

**“Atividade de excreções e secreções de larvas de
Calliphora vicina (Insecta: Calliphoridae) sobre
Staphylococcus sp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida*
spp.: um estudo analítico.**

Daniele Lourinho Dallavecchia

Tese Definitiva

Serviço e Laboratório de Microbiologia

Faculdade de Medicina do Porto

2021

**Tese de candidatura ao grau de doutor em Biomedicina, apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto**

Programa Doutoral em Biomedicina.

O presente estudo decorreu no Laboratório de Microbiologia no Departamento de Patologia e Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal.

Orientação

Professor Doutor Acácio Agostinho Gonçalves Rodrigues

Coorientação

Doutora Elisabete Travassos Araújo Ricardo

`A Deus, em primeiro lugar

Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente
de qualquer jeito.”
Martin Luther King Jr.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Acácio Rodrigues, meu orientador, por ter aberto as portas deste doutoramento para mim, por ter confiado e permitido que eu desse esse “salto quântico” na minha vida. Muito obrigada!

Agradeço também à minha coorientadora Doutora Elisabete Ricardo que esteve sempre ao meu lado fazendo o que estava ao seu alcance para me auxiliar. Muito obrigada!

Agradeço à Professora Filipa Carvalho, diretora do programa doutoral em Biomedicina pelo acolhimento, compreensão, apoio e disponibilidade. Obrigada por sempre me receber com um sorriso e palavras de conforto e amizade.

Agradeço ao Professor Doutor Renato Geraldo Filho que sempre esteve disponível nas minhas horas de dúvida, mostrando atalhos, caminhos, incentivando, ensinando e esclarecendo.

Agradeço à Professora Doutora Valéria Magalhães de Aguiar pelos ensinamentos sobre dípteros, pelo apoio e por toda a parceria na pesquisa ao longo de dos anos!

Agradeço à Isabelita que tem sido como uma irmã para mim, sempre preocupada, auxiliando e aconselhando em tudo, minha gratidão!

À Isabel Ramos que foi a primeira a me acolher no laboratório e me aguentou como sua sombra por bastante tempo. Obrigada por tudo o que você me ensinou!

À Isabel Miranda que me iniciou nesse mundo maravilhoso da ciência de alta tecnologia. Sua inteligência fascina e a forma simples como explica coisas complexas é impressionante. Obrigada!

À Rita Daniela, colega e amiga com quem já aprendi muito, ri e também troquei confissões filosóficas. Minha gratidão!

À Ana Teresa por estar disponível sempre que precisei esclarecer dúvidas sobre técnicas de microbiologia relacionadas à minha pesquisa. Muito obrigada!

À Sofia que com seu sorriso iluminado que me deu uma prenda de Fátima que me rege, cuida e guarda. Muito obrigada!

À Joana Branco companheira de labuta, sempre a nos esbarrar pelos corredores do laboratório. Nossas conversas foram sempre muito interessantes. Obrigada!

À Marta que sempre auxilia em tudo o que é preciso. Muito obrigada!

Ao Luís Cobrado que é sempre muito gentil! Obrigada!

À Rosário, Joana, Inês, Ana e à doutora Carmem Lisboa, obrigada pela vossa amizade.

À Nádia, *in memoriam*, seu sorriso lindo, seu semblante iluminado e aqueles cílios enormes, sua simpatia e meiguice, serão sempre lembrados. Obrigada!

Agradeço a todos os meus colegas de serviço pelas conversas e conselhos, pelos risos, brincadeiras e também momentos de seriedade e companheirismo.

A minha família no Brasil que sempre torceu e orou por mim. Beijos mamãe, Jac, Mazinho e Ju.

E para Bernardino Cirne, meu marido, amigo e parceiro de todas as horas, que me compreendeu e fortaleceu, que sempre acreditou em mim e me permitiu ter paz de espírito para continuar o meu trabalho, me apoiando em tudo, inclusive traduzindo para o inglês os meus artigos científicos. A minha mais sincera gratidão!

LISTA DE PUBLICAÇÕES

Ao abrigo do artigo 8º do Decreto-Lei n.o 388/70, fazem parte desta tese as seguintes publicações:

ARTIGOS

Capítulo III: Dallavecchia, L.D., Ricardo, E., Aguiar, V.M., Silva, S.A., Rodrigues, A.G. (2018) Efficacy of UV-C ray sterilization of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) eggs for use in maggot debridement therapy. *Journal of Medical Entomology*, 56:40-44.

Capítulo IV: Dallavecchia, L.D., Ricardo, E., Silva, S.A., Rodrigues, A.G. (2020) Antibacterial and antifungal activity of excretions and secretions of *Calliphora vicina*. *Medical and Veterinary Entomology*. DOI: <https://doi.org/10.1111/mve.12486>

Capítulo V: Dallavecchia, L.D., Ricardo, E., Silva-Filho, R.G., Silva, S.A., Rodrigues, A.G. (2020) Antifungal activity of excretions/secretions of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) against *Candida glabrata*, *C. albicans* and *C. parapsilosis*. *Brazilian Journal of animal and Environment Research* (enviado).

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
FDA	Food and Drug Administration
MDT	Maggot Desbridement Therapy
NES	Excreções e Secreções de Larvas Nativas
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
LED	Laboratório de Estudos de Dípteros
UFC	Unidade Formadora de Colônia
RS	Razão Sexual

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1: Adaptado de Dallavecchia *et al.* (2014). Agentes esterilizantes utilizados na superfície dos ovos de algumas espécies de dípteros.

Capítulo III

Tabela 1. Viabilidade larval, pupar e de neo-larvas do adulto de *Calliphora vicina* após exposição aos raios UV-C

Tabela 2: Parâmetros biológicos detalhados de ovos que eclodiram após a incubação na dieta moela de frango e desenvolvimento após a esterilização com radiação UV-C.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1: Foto das crianças curadas de osteomielite, tratadas por Baer (Baer, 1931).

Capítulo II

Figura 1: a) Material utilizado na montagem de armadilha para captura de dípteros; b) Protótipo da armadilha utilizada; c) Armadilha exposta na natureza com isco em seu interior; d) Moela de frango utilizada como isco; e) Localização geográfica onde as armadilhas ficaram expostas.

Figura 2: a) Recipiente contendo os ovos coletados no Porto, b) Aumento em $10 \times$ dos ovos coletados, c) Recipientes preparados para receber a dieta com os ovos e d) Ovos incubados com dieta moela de frango para desenvolvimento larvar.

Figura 3: a) Pote em vidro com larvas e pupas, b) Moscas nascidas em laboratório alimentando-se de dieta moela de frango, c) Gaiola transparente para criação dos dípteros e d) Recipientes com tela em nylon com mel 50% e água.

Figura 4: Amostras dos espécimes coletados para identificação

Figura 5: Moscas identificadas no LED-Brasil: a) *Lucilia sericata*, b) *Calliphora vicina*, c) *Sarcophagidae* e d) *Chrysomya albiceps*.

Figura 6: Esquematização do ciclo biológico de *Calliphora vicina* desde o ovo até a fase adulta e oviposição, com duração total de 27 dias.

Capítulo III

Figura 1: Ovos transferidos para caixas de polipropileno com 3 divisões internas.

Figura 2: Câmara de Fluxo laminar com lâmpada UV-C utilizada nos testes.

Figura 3: Testes de esterilização com caldo tioglicolato. Tubo (a) e (b), uma réplica do tratamento 1 e do tratamento 2, respectivamente; tubos (c, d e e - 3 réplicas), expostos ao

tratamento 3; tubo (f) contendo apenas meio de cultura, para comparação de transparência do meio (controle negativo).

