pôde-se observar presença de larvas ativas rastejando pela parede do frasco em todas as repetições dos grupos tratados nas concentrações G 0,05%, G 0,15% e G 0,45%, exceto nas repetições R1 e R2 do grupo G 0,15% e na repetição R1 do grupo G 0,45%. Foi realizada a quantificação das larvas que aparentemente estavam ‘fugindo’ do meio larval rastejando pela parede do frasco nos grupos tratados, com um total de 3, 4, 8, 3, 6 e 3 larvas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6 do grupo G 0,05% ; 3, 2, 3 e 2 larvas nas repetições R3, R4, R5 e R6 do grupo G 0,15% e 2, 2, 2, 3 e 5 larvas nas repetições R2, R3, R4, R5 e R6 do grupo G 0,45%. Também observou-se no grupo G 0,45% que as larvas de todas as repetições eram menores em comparação as larvas ativas presentes nas repetições dos outros grupos experimentais.

De acordo com as observações realizadas nos frascos após 30 minutos, 12 horas e 24 horas após incubação, o comportamento das larvas rastejando pela parede do frasco nos grupos tratados sugeriu que o produto adicionado ao meio larval ocasionava algum desconforto nas larvas, com consequente tentativa de fuga do meio larval.

Em 48 horas após a incubação, foi possível observar a presença de larvas L3 ativas rastejando pelo meio larval em todas as repetições dos grupos controle. Já no grupo placebo, só não foi possível visualizar larvas ativas na repetição R 6. Não foi possível quantificar as larvas no meio larval, porque seria necessário manipular o meio e, portanto, interferir diretamente na criação larval. No grupo G 0,05%, as larvas continuaram rastejando pela parede do frasco em todas as repetições, e foi possível contar 5, 4, 9, 4, 5 e 3 larvas (L3) em R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente, e nas repetições R4 e R5, foram observadas 2 larvas, uma em cada repetição, um pouco menores em comparação às outras. No grupo G 0,15% não foi possível observar muitas larvas ativas no meio larval porém, pelo tamanho que se encontravam, supostamente eram L3, exceto na repetição R3 que elas apresentavam-se um pouco menores, mas não houve a confirmação do estágio através da visualização dos espiráculos respiratórios para que a manipulação não interferisse no desenvolvimento das larvas que estavam vivas. No grupo G 0,45% foram visualizadas poucas larvas ativas nas repetições R1, R2, R3 e R4, e todas as larvas apresentavam tamanho reduzido, e as repetições R5 e R6 continuaram sem a visualização de larvas ativas.

Na observação realizada 48 horas após a incubação, foi possível notar nos grupos controle e placebo que as larvas estavam atendendo às expectativas conforme o ciclo biológico da mosca. Em todas as outras repetições desses dois grupos havia a presença de L3 ativas. Já no grupo G 0,45% todas as larvas visualizadas nas repetições R1, R2, R3 e R4 apresentavam o tamanho reduzido. As larvas menores não foram identificadas em relação ao estágio larval para que a manipulação não influenciasse negativamente no seu desenvolvimento (FARKAS et al., 2005).

O tamanho reduzido das larvas pôde ser observado no grupo G 0,45% em todas as repetições em que foram visualizadas larvas. Portanto, sugere-se que nessa concentração de piriproxifen, o desenvolvimento é de alguma forma atrasado, isso corrobora com o que se espera utilizando-se um IGR do grupo do piriproxifen, que é análogo do hormônio juvenil, que pode prolongar a metamorfose pra fase de pupa (GRAF, 1993).

O piriproxifen foi mais eficaz na inibição da emergência de adultos do que na prevenção da formação de pupas, corroborando com os achados de Liu et al., 2012, em estudo com *Musca domestica*, pois apesar de serem de famílias diferentes, mostraram o mesmo efeito quando desafiados. Os estudos anteriores de Bull & Meola (1993, 1994) não diferenciaram os efeitos sobre a pupação e a emergência de moscas do chifre quando o esterco tratado com piriproxifen foi testado em busca de uma redução da emergência de adultos, o que também foi observado por Oliveira, 2017, que descreveu o efeito de piriproxifen sobre *Haematobia irritans* desafiando ovos incubados em fezes com o inseticida, onde comprovou o efeito pupicida também sobre *Haematobia irritans*.

No 3º dia após a incubação, os frascos foram observados a fim de constatar a presença das larvas na vermiculita. Em todas as repetições de todos os grupos foi possível visualizar a movimentação de L3 na vermiculita, exceto nas repetições do grupo G 0,45%. No 4º dia após a incubação, foi possível visualizar a presença de larvas ativas na vermiculita em todas as repetições. No grupo placebo pôde-se observar larvas ativas em todas as repetições, exceto nas R5 e R6. No grupo G 0,05% foi constatado a presença de larvas ativas na vermiculita em todas as repetições. Já no grupo G 0,15% só não houve a observação da presença de larvas na repetição R3. E, no grupo G 0,45%, nenhuma larva foi visualizada na vermiculita em nenhuma repetição e a mesma observação se repetiu no 4º dia após a incubação.