Figura 4: Taxa de abandono (%) de larvas de *Calliphora vicina* na pupariação e nascimento nos três tratamentos e controle (27 larvas por repetição). Controle = sem exposição aos raios UV-C; T1 = 3 min de exposição aos raios UV-C; T2 = 6 min de exposição aos raios UV-C e T3 = 12 min de exposição aos raios UV-C.

Capítulo IV

Figura 1. Atividade antimicrobiana de excreções e secreções nativas da mosca *Calliphora vicina* determinada pela contagem de UFC de cepas bacterianas de (A) *Escherichia coli*, (B) *Klebsiella pneumoniae* e a levedura (C) *Candida albicans*. As contagens de UFC são apresentadas como valores médios (n = 3) de cada concentração obtida pela razão entre o crescimento do controle positivo (sem NES) / crescimento bacteriano na presença de NES. As barras de erro indicam o desvio padrão (P <0,05).

Figura 2. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 na presença de excreções e secreções nativas da mosca *Calliphora vicina* (concentração de proteína de 306,45 µg / mL) em comparação com o controle (sem NES). Os valores da OD600 nm são apresentados como valores médios (n = 3) e a curva de crescimento foi calculada pela razão de crescimento do controle positivo / crescimento bacteriano (OD2 / OD1) e as barras de erro indicam o desvio padrão.

Capítulo V

Figura 1: a) Larvas em 3º íntar, b) Pesagem das larvas com água gelada, c) Excesso de água sendo retirado, d) Larvas secando em papel filtro, e) Tubos cónicos com larvas em 3º íntar preparadas para incubação, f) Tubos de 1000 µL com NES filtrada

Figura 2: Placa com 96 poços para determinação da CIM e a CFM. As concentrações 153,22, 76,61, 38,3, 19,15 e 9,57 µg/mL apresentaram CFM de 100% para *C. glabrata*. Valores médios (n = 3).

Figura 3: Redução do número de UFC apresentada em percentagens determinada pelas diluições seriadas de NES incubadas com *C. glabrata*. As percentagens são definidas pela contagem de UFCs como valores médios (n = 3) de cada diluição obtida pela razão entre o crescimento do controlo positivo (sem NES) / crescimento bacteriano na presença de NES. As barras de erro indicam o erro padrão (p <0,05).

Figura 4: Dados expressos como média ± D.P. Três repetições foram realizadas para cada experiência. Placas de ágar após 24 horas de incubação com amostras de NES com *C. glabrata* e o controlo positivo (*C. glabrata* + meio de cultura).

Figura 5: CIM de *C. albicans* na concentração 153,22 µg / mL e redução no número de UFC apresentando em percentagens. As percentagens de redução da contagem de UFC são valores médios (n = 3) e as barras de erro indicam erro padrão (p <0,05).

Figura 6: Placa de 96 poços com as 9 diluições de NES incubadas com *C. parapsilosis*, mais o controlo positivo (inóculo + meio de cultura) e o controlo negativo (NES + meio de cultura). Valores médios (n = 3).

Figura 7: Redução e aumento no número de UFCs apresentada em percentagens para *C. parapsilosis*. As percentagens de redução da contagem de UFCs são valores médios (n = 3) e as barras de erro indicam erro padrão (p <0,05).

ABSTRACT

The study had three objectives: the **first objective** was to set up a laboratory for the study of diptera, establishing the creation and maintenance of colonies of diptera in the family Calliphoridae. For that, two insect traps with chicken gizzard bait were exposed, in a wooded area in the center of Porto, to attract the dipterans. The traps were exposed for 24 hours and, after this period of time, the bait with the flies' eggs were taken to the laboratory, where they passed through all stages of development until adulthood. The insects were morphologically identified as *Lucilia sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Sarcophagidae* and *Calliphora vicina*. After studying the life cycle of insects, the species *C. vicina* was chosen, which best adapted to laboratory conditions. The **second objective** was to develop a simple and inexpensive technique for sterilizing *C. vicina* eggs, in order to obtain sterile larvae for the extraction of their secretions and excretions with potential antimicrobial action. The radiation used to sterilize the eggs was UV-C, a sterilization technique free of chemical residues and easy to handle. Three treatments (T1, T2, T3) were compared with 3, 6 and 12 minutes of exposure to ultraviolet rays (UV-C), respectively. The sterility of the eggs was evaluated by a culture of thioglycolate broth, incubated at $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ for up to 14 days. The radiation sterilization process was successful after 12 minutes of exposure to UV-C rays (treatment 3). Larval viability was 57%, pupar 54% and adults 54%. The sex ratio was 50%, within the expected values. There were no morphological abnormalities associated with UV-C treatment in flies born from eggs exposed to radiation. In conclusion, sterilization by UV-C rays is indicated to obtain sterile larvae. The **third objective** was to evaluate the antimicrobial action of the NES of *C. vicina* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum lethal concentration (CLM). The following microorganisms *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* LM 1102, *Candida albicans* ATCC 90028 and

the clinical strains *C. albicans* LM026, *C. glabrata* LM025 and *C. parapsilosis* LM021 were tested. The *C. vicina* NES showed high antimicrobial activity on gram-negative bacteria such as *E. coli* and *K. pneumoniae* and on the fungus *C. glabrata*, a short-lived antimicrobial activity on gram-positive bacteria, *S. aureus*, moderate fungal activity on *C. albicans* LM026, little activity on *C. albicans* ATCC 90028 and no fungal activity on *C. parapsilosis*. Thus, the NES of *C. vicina* can be considered with the potential to be developed as a simple and inexpensive natural antibiotic and antifungal.

RESUMO

O estudo teve três objetivos: o **primeiro objetivo** foi montar um laboratório de estudo de dípteros, estabelecendo a criação e manutenção de colônias de dípteros da família Calliphoridae. Para isso, foram expostas, numa área arborizada no centro da cidade do Porto, duas armadilhas de inseto com isco moela de frango para atrair os dípteros. As armadilhas ficaram expostas por 24 horas e, após esse período de tempo, a isca com os ovos das moscas foram levadas para o laboratório, onde passaram por todas as fases de desenvolvimento até a fase adulta. Os insetos foram identificados morfológicamente como *Lucília sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Sarcophagidae* e *Calliphora vicina*. Após o estudo do ciclo de vida dos insetos, optou-se pela espécie *C. vicina*, que melhor se adaptou às condições laboratoriais. O **segundo objetivo** foi desenvolver uma técnica simples e barata de esterilização dos ovos de *C. vicina*, com o intuito de obter larvas estéreis para a extração das suas secreções e excreções com potencial ação antimicrobiana. A radiação utilizada para esterilizar os ovos foi a UV-C, técnica de esterilização isenta de resíduos químicos e de fácil manuseio. Foram comparados três tratamentos (T1, T2, T3) com 3, 6 e 12 minutos de exposição aos raios ultravioleta (UV-C), respetivamente. A esterilidade dos ovos foi avaliada por uma cultura de caldo tioglicolato, incubado a $32\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ por até 14 dias. O processo de esterilização por radiação foi eficaz após 12 minutos de exposição aos raios UV-C (tratamento 3). A viabilidade larval foi de 57%, a pupar 54% e a dos adultos 54%. A razão sexual foi de 50%, dentro dos valores esperados. Não houve anormalidades morfológicas associadas ao tratamento com UV-C nas moscas nascidas dos ovos expostos à radiação. Em conclusão, a esterilização por raios UV-C é indicada para obter larvas estéreis. O **terceiro objetivo** teve como propósito avaliar a ação antimicrobiana das NES de *C. vicina* pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração letal mínima (CLM). Foram testados os seguintes microrganismos *Escherichia coli*

ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* LM 1102, *Candida albicans* ATCC 90028 e as estirpes clínicas *C. albicans* LM026, *C. glabrata* LM025 e *C. parapsilosis* LM021. A NES de *C. vicina* apresentou elevada atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-negativas como *E. coli* e *K. pneumoniae* e sobre o fungo *C. glabrata*, atividade antimicrobiana de curta duração sobre a bactéria gram-positiva, *S. aureus*, atividade fúngica moderada sobre *C. albicans* LM026, pouca atividade sobre *C. albicans* ATCC 90028 e nenhuma atividade fúngica sobre *C. parapsilosis*. Desse modo, a NES de *C. vicina* pode ser considerada com potencial para ser desenvolvida como um antibiótico e antifúngico natural simples e barato.

OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Montar um laboratório de estudo de dípteros no Departamento de Microbiologia e Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e estabelecer uma colónia de moscas da família Calliphoridae, nativas de Portugal como suporte para as experiências.
2. Desenvolver uma metodologia de esterilização física simples e eficiente para ovos dos dípteros da família Calliphoridae.
3. Avaliar a ação antimicrobiana da NES de larvas de *C. vicina* sobre *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e ação antifúngica sobre *Candida spp.*, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM).

Conteúdo

Agradecimentos	VI
Lista de publicações	VIII
Lista de abreviaturas	IX
Lista de tabelas	X
Lista figuras	XI
Abstract	XIV
Resumo	XVI
Objetivos do Estudo	XVIII
Conteúdo	1
Capítulo I: Introdução	5
Breve História da Terapia com larvas medicinais	6
<i>Maggot Debridement Therapy</i>	8
Esterilização da superfície dos ovos de larvas medicinais	9
Raios UV-A, UV-B, UV-C, UV-V	10
Esterilizantes	11
Ação antimicrobiana de excreções e secreções de larvas de moscas medicinais	12
Capítulo II: Criação do laboratório de Estudo de Dípteros e escolha da mosca para estudo	16
Resumo	17
Introdução	18

Material e Métodos	18
Coleta	19
Identificação	22
Ciclo biológico	23
Resultados	24
Discussão	28
Capítulo III: Eficácia dos raios UV-C na esterilização da superfície dos ovos de <i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae) para uso em terapia de desbridamento por larvas.	30
Resumo	31
Introdução	32
Raios UV-C	31
Material e Métodos: Colônia de moscas	32
Comida e Substrato	36
Tratamento de Esterilização	37
Resultados	39
Média de abandono	40
Viabilidade larval	41
Discussão	43
Importância dos raios UV-C	45
Capítulo IV: Atividade antibacteriana e antifúngica das excreções e secreções de <i>Calliphora vicina</i>	47
Resumo	48
Introdução	49

Material e Métodos	50
Larvas	50
Produção de excreções / secreções nativas (NES)	51
Microrganismos	52
Ensaio antimicrobianos: Unidades Formadoras de Colónias	52
Ensaio Turbidimétrico	53
Resultados	54
Características da NES	54
Atividade antimicrobiana	55
Discussão	57
Capítulo V: Atividade antifúngica de <i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae) contra <i>Candida glabrata</i> , <i>C. albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>	61
Resumo	62
Introdução	60
Material e Métodos	64
Larvas	64
Produção de excreção / secreção nativa (NES)	65
Microrganismos	66
Ensaio antimicrobiano	67
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	67
Unidade Formadora de Colónia (UFC)	67
Resultados	68
Determinação do pH e quantificação da proteína extraída da NES	68
Atividade antimicrobiana	68

Discussão	71
Capítulo VI: Discussão Geral	75
A escolha do díptero	76
Radiação por UV-C	76
Ação antimicrobiana da NES	77
Conclusão	78
Referências	79
Publicações: Publicação I (Capítulo IV)	88
Artigo 1: Efficacy of UV-C ray sterilization of <i>Calliphora vicina</i> (Diptera: Calliphoridae) eggs for use in maggot debridement therapy	89
Publicação II (Capítulo V)	94
Artigo 2: Antibacterial and antifungal activity of excretions and secretions of <i>Calliphora vicina</i>	95

Capítulo I:

Introdução Geral

Introdução

1. Breve História da Terapia Larvar

Terapia larvar (TL) é técnica que consiste em utilizar larvas vivas de moscas varejeiras para desbridar o tecido necrosado de uma ferida infectada. Trata-se de uma técnica muito antiga, utilizada principalmente na medicina tradicional/folclórica de culturas como a Tribo Aborígine Ngemba de Nova Gales do Sul, os Myanmas, da Birmânia e os maias da América Central. Estudos antropológicos sugerem, inclusivamente, que os maias preparavam pensos embebidos em sangue de gado e os expunha ao sol, com o objetivo de atrair moscas para depositarem os seus ovos; quando as larvas nasciam, os pensos eram aplicados sobre determinadas feridas (Sherman *et al.* 2000, Whitaker *et al.* 2017).

Entre os gregos, esses pequenos insetos eram vistos como símbolos da solidariedade, pois as moscas alimentavam-se dos guerreiros mortos durante as batalhas, depois voavam com parte deles em seu pequeno corpo, distribuindo pela natureza centenas de células através dos seus ovos. Por esse motivo, a mosca era considerada um animal sagrado (Chevalier 1906).

Mífase foi definida por Zumpt (1965) como “uma infestação de larvas de moscas em humanos ou animais vertebrados”, que se alimentam do tecido do hospedeiro morto ou vivo, onde substâncias líquidas são ingeridas como fonte alimentar. As moscas causadoras de mífase podem ser classificadas por parasitas obrigatórios (também denominadas de mífase primária) ou facultativos (mífase secundária). Na mífase primária, as moscas parasitam o tecido saudável para se alimentar e completar o seu ciclo de vida. As moscas que são parasitas facultativas são necrobiontófagas, ou seja,

alimentam-se de tecido desvitalizado ou cadáveres; também são capazes de parasitar hospedeiros vivos, mas somente se as condições forem muito favoráveis.

Ambroise Paré (1500-1590), cirurgião francês, foi o primeiro a perceber algum benefício na utilização terapêutica das larvas (Pare *et al.* 1952). Mas foi o cirurgião francês do exército de Napoleão, Larrey (1766-1842), durante a expedição à Síria, quem primeiro observou que a infestação de larvas nas feridas dos soldados era causada pela mosca azul; em seus documentos deixou registado: “as larvas removiam somente o tecido morto, deixando livre o tecido saudável.” (Baer 1931, Whitaker *et al.* 2017).

Uma citação de J. F. Zacharias de Cumberland, cirurgião do Exército Confederado, relata suas experiências na Guerra Civil:

“Durante o meu serviço no hospital em Danville, Virginia, usei larvas para remover o tecido necrosado em uma gangrena, e com satisfação eminente, vi, em um único dia as larvas limparem uma ferida muito melhor do que qualquer agente que tivéssemos ao nosso comando; usei larvas depois em várias feridas. Tenho certeza que salvei muitas vidas pelo seu uso, salvando soldados da septicemia, e dando-lhes recuperações rápidas”. (Baer 1931).

Durante a Primeira Guerra Mundial (1917), William S. Baer, cirurgião ortopédico americano, recebeu em seu hospital dois soldados que haviam sido feridos no campo de batalha. Por sete dias permaneceram sem alimentação ou água e ainda ficaram expostos ao clima e insetos. Ao cortar suas roupas e lavar suas feridas, Baer percebeu que as lesões estavam com excelente aspeto e sem infeção; os soldados não tinham febre e nem septicemia. Em 1929, Baer decidiu introduzir na clínica a TL, aplicando larvas em doentes com fratura exposta e osteomielite. Ele selecionou 21 pacientes que não apresentaram resultados satisfatórios com os tratamentos convencionais para aplicar as larvas e observou que, após dois meses do início do tratamento, todas as feridas estavam fechadas (**Figura 1**).