No 5º dia após incubação, durante observação dos grupos experimentais, houve a necessidade de retirada dos frascos de 145 ml de dentro dos frascos contendo vermiculita de alguns grupos. No grupo controle, na repetição R1, nenhuma larva foi observada no meio larval, algumas foram visualizadas rastejando sob a vermiculita e foi possível visualizar 2 pupas. Na repetição R2, houve a observação de larvas ativas na vermiculita. Na repetição R3, 1 larva

morta foi encontrada no meio larval, e larvas ativas estavam presentes na vermiculita. Já na repetição R4, foi possível observar a presença de 5 pupas e algumas larvas ativas na vermiculita. Nas repetições R5 e R6, nenhuma larva foi encontrada no meio larval, mas houve a presença de larvas ativas na vermiculita. Em todas as repetições do grupo controle foi possível realizar a retirada do frasco contendo o meio larval, já em estado de putrefação deixando somente o frasco com a vermiculita. No grupo placebo, as larvas foram visualizadas ativas na vermiculita e nenhuma foi visualizada no meio larval na repetição R1. Na repetição R2, também foi possível observar o mesmo comportamento, porém, já havia a presença de 1 pupa na vermiculita. Na repetição R3, foi encontrada uma larva morta no meio larval, 3 pupas e larvas ativas foram observadas na vermiculita. Na repetição R4, havia a presença de 7 pupas e foi possível contar 2 larvas L3 presentes na vermiculita. Nas repetições R5 e R6, larvas L3 foram visualizadas ativas na vermiculita, e nenhuma foi encontrada no meio larval de ambas, portanto, em todas as repetições do grupo placebo, foi possível retirar o frasco de 145 ml contendo o meio larval já putrefeito de dentro do frasco com vermiculita. Já no grupo G 0,05% nas repetições R1 e R4, uma larva foi encontrada morta no meio larval em cada repetição, e larvas foram visualizadas ativas na vermiculita nas duas repetições. Já nas repetições R2, R3, R5 e R6, larvas L3 foram visualizadas na vermiculita rastejando, e nenhuma foi observada no meio larval, porém na repetição R6, foi possível observar a presença de 1 pupa. No grupo G 0,15%, nas repetições R1, R2, R3, R5 e R6 nenhuma larva foi encontrada ativa no meio larval, porém, foram observadas ativas na vermiculita. Na repetição R4, as larvas também foram observadas ativas na vermiculita, porém, foi achada 1 larva morta no meio larval. De acordo com a observação realizada, foi permitido retirar o frasco contendo o meio larval de dentro do frasco com vermiculita. No G 0,45% os frascos de 145 ml contendo o meio larval foram mantidos dentro do frasco com vermiculita por apresentarem larvas L3 ativas, e nenhuma larva foi visualizada na vermiculita, em todas as repetições. Apenas na repetição R4 foi encontrada uma larva morta de menor tamanho no meio larval.

No 5º dia após a incubação foi possível observar que o desenvolvimento larval para posterior fase de pupa continuou mais lento em todas as repetições do grupo G 0,45% quando comparado com o desenvolvimento larval dos outros grupos experimentais, porém, ainda estava dentro do período de tempo de acordo com o desenvolvimento larval segundo a literatura, apesar da minoria das larvas permanecerem na ferida após o 4º dia (THOMAS; MANGAN, 1989).

A observação e quantificação das pupas presentes na vermiculita, nos dias anteriores ao da catação, foi dificultada pelo substrato (vermiculita) presente ser semelhante às pupas.

No 6º dia de observação, no grupo controle foram visualizadas na vermiculita 4, 2, 3 e 4 pupas nas repetições R1, R4, R5 e R6, respectivamente, sendo que na repetição R4, havia 1 larva ativa presente na vermiculita. Nas repetições R2 e R3 não foram visualizadas pupas e larvas na vermiculita. No grupo placebo, foram observadas 3, 7, 3, 7 e 1 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4 e R6. Na repetição R5 foram observadas apenas larvas na vermiculita. No grupo G 0,05% foi possível quantificar as pupas presentes nas repetições R2, R3, R4, R5 e R6, com 3, 1, 2, 3 e 1 pupa, respectivamente, sendo que nas repetições R2, R3 e R4 ainda havia 1 larva ativa na vermiculita em cada repetição. Na repetição R1 não foram visualizadas larvas e nem pupa na vermiculita. No grupo G 0,15% foram quantificadas 1, 1, 2, 1 e 1 pupas nas repetições R1, R2, R4, R5 e R6, respectivamente, e haviam larvas ativas na vermiculita nas repetições R1, R3, R5 e R6, com 1, 3, 1 e 2 larvas, respectivamente. No grupo G 0,45%, as larvas foram visualizadas e quantificadas na vermiculita nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, com 2, 3, 2, 3, 4 e 1 larva respectivamente, e ainda havia presença de larvas ativas no meio larval em todas as repetições. Essa quantificação das larvas vivas na vermiculita foi subjetiva, já que não era favorável manipular o meio e interferir no desenvolvimento.