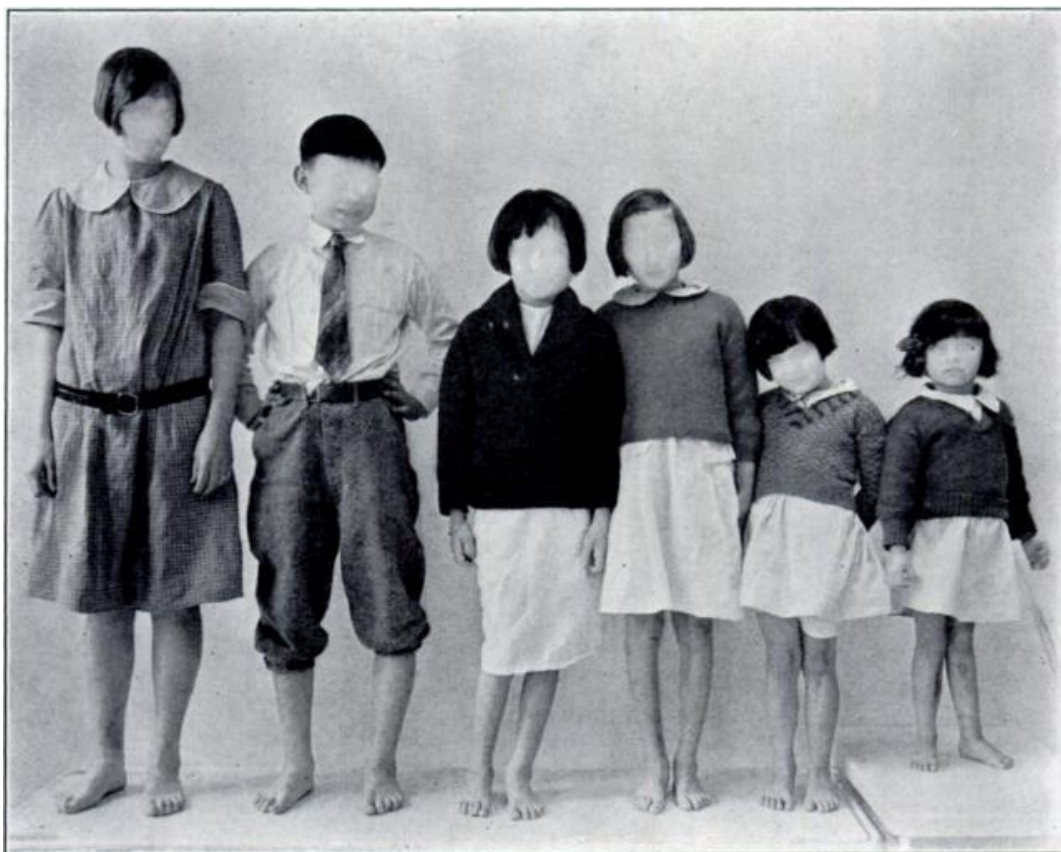


Fig. 1: Foto das crianças curadas de osteomielite, tratadas por Baer (Baer 1931).

Na época, a TL foi reconhecida como o método mais rápido e eficiente para o tratamento de osteomielite crônica. Para minimizar a repulsa que as larvas podiam causar nos doentes, bem como na equipa hospitalar e também para evitar a fuga das larvas, os médicos criaram pensos como se fossem “gaiolas” e cobriam as feridas para esconder as larvas.

Com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1929, os médicos começaram a perder o interesse pela TL que foi considerada ultrapassada até ser completamente descontinuada na década de 40. Quando a resistência aos antibióticos aumentou drasticamente e os tratamentos não estavam mais a dar os resultados esperados, Ronald Sherman, médico americano, decidiu reintroduzir a TL novamente na clínica médica. Nos anos 80, *Maggot Desbridement Therapy* (MDT), como é chamada a TL nos EUA, voltou a ser utilizada para o tratamento de feridas de difícil cicatrização. No quadro atual, a TL é aplicada por profissionais de saúde em mais de 30 países e a

espécie de mosca mais utilizada neste tratamento é *Lucilia sericata* (Mumcuoglu *et al.* 1999, Sherman *et al.* 2000, Contreras *et al.* 2005, Nigan *et al.* 2006).

A MDT foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2004 como uma terapia alternativa e natural para o desbridamento de feridas infectadas (Sherman *et al.* 2014) e apresenta três efeitos benéficos fundamentais: desbridamento, desinfecção e melhoria da cicatrização. Durante o desbridamento, as larvas secretam enzimas digestivas que dissolvem o material necrótico da ferida, nomeadamente, carboxipeptidases A e B, leucina aminopeptidases, collagenases e proteases de serina (enzimas do tipo tripsina e quimotripsina). Essas enzimas, em conjunto, desempenham provavelmente um papel significativo na digestão da matriz da ferida (Nigan *et al.* 2006), onde cada lesão recebe cerca de 10 larvas por cm² e cada larva é capaz de remover 25 mg de material necrótico em apenas 24 horas (Mumcuoglu, 2001). As larvas só se alimentam de tecido necrosado, além disso, são fotofóbicas, ou seja, procuram por fendas na ferida para fugir da luz. Essas características permitem que as larvas façam uma limpeza minuciosa, sendo mais rápidas e eficientes em desbridar do que qualquer bisturi de cirurgião (Nigan *et al.* 2006).

As larvas possuem um par de mandíbulas (ganchos) que auxiliam na sua locomoção e fixação ao tecido. Simultaneamente, estes ganchos vão rasgando o tecido necrótico, libertando enzimas pelo aparelho bucal e também pelo exoesqueleto, tornando o leito da ferida necrótica num substrato de alimentação. As larvas alimentam-se desse substrato repleto de bactérias que, ao passar pelo seu trato intestinal, são destruídas pelos comensais existentes. O que é eliminado pelas larvas é considerada estéril (Muncuoglu *et al.* 2001). As larvas também libertam enzimas com ação antimicrobiana, pequenos péptidos conhecidos como Lucifensinas, bem caracterizados e muito comuns na maioria dos insetos (Cerovsky e Bém, 2014). O leito da ferida, limpo

e exposto, poderá adicionalmente ser tratado com outros adjuvantes que auxiliem a cicatrização.

1.2. Esterilização da superfície dos ovos

A superfície dos ovos das moscas é altamente contaminada, uma vez que as moscas estão sempre em contacto com carcaças de animais mortos ou matéria orgânica em decomposição. Mesmo as moscas criadas em laboratório não estão livres de contacto com microrganismos por necessitarem de dieta fresca e não estéril como carne, sardinha, fígado ou moela de frango (Dallavecchia *et al.* 2014).

Willian Baer, quando iniciou o seu trabalho com larvas medicinais, tratando doentes com osteomielite, observou que alguns de seus pacientes tiveram suas feridas contaminadas com *Clostridium tetani* e *Clostridium perfringens*, desta forma, concluiu que os ovos precisavam ser esterilizados.

Para desenvolver metodologias de esterilização, Baer trabalhou em conjunto com alguns colegas (Baer, 1931). Desde então, muitos agentes têm sido utilizados para esterilização dos ovos, a maioria dos quais envolve o uso de químicos tóxicos como, formol, aldeídos, hipoclorito de sódio, ácido bórico, entre outros (**tabela 1**), adaptado de Dallavecchia *et al.* (2014).