No 7º dia após a incubação, foi possível realizar a catação e pesagem das pupas presentes nos grupos experimentais. No grupo controle foram recuperadas 7, 4, 3, 9, 8 e 8 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo placebo, a recuperação foi de 9, 10, 8, 10, 9, 1 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo G 0,05% foram recuperadas e quantificadas 8, 7, 8, 5, 6, 7 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. A maior parte das pupas apresentaram-se de tamanho reduzido, não preservando o seu tamanho e formato natural. Somente na repetição R4, apenas uma pupa apresentava-se de tamanho e aspecto aparentemente normais. No grupo G 0,15% foram recuperadas 9, 9, 9, 8, 9 e 8 pupas nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. Todas as pupas apresentavam anormalidades de tamanho, rugosidade e coloração. O grupo G 0,45% continuou apresentando atraso no desenvolvimento em comparação aos outros grupos experimentais, em todas as repetições. Ainda haviam larvas ativas no meio larval em todas as repetições. Visivelmente o produto adicionado ao meio larval interferiu na metamorfose do inseto, tendo ação observada já na menor concentração testada, concordando com a literatura que explica o comportamento de formas extra larvais e metamorfose utilizando-se análogos do hormônio juvenil dos insetos (GRAF, 1993; LIU et al., 2012; OLIVEIRA, 2017).

Após a observação realizada no 7º dia após a incubação, já pôde ser realizada a catação e pesagem das pupas de todos os grupos, exceto no grupo G 0,45%. No grupo controle, na repetição R1, foram recuperadas 7 pupas que foram pesadas em conjunto em balança de alta precisão e totalizaram 0,3089 g. Nas repetições R2, R3, R4, R5 e R6, foram pesadas 4, 6, 9, 8 e 8 pupas, cada repetição pesando 0,0957 g, 0,2149 g, 0,3526 g, 0,2759 g e 0,3104 g, respectivamente. O grupo placebo teve uma recuperação de 9, 10, 8, 10, 9 e 1 pupas com peso total de 0,1729 g, 0,4431 g, 0,3119 g, 0,4550 g, 0,2517 g e 0,0176 g nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo tratado com a menor concentração de piriproxifen, 0,05%, a recuperação foi de 8, 7, 8, 5, 6 e 7 pupas com peso 0,1284 g, 0,1088 g, 0,1362 g, 0,0912 g, 0,1021 g e 0,1590 g nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo G 0,15%, a recuperação foi de 9, 9, 9, 8, 9 e 8 pupas, com peso total de 0,1660 g, 0,1638 g, 0,1484 g, 0,1728 g, 0,1375 g e 0,1518 nos grupos R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. No grupo G 0,45% não foi realizada a pesagem nesse dia experimental, por ainda haver larva ativa no meio larval durante observação, sendo estas quantificadas 3, 2, 1, 1, 1 e 2 larvas no meio larval, nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente. Havia larvas ativas na vermiculita, sendo quantificadas, 2, 3 e 1 larvas nas repetições R1, R2 e R3, respectivamente. E as pupas quantificadas somaram 1, 3, 3, 3, 4 e 1 pupas, nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente.

No 8º e 9º dia o grupo G 0,45% continuou com a presença de larvas ativas no meio larval, inviabilizando a pesagem em grupo das repetições. Nos outros grupos experimentais ainda não havia a presença de moscas emergidas em nenhuma repetição.

No 8º e 9º dia após incubação, o grupo G 0,45% continuou com a presença de larvas ativas no meio larval, não sendo realizada ainda a pesagem em grupo das repetições. Nos outros grupos experimentais ainda não havia a presença de moscas emergidas em nenhuma repetição.

A partir da observação do 10º dia, as moscas emergidas começaram a ser vistas nos frascos das repetições R1, R4 e R5, com 5, 6 e 6 moscas, respectivamente, no grupo controle. E no grupo placebo, 1, 6, 2 e 9 moscas nas repetições R1, R2, R3 e R4, respectivamente. As repetições R3 e R6 do grupo controle, e R5 e R6 do grupo placebo permaneceram sem emergência de adultos. Nos grupos G 0,05% e G 0,15%, não havia nenhuma mosca emergida em nenhuma repetição. E, no grupo G 0,45%, nas repetições R1 e R2, foram recuperadas 4 e 9 pupas, respectivamente, sendo que ainda haviam três larvas ativas no meio larval que já se encontravam em estado de putrefação na repetição R1. Nas repetições R3 e R5, foram recuperadas apenas uma pupa aparentemente normal de dentro de cada frasco com meio larval que foram adicionadas às outras pupas recuperadas, totalizando 5 e 6 pupas, respectivamente.

em cada repetição. Na repetição R4 foram recuperadas quatro pupas na vermiculita, e ainda havia a presença de uma larva ativa. Já na repetição R6, foram recuperadas apenas duas pupas, e uma larva foi encontrada no canto do frasco, aparentemente em estado de pré-pupa. Essa larva foi pega com auxílio de pinça para procedimentos ultrassensíveis, e a mesma encontrava-se friável, aderida à parede do frasco, danificando sua estrutura durante a manipulação.

A partir do 10º dia após incubação, as moscas começaram a emergir nos grupos controle e placebo, de acordo com o ciclo biológico natural da mosca (CABI, 2013; FAO, 1990; MASTRANGELO, 2011; OLIVEIRA, 1980). As repetições R3 e R6 do grupo controle, e R5 e R6 do grupo placebo permaneceram sem emergência de adultos. As alterações morfológicas foram visualizadas em apenas três pupas da repetição R3 do grupo controle e em duas pupas da repetição R5 do grupo placebo, onde estas apresentavam-se de tamanho reduzido e aspecto anormal na coloração e rugosidade, entretanto, não houve explicação para a não emergência de adultos nas outras pupas morfológicamente normais presentes nas repetições, porém, sabe-se que nem toda larva que consegue chegar a fase de pupa, emerge para a forma adulta na natureza, sendo considerado um fato biologicamente normal.

As moscas emergidas dos grupos controle e placebo começaram a morrer a partir do 11º dia após a incubação, já que não havia fonte de alimento e nem água dentro do frasco. E totalizaram 5, 2, 6 e 5 moscas nas repetições R1, R2, R4 e R5, respectivamente, no grupo controle, e 1, 7, 2, 9, 9 e 1 moscas nas repetições R1, R2, R3, R4 e R6, respectivamente no grupo placebo. Já o grupo G 0,45% pôde ser pesado nesse momento, totalizando 4, 9, 5, 4, 6 e 2 pupas, com 0,0457 g, 0,0808g, 0,0720 g, 0,0418 g, 0,0721 g e 0,0303 g nas repetições R1, R2, R3, R4, R5 e R6, respectivamente.

As moscas emergidas dos grupos controle e placebo começaram a morrer a partir do 11º dia após a incubação, já que não havia fonte de alimento e nem água dentro do frasco. Já o grupo G 0,45% de piriproxifen pode ter suas pupas pesadas, e verificou-se diferença significativa em relação ao peso comparado aos grupos controle e placebo, sugerindo que o produto testado demonstrou ação efetiva nessa fase do ciclo da mosca.

Até o 14º dia após incubação, não foi observada nenhuma mosca emergida em nenhuma repetição de nenhum dos grupos tratados com piriproxifen. As moscas presentes nas repetições dos grupos controle e placebo, já mortas, foram pesadas e identificadas como macho ou fêmea individualmente após a lavagem. No grupo controle, a repetição R1 teve um total de cinco moscas emergidas, sendo três fêmeas e dois machos. O peso das fêmeas variou entre 0,0068 g, 0,0129 g e 0,0122 g. E o peso dos machos 0,0088 g e 0,0098 g. Na repetição R2 haviam duas fêmeas, com peso 0,0061 g e 0,0063 g. Na repetição R4, foram recuperadas seis moscas, sendo três fêmeas e três machos. As fêmeas pesando 0,0093 g, 0,0083 g e 0,0096 g, e os machos 0,0099 g, 0,0087 g e 0,0095 g. Já na repetição R5, foram recuperadas seis moscas, duas fêmeas pesando 0,0062 g e 0,0054 g e quatro machos pesando 0,0076 g, 0,0047 g, 0,0075 g e 0,0104 g. No grupo placebo, a repetição R1 teve apenas uma mosca, fêmea, com peso 0,0062 g. Na repetição R2 foram recuperadas sete moscas, quatro fêmeas pesando 0,0054 g, 0,0098 g, 0,0085 g e 0,0087 g, e três machos pesando 0,0141 g, 0,0062 g e 0,0113 g. Na repetição R3 foram recuperadas duas moscas, uma fêmea pesando 0,0079 g e um macho pesando 0,0094 g. Já na repetição R4 foram recuperadas nove moscas, sendo cinco fêmeas pesando 0,0102 g, 0,0060 g, 0,0073 g, 0,0070 g e 0,0085 g, e quatro machos pesando 0,0112 g, 0,0106 g, 0,0077 g e 0,0108 g.

Das 38 moscas emergidas no total dos grupos controle e placebo, 55,2% foram fêmeas e 44,8% machos. Esses valores mostram-se de acordo com o achado na literatura (ANZIANI et al., 2000; THOMAS, 1993).

O piriproxifen mostrou-se eficaz inibindo a emergência de 100% da emergência de adultos, corroborando com os resultados já descritos na espécie *Haematobia irritans*



(OLIVEIRA, 2017), e também em *Musca domestica* (GEDEN; DEVINE, 2012) quando criadas em meio contendo piriproxifen.

Apesar da ação larvicida para *C. hominivorax* ter sido insignificante nas concentrações utilizadas, o comportamento demonstrado pelas larvas se locomovendo pela parede do frasco, pode indicar que supostamente *in vivo* as larvas tentariam fugir da ferida, sugerindo ação também na fase parasitária da mosca.

O piriproxifen foi recentemente administrado por via oral em bovinos onde comprovou-se ser excretado através das fezes. Porém, de acordo com as doses administradas em bovinos em estudo realizado por Oliveira, 2017 para o controle de *H. irritans* essa molécula não atingiu concentrações plasmáticas detectáveis em animais tratados. Portanto, em se falando de *C. hominivorax* a forma mais eficaz para atingi-la utilizando esse tipo de inseticida não seria a forma oral e sim a forma tópica em uma formulação em sprays (BIALE; GEDEN; CHIEL, 2017), já que sua absorção sistêmica em bovinos ainda não pode ser comprovada nas doses anteriormente utilizadas. Dessa forma, por mais que a eficácia de piriproxifen *in vitro* no controle de *C. hominivorax* tenha sido comprovada de forma excelente neste estudo, outros estudos para comprovar os efeitos em diferentes doses de piriproxifen são necessários assim como estudos para escolha da melhor forma de aplicá-lo no hospedeiro parasitado por larvas de *C. hominivorax*. Os resultados do estudo estão resumidos na tabela 2.