Porém, os produtos químicos deixam resíduos na superfície dos ovos, sendo indispensável, após a esterilização, um tratamento neutralizante que evite a ação tóxica, assim como o ressecamento. Os agentes químicos também requerem cuidados por parte do utilizador, como equipamentos de segurança pessoal, para prevenir acidentes como queimaduras ou inalação de compostos voláteis. Uma alternativa eficiente, barata e livre de resíduos, seria a utilização de um esterilizante físico, como o raio UV-C, muito utilizado em câmaras de fluxo laminar, hospitais, indústria, etc., por inviabilizar a atividade microbiana.

Tab. 1: Adaptado de Dallavecchia *et al.* (2014). Agentes esterilizantes utilizados na superfície dos ovos de algumas espécies de dípteros.

Família	Espécie	Esterilizante /concentração	Autor/país
Calliphoridae	<i>Phormia Regina</i> (Meigen, 1826)	Cloreto de mercúrio (1:1000), álcool etílico 25%, ácido clorídrico 0,5%	Baer (1931) /EUA
		Formol 10% e cloreto de sódio 0,85%	Fine e Alexander (1934) /(EUA)
	<i>Chrysomya Putoria</i> (Wiedemann, 1818)	Hipoclorito de sódio 0.5%, Formaldeído 1%, Farmaseptplus® 1:4000	Varzim <i>et al.</i> (2005) /Brasil
		Glutaraldeído 2%	Dallavecchia <i>et al.</i> (2014) /Brasil
	<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)	Glutaraldeído 2% e Tween 20	Dallavecchia <i>et al.</i> (2010) /Brasil
	<i>Lucilia caesar</i> (Linnaeus, 1758)	Cloreto de mercúrio (1:1000), álcool etílico 25% ácido Clorídrico 0,5%	Baer (1931) /EUA
		Formalina 5% e Hidróxido de sódio 1%	Simmons (1934) /EUA
		Sulfito de sódio 2,5% e Formaldeído 2,5%	Mumcuoglu <i>et al.</i> (1999) /Israel
		Ortophtaldeído / (não especificado)	Contreras <i>et al.</i> (2005) /México
		Hipoclorito de sódio 0,5% e Formalina 10%	Figueroa <i>et al.</i> (2006) /Chile
		Ácido acético e estreptomina.	Kocisova <i>et al.</i> (2006) /Eslovaquia
		Fenol 3% ou Hipoclorito de sódio 0,5%	Sherman <i>et al.</i> (2007) / EUA
		<i>Lucilia cuprina</i> (Wiedemann,1830)	Raios ultra-violetas (UV-C); álcool 70% e clorexidina.
	Muscidae	<i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758)	Formol 10% e Cloreto de sódio 0,85%

Os raios ultravioletas estão divididos em diferentes comprimentos de onda, tradicionalmente conhecidos como UV-A: 315 a 400 nm; principal responsável pelo fotoenvelhecimento, afetando negativamente a elasticidade natural da pele e agravando fotodermatoses, como o lúpus eritematoso e a erupção polimorfa à luz solar; UV-B: 280 a 315 nm, associado à produção da vitamina D₃ (colecalciferol), envolvida no metabolismo ósseo e no funcionamento do sistema imunológico do organismo. Interações

diretamente com o DNA, produzindo mutações nos dímeros de pirimidina que estão associadas ao cancro de pele não-melanoma (carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas); UV-C: 200 a 280 nm, é germicida e pode causar mutações genéticas, porém, é retido quase na totalidade pela camada de ozônio; UV-V: 100 a 200 nm, fortemente absorvido pela água e pelo ar e só pode ser transmitido no vácuo. (Balogh *et al.* 2010).

A esterilização por raios UV-C é amplamente utilizada pela indústria alimentar (Ingram e Roberts 1980, Faria 2001) para desinfetar vários tipos de materiais, inclusive produtos já embalados. Também tem sido utilizada para inativar ovos de insetos parasitas (Brownell *et al.* 2006). É um método eficiente de esterilização; no entanto, o uso de material específico que consegue absorver os raios UV-C é indispensável, assim como o controle do período de tempo e de exposição à radiação.

1.3. Ação antimicrobiana de excreções e secreções de larvas de moscas

A observação dos benefícios causados pelas larvas medicinais, principalmente relacionados à redução de infecções microbianas nas feridas, despertou o interesse de muitos investigadores em relação às excreções e secreções das larvas (NES). Sabe-se hoje em dia que as larvas libertam nas feridas secreções ricas em compostos naturais com numerosos metabólitos de baixo peso molecular com reconhecida atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Também possuem em sua composição proteínas como serina protease (semelhante à tripsina e quimiotripsina), além de peptídeos antimicrobianos como defensinas, cecropinas, dipterocinas, peptídios ricos em prolina, aloferons, alostatinas, entre outros (Díaz-Roa *et al.* 2014, Chernysh *et al.* 2015).

Além disso, com o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos existentes, torna-se indispensável a descoberta de novos fármacos. Chernysh *et al.* (2015), por exemplo, realizaram um estudo para comparar o desenvolvimento da

resistência de bactérias tratadas com antibióticos convencionais e com antimicrobianos derivados de insetos, nomeadamente Díptera, ao longo de diversas gerações. Os autores observaram que já nas gerações iniciais, as bactérias tratadas com antibióticos convencionais adquiriram resistência; o mesmo não foi observado com as bactérias tratadas com antimicrobianos derivados de insetos. Desta forma, demonstrou-se que os antimicrobianos de insetos podem ser uma alternativa eficiente para a produção de possíveis novos antimicrobianos no futuro.

Estudos demonstraram a ação antimicrobiana da NES de *L. sericata* na redução significativa da carga microbiana de microrganismos tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, MRSA, entre outras. Também foi observada atividade antifúngica contra *Candida albicans* e antiviral (Bexfield *et al.* 2008, Cazander *et al.* 2009, Barnes *et al.* 2010, Ratcliffe *et al.* 2015, Evans *et al.* 2015, Mohammad *et al.*, 2019).

Embora existam já muitos estudos que descrevem os componentes existentes na NES das larvas de *L. sericata*, ainda não é muito compreendido o seu mecanismo de ação. Por vezes, os resultados apresentados são contraditórios. Este facto talvez possa estar relacionado com a diversidade das técnicas de extração da NES, diluentes utilizados, ensaios antimicrobianos, técnicas laboratoriais ou tamanho dos inóculos.

Por exemplo, Thomas *et al.* (1999) utilizaram 200µL de água ultrapura MilliQ estéril por grama de larva para a extração de NES de *L. sericata* e testaram as concentrações de 20 e 50µL de NES contra bactérias gram positivas e gram negativas. De acordo com os seus resultados, a concentração com 50µL de NES foi mais eficaz para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mas menos eficiente em *Escherichia coli*. Bexfield *et al.* (2004) também utilizaram 200 µL de água por grama de larvas para extrair a NES e a fracionaram obtendo os seguintes

pesos moleculares: >10 kDa, 500 Da - 10k Da e <500 Da, em seguida demonstraram que a fração >500 Da foi mais eficaz contra *S. aureus* e *S. aureus* metilicina-resistente (MRSA).

Muitos estudos utilizam atualmente técnicas de ultrafiltração ou separadores moleculares para a utilização da NES, no entanto, estes protocolos são complicados, e oneram os custos de produção devido ao uso de dispositivos e reagentes caros (Bexfield *et al.* 2008, Evans *et al.* 2015, Chernysh *et al.* 2015). Numa situação em que a demanda por antibióticos naturais seja grande ou a sua utilização seja necessária em locais remotos, como por exemplo, em contextos de guerra, é necessário o estudo da ação antimicrobiana da NES em seu estado puro, ou seja, a NES sem fracionamento ou separação molecular.