**Tabela 2:** Média estatística dos resultados obtidos no teste *in vitro* com diferentes concentrações de piriproxifen desafiando larvas de primeiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* e observação da continuidade do seu ciclo.

	Grupos				
	Controle	Placebo	G 0.05%	G 0.15%	G 0.45%
Porcentagem de pupas recuperadas	65,00 ± 22,17	78,33 ± 24,09 <sup>a</sup>	68,33 ± 22,67 <sup>a</sup>	86,67 ± 7,45 <sup>a</sup>	50 ± 8,98 <sup>a</sup>
Eficácia larvicida	---	---	12.77	0	36.17
Peso do pool de pupas	0,2597 ± 0,0844	0,2754 ± 0,0864 <sup>a</sup>	0,1210 ± 0,0887 <sup>a</sup>	0,1567 ± 0,0811 <sup>a</sup>	0,0571 ± 0,0972 <sup>b</sup>
Peso individual das pupas	0,0420 ± 0,0146	0,0323 ± 0,0113 <sup>a</sup>	0,0178 ± 0,0024 <sup>b</sup>	0,0182 ± 0,0020 <sup>ab</sup>	0,0121 ± 0,0021 <sup>c</sup>
Porcentagem de adultos a partir das pupas	41,77 ± 30,24	32,69 ± 34,97 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Porcentagem de adultos a partir das larvas	30,00 ± 24,49	31,67 ± 35,32 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
Eficácia adulticida	---	---	100	100	100

<sup>abc</sup>- Letras minúsculas iguais entre médias da mesma coluna não diferem significativamente entre si (p>0,05).

## 5 CONCLUSÕES

- Foi possível padrinizar uma metodologia *in vitro* para desafiar formas imaturas da mosca *C. hominivorax* e reproduzir o seu desenvolvimento até sua forma adulta;
- Os frascos de polipropileno de 145 e 200 ml utilizados foram eficazes para a criação *in vitro* e a tampa com furos foi eficiente para a vedação e respiração das amostras. Estatisticamente não houve diferença significativa na recuperação de pupas e de adultos entre os grupos 5 a 8 no teste de padronização.
- Piriproxifen não demonstrou ação larvicida nas concentrações testadas.
- Houve um desenvolvimento larval significativamente mais lento nas repetições do grupo com concentração 0,45% de piriproxifen em comparação aos grupos controle e placebo
- Piriproxifen demonstrou ação pupicida, inibindo a emergência de adultos em 100% das repetições em todas as concentrações testadas mostrando-se eficaz no controle das formas imaturas de *C. hominivorax*;

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os riscos e prejuízos gerados pelo parasitismo das formas larvais da mosca *C. hominivorax* colocam a comunidade científica e organizações mundiais em busca de novas maneiras de prevenir, controlar, ou até mesmo erradicar esse parasito. Atualmente, o controle mais eficaz vem sendo realizado com sprays contendo organofosforados que podem ser tóxicos para quem os aplica, para o meio ambiente e para os animais a serem tratados.

Dessa forma, em busca de novos métodos mais seguros, eficazes e práticos, Piriproxifen desponta com tais características que nos permitiria investir em um produto contendo esta molécula, uma vez que neste primeiro estudo mostrou-se eficaz agindo como pupicida, não permitindo a emergência de adultos. Apesar de não ter tido ação larvicida nas concentrações utilizadas, o comportamento demonstrado pelas larvas rastejando pela parede do frasco, pode indicar que supostamente *in vivo* as larvas tentariam fugir da ferida, agindo na fase parasitária da mosca.