Deste modo, este trabalho teve como objetivo estudar os efeitos antimicrobianos da NES pura de uma mosca nativa de Portugal, da família Calliphoridae. Desta forma, foi escolhida a espécie *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Calliphoridae), uma espécie de mosca originária da região holártica, sendo muito comum em Portugal e frequentemente encontrada em áreas urbanas (Smith 1986, Byrd e Castner 2010). Trata-se de uma espécie de díptero necrobiontófago, onde as larvas se alimentam de tecido morto (necrosado). Estas moscas têm olfato muito apurado, sendo atraídas para feridas de animais, cadáveres e excrementos altamente contaminados com microflora patogénica humana e animal. Também apresenta alta capacidade reprodutiva de massa de ovos e adapta-se bem às condições laboratoriais.

Sendo assim, o estudo dividiu-se em 3 objetivos principais: 1 - Estabelecer uma colónia em laboratório com dípteros da família Calliphoridae, nativas de Portugal Continental e identificá-los morfológicamente para dar início às experiências. 2 - Desenvolver uma metodologia de esterilização física da superfície dos ovos, simples e

eficiente. 3 - Avaliar a ação antimicrobiana e antifúngica da NES contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Candida albicans* ATCC 90028 e as estirpes clínicas *Klebsiella pneumoniae* LM 1102, *C. albicans* LM026, *C. glabrata* LM025 e *C. parapsilosis* LM021.

A tese foi dividida por capítulos; no **capítulo I**, foi descrita uma introdução geral apresentando o tema desta tese. No **capítulo II** é referido como foi selecionada *Calliphora vicina*, uma espécie de mosca varejeira conhecida como mosca azul, que se encontra amplamente distribuída por todo o mundo, principalmente Estados Unidos e Europa, existindo tanto em locais rurais como em centros urbanos. É uma espécie que reúne características ideais para ser utilizada em alternativa à *Lucilia sericata*. O **capítulo III** descreve a esterilização da superfície dos ovos de *C. vicina* com raios UV-C, um método simples e eficiente de esterilização física. No **capítulo IV e V** são demonstrados os resultados dos testes antimicrobianos realizados com a NES, através de um ensaio turbidimétrico, análise da curva de crescimento e pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração letal mínima (CLM).

Capítulo II

**Criação do laboratório de Estudos de Dípteros e
escolha da mosca para a pesquisa**

Resumo

O primeiro objetivo deste estudo foi implementar um laboratório de estudos de dípteros (LED) no Serviço de Microbiologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP) para dar suporte aos trabalhos relacionados aos dípteros. Foram utilizadas armadilhas com moela de frango para atrair os dípteros, expostas por 24 horas num local arborizado do centro da cidade do Porto. Após o período de tempo estipulado, as dietas com os ovos depositados foram transferidas para o LED onde se desenvolveram até à fase adulta. Quatro espécies foram identificadas morfológicamente: *Lucília sericata*, *Chrysomya albiceps*, *Sarcophagidae* e *Calliphora vicina*. Por resistir melhor a todas as estações do ano, optou-se pela criação e manutenção da espécie *C. vicina*. O ciclo de vida de *C. vicina* em laboratório foi registado e constatou-se tratar de uma espécie holometabólica, ou seja, que sofre uma metamorfose completa, passando pelas etapas de ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos eclodem em aproximadamente 12 horas e as suas larvas passam por três fases L1, L2 e L3, atingindo a fase de pré-pupa em aproximadamente 5 dias. A fase de pupa dura em média 10 dias até à emergência (nascimento) do inseto adulto. A metamorfose completa, ou seja, do ovo até à fase adulta, ocorre em média em 15 dias, podendo variar conforme a temperatura – quanto menor a temperatura, maior será o tempo para o ciclo biológico.

Palavras-chave: *Calliphora vicina*, ciclo de vida, criação em laboratório.

1.Introdução

A escolha de um díptero que se adapte bem às condições de laboratório é fundamental para implementar os estudos necessários com a espécie escolhida. Na maioria das vezes, grandes quantidades de insetos são utilizadas na manutenção de colônias sob condições controladas de laboratório. Por exemplo, são necessárias grandes quantidades de ovos de dípteros para que se possa testar a ação dos raios UV, ou grandes quantidades de larvas para a extração da NES, onde podem ser utilizadas até 500 larvas por extração, dependendo da metodologia utilizada (Dallavecchia *et al.* 2019, 2020).

A espécie de mosca mais utilizada na terapia larvar (TL) e estudada em relação à atividade antimicrobiana da NES é a espécie *Lucília sericata*, um califorídeo necrobiontófago, isto é, que só se alimenta de material orgânico em estado de putrefação. Esse comportamento alimentar faz com que as larvas tenham uma convivência estreita com inúmeros microrganismos, onde provavelmente, ao longo de sua evolução, desenvolveram uma eficiente defesa imunitária (Dallavecchia *et al.* 2015).

A criação em laboratório de moscas da família Calliphoridae é simples e barata. Para sua correta manipulação é necessário conhecer o ciclo evolutivo das espécies, bem como o seu comportamento alimentar, temperatura e humidade ideais para o seu desenvolvimento (Figuerola *et al.* 2007, Ferraz *et al.* 2014, Dallavecchia *et al.* 2015).

O objetivo deste estudo foi montar uma colônia de dípteros da família Calliphoridae em alternativa à espécie *Lucília sericata* e que se adaptasse bem às condições de laboratório.

2.Material e métodos

2.1.Coleta

A colónia de dípteros foi formada por insetos adultos selvagens. Foram inseridos dentro de uma armadilha (adaptada do modelo desenvolvido por Mello *et al.* 2007) 500 g de moela de frango fresca (Dallavecchia *et al.* 2015) para atrair os dípteros (**figura 1- a e b**). As armadilhas (n=3) foram colocadas dentro de recipientes abertos com 500 mL de água (para evitar a invasão de insetos rastejantes), onde ficaram expostas por um período de 24 horas em um ambiente aberto e arborizado (**figura 1- c e d**). Os espécimes foram coletados no centro da Cidade do Porto, de acordo com as seguintes coordenadas geográficas: N41.146290°, W8. 600417° (**figura 1- e e f**).

Após o período de tempo estabelecido, as massas de ovos depositadas pelas moscas na moela de frango foram transferidas para recipientes de polipropileno contendo mais 500 g de moela de frango para eclosão das larvas e alimentação até o seu desenvolvimento total, por volta do terceiro dia de vida (L3 ou 3º estadio). Os recipientes foram vedados hermeticamente e enviados para o Laboratório de Estudo de Dípteros (LED) no Serviço de Microbiologia, Departamento de Patologia, FMUP.