Mais estudos devem ser conduzidos com outras concentrações de piriproxifen borrifados diretamente sobre as larvas de *C. hominivorax*, na tentativa de eliminar a larva logo no seu primeiro estágio larval afim de minimizar os prejuízos causados pelo seu parasitismo. Dessa forma, seria interessante também administrar piriproxifen em cada fase larval de forma tópica para observarmos a eficácia do tratamento fase a fase do parasito na tentativa de eliminar a larva, de preferência de primeiro estágio e, dessa maneira, tornar o controle desse parasito mais efetivo e seguro.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. **Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório Anual-2018**. versão *online*. Disponível em: [www.abiec.com.br](http://www.abiec.com.br). Acesso em: 03 jan. 2019.
- AMOS, Carlos André de Almeida. Atividade terapêutica do spinosad contra larvas de *Cochliomyia hominivorax* (L1, L2 e L3) em bovinos infestados natural e artificialmente. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Paulo, 2009.
- ANZIANI, O. S.; FLORES, S.G.; MOLTECO, H.; DEROZIER, C.; GUGLIELMONE, A. A.; ZIMMERMANN, G.A.; WANKER, O. Persistent activity of doramectin and ivermectin in the prevention of cutaneous myiasis in cattle experimentally infested with *Cochliomyia hominivorax*. **Veterinary Parasitology**, v. 87, n. 2–3, p. 243–247, 2000.
- BARROS, A. T. M.; VAZQUEZ, S. A. S. Comunicado Técnico - Recomendações para a prevenção e controle de bicheiras em bezerros no Pantanal. **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 35, p. 1–4, 2004.
- BERALDO, M. D. C. D.; OLIVEIRA, M. C. S.; CHAGAS, A. C. S.; FORIM, M. R.; GIGLIOTI, R.; BOSCHINI, L.; BRITO, L. G. Avaliação *in vitro* da ação de extratos vegetais contra larvas de terceiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*. Embrapa Pecuária Sudeste E Embrapa Instrumentação Agropecuária, p. 48, ago. 2010. Trabalho apresentado nos Anais da II Jornada Científica - Embrapa São Carlos, 2010, [São Carlos, SP].
- BERGAMO, Luana Walravens. **Genômica populacional da mosca-da-bicheira cochliomyia hominivorax (diptera : calliphoridae ) population genomics of the new world screwworm fly cochliomyia hominivorax genômica populacional da mosca-da-bicheira**. 2018. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2018.
- BIALE, H.; GEDEN, C. J.; CHIEL, E. Effects of pyriproxyfen on wild populations of the housefly, *Musca domestica*, and compatibility with its principal parasitoids. **Pest Management Science**, v. 73, n. 12, p. 2456–2464, 2017.
- BORJA, G. E. M. Erradicação ou manejo integrado das miíases neotropicais das Américas? **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 23, n. 32, p. 131–138, 2003.
- BOWEN, F. L. et al. Long-lasting prevention against blowfly strike using the insect growth regulator dicyclanil. **Australian Veterinary Journal**, v. 77, n. 7, p.454-460, 1999.
- BOWMAN, DWIGHT. D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8. ed. Brasil: Manole. 2006.
- BRITO, L G.; OLIVEIRA, M. C. S.; GIGLIOTI, R.; BARBIERI, F. S.; NETTO, F. G. S.; CHAGAS, A. C. S.; CELESTINO, O. O. Manual de identificação, importância e manutenção de colônias estoque de dípteras de interesse veterinário em. In: **Empresa Brasileira de Pesquisa Veterinária**. 2008, Porto Velho. Rondônia: EMBRAPA, 2008.
- BUSHLAND, R. C.; HOPKINS, D. E. Experiments with Screw-Worm Flies Sterilized by X-Rays1. **Journal of Economic Entomology**, v. 44, n. 5, p. 725–731, 2015.

- CABI. In: Invasive Species Compendium. **CABI Publishing**, Wallingford, UK. 2013.
- CARVALHO, C. J. B. DE; RIBEIRO, P. B. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 173, n. 1996, p. 169–173, 2000.
- CARVALHO, R. A. de. **Isolamento e caracterização do gene da esterase relacionado à resistência a inseticidas organofosforados na mosca praga da pecuária *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae)**. 2007. Dissertação (Mestre em Biologia e Genética Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.
- CARVALHO, R. A. DE; TORRES, T. T.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. DE. A survey of mutations in the *Cochliomyia hominivorax* (Diptera : Calliphoridae) esterase E3 gene associated with organophosphate resistance and the molecular identification of mutant alleles. **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 344–351, 2006.
- CHAGAS, A. C. DE S. Metodologias in vitro para avaliação de fitoterápicos sobre parasitas e resultados de testes a campo. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. 2008, São Carlos, São Paulo: EMBRAPA, 2008.
- CHEN, H. et al. Artificial diets used in mass production of the New World screwworm , *Cochliomyia hominivorax*. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, p. 708–714, 2014.
- CRYSTAL, M. M. Sexual Sterilization of Screw-Worm Flies : Reliability of the Chemosterilant Technique. **Entomology Research Division**, n. compound I, p. 136–139, 1969.
- DEAR, J. P. A revision of the New World *Chrysomyini* (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 3, n. 3, p. 109–169, 1985.
- DEBOUN, M.; FRANCES, S. P.; STRICKMAN, D. **Insect Reppellents Handbook**. Segunda ed. [s.l.] CRC Press, 2014.
- DELGADO, A.; HENNESSEY, M.; HSI, D. Investigation into Introduction of New World Screwworm into Florida Keys. **Departamento de Agricultura dos Estados Unidos**, p. 1-16, 2016.
- 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.
- ELWAER, O. R.; ELOWNI, E. E. Studies on the screwworm fly *Cochliomyia hominivorax* in Lybia: effect of the temperature on pupation and eclosion. **Parasitology Research**, v. 77, p. 48–49, 1991.
- 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. Hoja de Ruta para la Supresión y Erradicación Progresiva del Gusano Barrenador del Ganado *Cochliomyia hominivorax* en las Zonas Endémicas del Continente Americano. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Panamá, p. 1–77, 2018.
- FARKAS, R.; HELL, E.; HALL, M. J. R.; GYURKOVSKY, M. *In vitro* rearing of the screwworm fly *Wohlfahrtia magnifica*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19, p. 22–26, 2005.
- GEDEN, C. J.; DEVINE, G. J. Pyriproxyfen and House Flies (Diptera: Muscidae): Effects of Direct Exposure and Autodissemination to Larval Habitats. **Journal of Medical Entomology**,

v. 49, n. 3, p. 606–613, 2012.