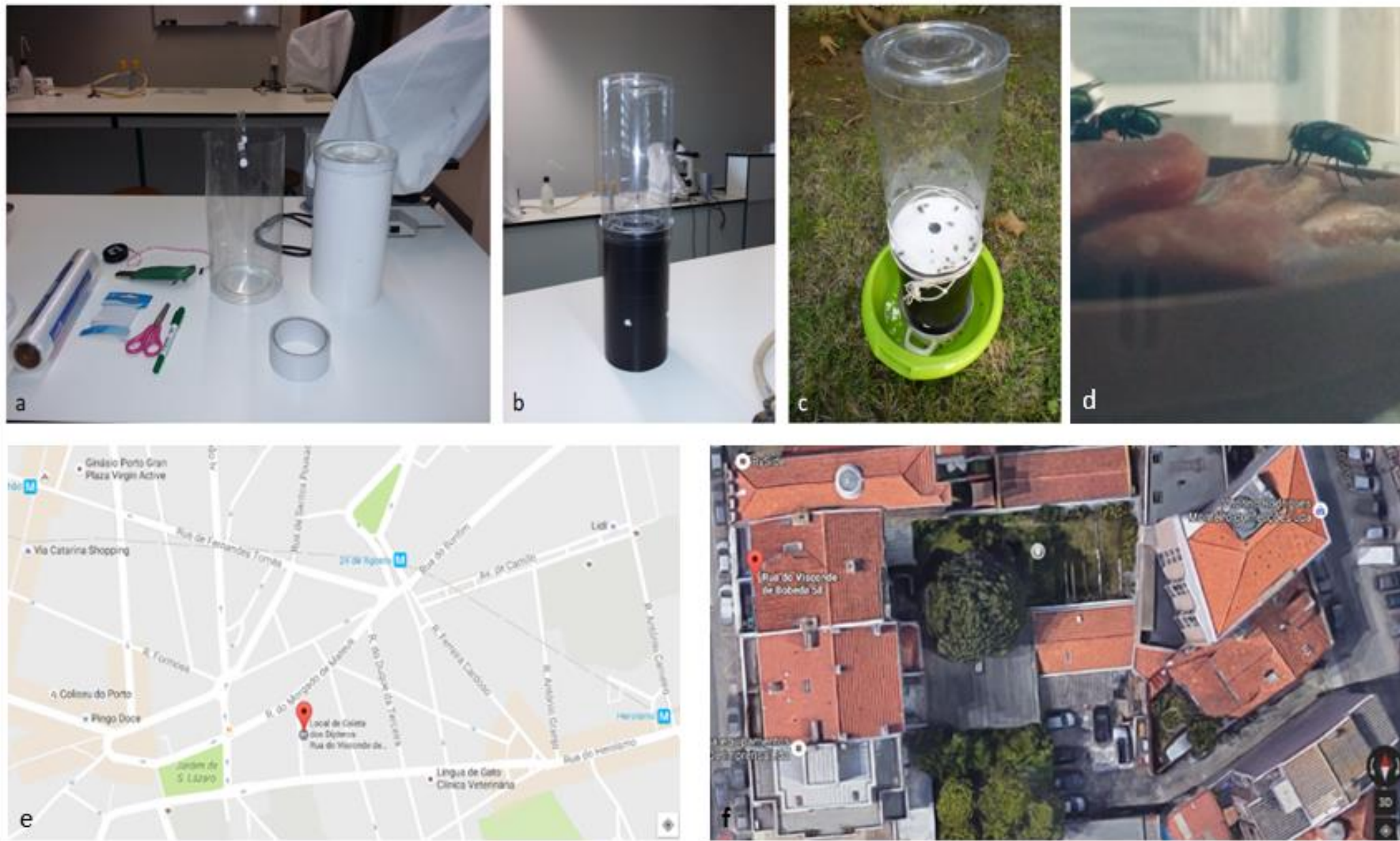


Fig. 1: a) Material utilizado na montagem das armadilhas para captura dos dípteros, b) Protótipo das armadilhas utilizadas, c) Armadilha exposta na natureza com isco em seu interior, d) Moela de frango utilizada como isco, e) Localização geográfica onde as armadilhas ficaram expostas.

No laboratório, os ovos foram retirados dos iscos com o auxílio de uma pinça e transferidos para 500g de moela fresca (**figura 2-a e 2-b**), acondicionadas num recipiente plástico de 500 mL para que as larvas ao eclodirem pudessem se alimentar até o seu desenvolvimento larvar total (**figura 2-c e 2-d**). Após esta fase, as larvas, por serem fotofóbicas, procuram locais escuros para pupar, deste modo, após o abandono das larvas da dieta, estas foram transferidas para recipientes de vidro contendo serragem até à fase pupar final (**figura 3-a**).



Fig. 2: a) Recipiente contendo os ovos coletados no Porto, b) Aumento em 10× dos ovos coletados, c) Recipientes preparados para receber a dieta com os ovos e d) Ovos incubados com dieta moela de frango para desenvolvimento larvar.

Após a fase de pupa os recipientes de vidro foram colocados abertos dentro de gaiolas transparentes de polietileno (40x30x20cm), com abertura na parte superior frontal e coberta com tela para ventilação dos insetos (**figura 3-a e 3-c**). Após o nascimento dos dípteros, foram disponibilizados, em recipientes forrados com tela de nylon (para evitar o afogamento dos insetos), 20 mL de solução de mel (fonte de

hidratos de carbono) diluídos em água a 50% e 20 mL de água para hidratação. Como proteína para alimentação e desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino, foram utilizados 50 g de moela de frango, para cada gaiola (**figura 3-d**).

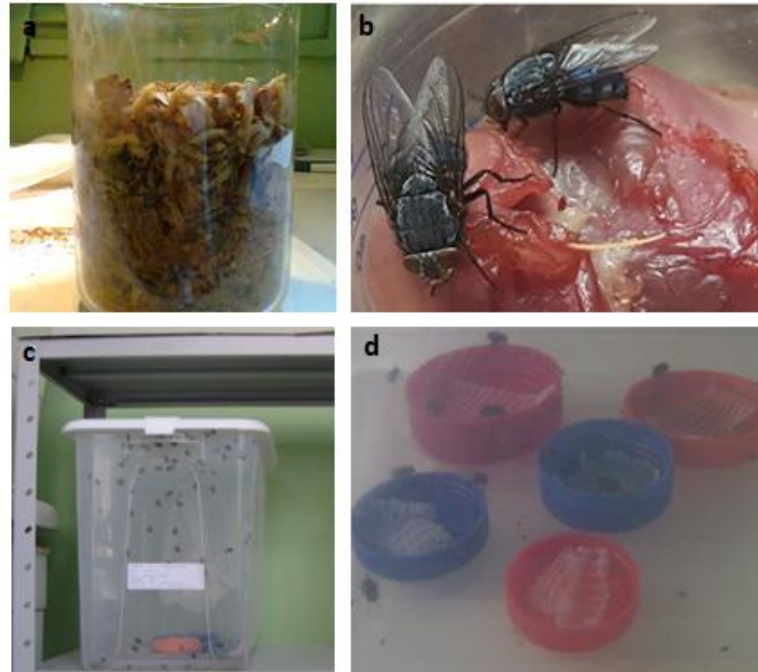


Fig. 3: a) Recipiente em vidro com larvas e pupas, b) Moscas nascidas em laboratório alimentando-se de dieta moela de frango, c) Gaiola transparente para criação dos dípteros e d) Recipientes com tela em nylon com mel a 50% e água.

2.2. Identificação

Após o nascimento das moscas em laboratório, alguns espécimes morfológicamente diferentes foram selecionados e espetados com alfinete entomológico, armazenados em caixa de esferovite e enviados para identificação morfológica no Laboratório de Estudo de Dípteros (LED), no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO). A identificação foi feita por entomologistas através da comparação anatômica entre os espécimes coletados e pela observação de chaves de

identificação de moscas da Europa e do Mediterrâneo descritas na literatura por Szpila (2009) (figura 4).



Fig. 4: Amostras dos espécimes coletados para identificação.

2.3.Ciclo Biológico de *Calliphora vicina* e manutenção da colónia em laboratório

Após a identificação dos dípteros, foram estabelecidas 3 colónias (3 gaiolas) de *Calliphora vicina* com cerca de 100 insetos em cada uma. As gaiolas eram observadas diariamente e o ciclo de vida foi registado de acordo com os seguintes parâmetros biológicos: tempo de desenvolvimento larvar, pupar e adulto, média de ovos depositados pelas fêmeas, pico de oviposição, pico de abandono das larvas, pico de nascimento dos adultos e estimativa do tempo de vida dos adultos.