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

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.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 11–10, 2002.

GRISI, L. et al. Reassessment of the frascorial economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.

GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N.; PRADO, A. P. As miiases na Regiao Neotropical (identificacao, biologia, bibliografia). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 4, p. 239–416, 1983a.

GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N.; PRADO, A. P. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 4, p. 239–416, 1983b.

HILL, R. W.; WYSE, G. A.; ANDERSON, M. **Fisiologia Animal**. 2 ed. Arted Editora, 2012.

KNIPLING, E. F. Atomic Radiation for Insect Control. n. August, p. 459–462, 1955.

KOUBA, V. History of the screwworm (*Cochliomyia hominivorax*) eradication in the Eastern Hemisphere. • **Historia Medicinae Veterinariae**, v. 29, n. 3, p. 43–53, 2004.

LIU, S. S. et al. Effects of pyriproxyfen and buprofezin on immature development and reproduction in the stable fly. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 4, p. 379–385, 2012.

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, Thiago de Araújo. **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.

LOPES, Alberto Moura Mendes. **Caracterização do gene codificante da subunidade  $\alpha$  do canal de cloreto ( $gluc\alpha$ ) possivelmente associado à resistência às lactonas macrocíclicas em *Cochliomyia hominivorax* (diptera: calliphoridae)**. 2013. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2013.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 12. ed. São Paulo: Editora Atheneu. 2011.

BOWMAN, DWIGHT. D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8. ed. Brasil: Manole. 2006

OLIVEIRA, Carlos Marcos Barcellos de. **Biologia, flutuação populacional e patologia da *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae)**. 1980. Tese

(Doutorado em Ciências) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1980.

OLIVEIRA, Gabriela Ferreira de. **Avaliação do frascional de piriproxifen administrado por via oral no controle das formas imaturas de *haematobia irritans* em fezes de bovinos.** 2017. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

OLIVEIRA, MC de S. et al. Efeito do óleo de *Eucalyptus staigeriana* sobre l3 de *Cochliomyia hominivorax*: desenvolvimento de metodologia in vitro para avaliação de extratos de plantas. **Embrapa Pecuária Sudeste - Resumo em anais de congresso.** In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Seminário de Parasitologia Veterinária dos países do Mercosul, Curitiba, 2008.

OLIVEIRA, MC de S. et al. Manutenção de culturas in vitro da mosca da bicheira, *Cochliomyia hominivorax*. **Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico**, 2009.

OLIVEIRA, Márcia CS et al. Avaliação in vitro da ação de extratos vegetais contra larvas de terceiro estágio de *Cochliomyia hominivorax*. **Revista Patologia Tropical**, v. 38, n. 2, p. 404, 2009.

POSPISCHIL, R. et al. Multiple resistance in the larger house fly *Musca domestica* in Germany. **Pesticide Science**, v. 48, n. 4, p. 333–341, 1996.

RIDDIFORD, L. Hormonal control of insect epidermal cell commitment in vitro. **Nature**, v. 259, p. 115–117, 1976.

RIDDIFORD, L. M. Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. **General and Comparative Endocrinology**, v. 34, n. 4, p. 438–446, 1978.

SCHOLL, P. J.; COLWELL, D. D.; CEPEDA-PALACIOS, R. Myiasis (Muscoidea, Oestroidea). In: MULLER, G. R. and DURDEN, L. A. **Medical and Veterinary Entomology**. 3. ed. Kindle Edition, p. 383-419, 2019.

SHAH, R. M. et al. Inheritance mode, cross-resistance and realized heritability of pyriproxyfen resistance in a field strain of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). **Acta Tropica**, v. 142, p. 149–155, 2015.

SILVA, N. M. DA; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. DE. Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 3, p. 1067–1078, 2009.

SILVA, N. M. **Investigação da resistência a inseticidas na mosca-da-bicheira *Cochliomyia hominivorax* (Diptera; Calliphoridae).** 2009. Tese (Doutorado em Biologia e Genética Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2009.

STAAL, G. B. Insect Growth Regulators with Juvenile Hormone Activity. **Annual review of entomology**, v. 20, n. 21, p. 417–460, 1975.

SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUM, D. W. **Alternatives to Pesticides in Stored-product IPM.** Springer Science & Business Media, 2012.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária.** Grupo Gen-

Guanabara Koogan, 2010 .

TEIXEIRA, Denise Gonçalves. *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (Diptera: Calliphoridae): características e importância na medicina veterinária. 2013. Seminário apresentado à Disciplina de Seminários Aplicados (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

TELLAM, R. L.; BOWLES, V. M. Control of Blowfly Strike in Sheep: Current Strategies and Future Prospects. **International Journal for Parasitology**, v. 27, n. 3, p. 261–273, 1997.

THOMAS, D. B. Behavioral Aspects of Screwworm Ecology. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 66, n. 1, p. 13–30, 1993.

THOMAS, D. B.; MANGAN, R. L. Oviposition and wound-visiting behavior of the screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 82, n. 4, p. 526–534, 1989.

TRAVIS, B. V.; KNIPLING, E. F.; BRODY, A. 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.

TRUMAN, J. W. et al. Juvenile Hormone Is Required to Couple Imaginal Disc Formation with Nutrition in Insects. **Science**, v. 312, n. 5778, p. 1385–1388, 2006.

TRUMAN, J. W.; RIDDIFORD, L. M. The origins of insect metamorphosis. **Nature**, v. 401, n. 6752, p. 447–452, set. 1999.

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.

VARGAS, M. E. I. V.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L. DE. Genetic Variability in Mitochondrial DNA of the Screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae), from Brazil. **Biochemical Genetics**, v. 33, p. 237–256, 1995.

VERÍSSIMO, C. J. Morte de ruminantes devido à infecção na orelha consequente à miíase causada por *Cochliomyia hominivorax* (COQUEREL, 1858). **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 70, n. 2, p. 187-189, 2003.

WILLIAMS, C. M. Third-Generation Pesticides. **Scientific American**, v. 217, n. July, p. 13–17, 1967.



## ANEXOS

**Anexo A:** Recuperação de pupas e adultos em todas as repetições dos grupos do estudo de padronização do teste *in vitro*.

Grupos	Recuperação de pupas	% de pupas recuperadas	Recuperação de adultos	% de adultos recuperados a partir das pupas	% de Adultos recuperados a partir das larvas
<b>G1 Placa de Petri (10g meio larval/ 10 L1 C. hominivorax)</b>	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
<b>G2 Placa de Petri (10g meio larval/ 20 L1 C. hominivorax)</b>	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
<b>G3 Placa de Petri (20g meio larval/ 10 L1 C. hominivorax)</b>	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
<b>G4 Placa de Petri (20g meio larval/ 20 L1 C. hominivorax)</b>	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	0
<b>G5 Frasco 145 ml (10g meio larval/ 10 L1 C. hominivorax)</b>	8	80	5	63	50
	4	40	4	100	40
	8	80	7	88	70
	6	60	5	83	50
	7	70	4	57	40
	7	70	7	100	70
<b>G6 Frasco 145 ml (20g meio larval/ 10 L1 C. hominivorax)</b>	5	50	2	40	20
	8	80	7	88	70
	9	90	7	78	70
	7	70	3	43	30
	6	60	5	83	50
	8	80	5	63	50
	17	85	9	53	45

<b>G7 Frasco 200 ml</b> <b>(10g meio larval/</b> <b>20 L1 C.</b> <b><i>hominivorax</i>)</b>	9	45	6	67	30
	10	50	10	100	50
	9	45	6	67	30
	12	60	5	42	25
	14	70	10	71	50
<b>G8 Frasco 200 ml</b> <b>(20g meio</b> <b>larval/20 L1 C.</b> <b><i>hominivorax</i>)</b>	12	60	7	58	35
	12	60	9	75	45
	15	75	10	67	50
	15	75	6	40	30
	14	70	7	50	35
	11	55	5	45	25

**Anexo B:** Recuperação de pupas e adultos em cada repetição por grupo amostral do estudo desafiando L1 de *Cochliomyia hominivorax* com diferentes concentrações de piriproxifen.

Grupos	Recuperação Final					
		Pupa	%	Peso do pool das pupas	Adulto	%
<b>Grupo Controle</b>	R1	7	70	0,3089	5	50
	R2	4	40	0,0957	2	20
	R3	3	30	0,2149	0	0
	R4	9	90	0,3526	6	60
	R5	8	80	0,2759	5	50
	R6	8	80	0,3104	0	0
<b>Grupo Placebo</b>	R1	9	90	0,1729	1	10
	R2	10	100	0,4431	7	70
	R3	8	80	0,3119	2	20
	R4	10	100	0,455	9	90
	R5	9	90	0,2517	0	0
	R6	1	10	0,0176	0	0
<b>Grupo 0,05% Piriproxifen</b>	R1	8	80	0,1284	0	0
	R2	7	70	0,1088	0	0
	R3	8	80	0,1362	0	0
	R4	5	50	0,0912	0	0
	R5	6	60	0,1021	0	0
	R6	7	70	0,159	0	0
<b>Grupo 0,15% Piriproxifen</b>	R1	9	90	0,166	0	0
	R2	9	90	0,1638	0	0
	R3	9	90	0,1484	0	0
	R4	8	80	0,1728	0	0
	R5	9	90	0,1375	0	0
	R6	8	80	0,1518	0	0
<b>Grupo 0,45% Piriproxifen</b>	R1	4	40	0,0457	0	0
	R2	9	90	0,0808	0	0
	R3	5	50	0,072	0	0
	R4	4	40	0,0418	0	0
	R5	6	60	0,0721	0	0
	R6	2	20	0,0303	0	0

**Anexo C:** Médias dos valores recuperados por grupo experimental do estudo desafiando larvas de primeiro ínstar de *Cochliomyia hominivorax* com diferentes concentrações de piriproxifen.

<b>Grupos</b>	<b>Porcentagem de recuperação de pupas</b>	<b>Média do peso de pupas</b>	<b>Porcentagem de recuperação de adultos</b>
<b>Controle</b>	65	0,041983	30
<b>Placebo</b>	78,33333	0,032233	31,66667
<b>G 0,05%</b>	68,33333	0,017733	0
<b>G 0,15%</b>	86,66667	0,018117	0
<b>G 0,45%</b>	50	0,012033	0