3.Resultados

3.1.Coleta e Identificação

Inicialmente estabeleceram-se colônias de todas as espécies de dípteros que foram coletadas. As espécies foram identificadas morfologicamente como sendo *Lucilia sericata* (figura 5-a), *Calliphora vicina* (figura 5-b), *Sarcophagidae* (figura 5-c) e *Chrysomya albiceps* (figura 5-d). Ao longo do seu desenvolvimento, foram observadas diferenças no ciclo biológico de cada espécie, o que tornou inviável a manutenção de todas as colônias.

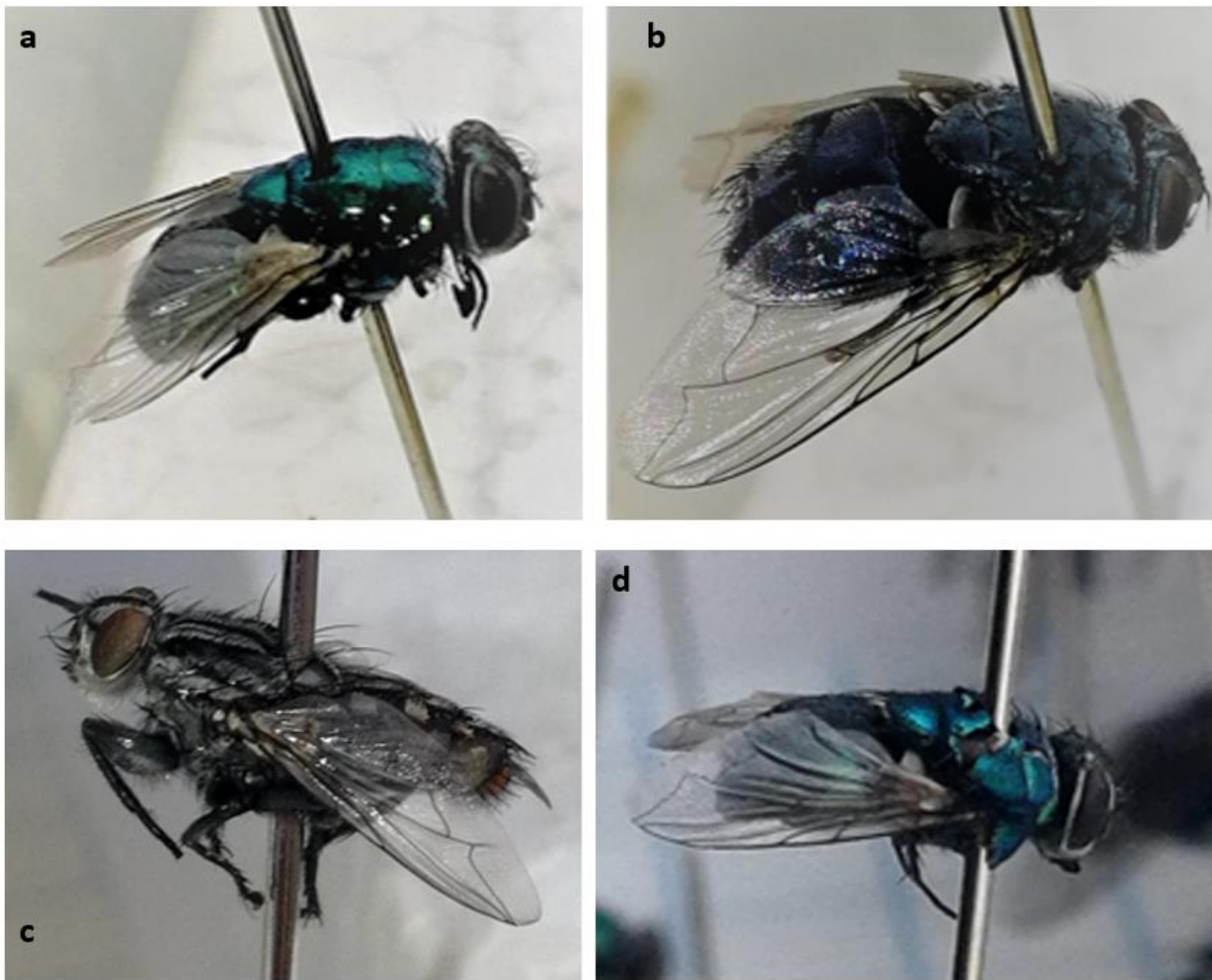


Fig. 5: Moscas identificadas no LED-Brasil: a) *Lucilia sericata*, b) *Calliphora vicina*, c) *Sarcophagidae* e d) *Chrysomya albiceps*.

L. sericata e *C. albiceps* são espécies que suportaram bem temperaturas amenas, entre 16 e 26 °C; *C. vicina* foi a espécie que melhor se adaptou a todas as estações do ano, com exceção do calor extremo (acima de 30 °C). *Sarcophagidae*, suportou os meses mais quentes, no entanto, após suas larvas passarem para o estágio de pupa, se

entraram em diapausa e conservaram assim por cinco meses (período mais frio); as pupas ficaram conservadas em recipientes de vidro com serragem, desde o mês de Outubro de 2016 até Março de 2017, em temperatura ambiente, vindo a emergir no final desse período.

3.2. *Calliphora vicina*

Calliphora vicina, conhecida como mosca da garrafa azul por causa da coloração cinza-azulada metálica de seu tórax e abdómen, tem aproximadamente 10-11 mm de comprimento e pertence ao filo Arthropoda, que se caracteriza por ter patas articuladas, corpo segmentado e exosqueleto quitinoso. Está inserida na classe Insecta, por ter três pares de patas, dois pares de asas e o corpo dividido em três regiões distintas (cabeça, tórax e abdómen). Pertence à ordem Díptera por ter um único par de asas funcional (o anterior), sendo o outro par modificado para formar halteres que auxiliam o processo de voo.

3.3. Ciclo Biológico

Trata-se de uma mosca holometabólica, ou seja, passa por uma metamorfose completa que inclui 4 fases de vida: ovo, larva, pupa e adulto. A fêmea dessa espécie oviposita cerca de 250-300 ovos de cada vez. Os ovos eclodem em larvas com cerca de 1mm de tamanho e as larvas passam por 3 fases de desenvolvimento lavar: L1 (um a dois dias de vida), L2 (dois a três dias de vida) e L3 (cerca de 4 a 5 dias de vida). As larvas abandonam a dieta geralmente no 3º dia de alimentação e tendem a abrigar-se da luz procurando lugares escuros, onde desaceleram o seu metabolismo e iniciam a fase de pré-pupa (um dia) até se tornarem pupa. De modo geral, cada fase dura cerca de 24 horas até chegar ao estadió de pupa que acontece cerca de 5 dias após a eclosão das

larvas. O ciclo total dura em média cerca de 20 dias até à emergência dos adultos (**figura 6**).

O desenvolvimento deste díptero está diretamente relacionado com a temperatura, ou seja, quanto mais elevada for a temperatura, menor será a duração de cada fase. Deste modo, o ciclo total pode variar entre 15 a 30 dias. Após o nascimento do díptero, são necessários ainda 5 dias para a maturação do ovário da fêmea, pelo que neste período é fundamental que a mosca se alimente de um substrato proteico.

A fêmea desta espécie começa a ovipor a partir do 6º dia de nascimento, caso tenha recebido gametas em seu ovário. O pico de oviposição ocorre geralmente após o 14º dia de nascimento dos dípteros; as fêmeas colocam massas de ovos até 5 vezes por dia. Esse pico pode durar cerca de duas semanas e é importante para a obtenção de grande quantidade de material para estudo, assim como para a reposição da colónia.

Para a manutenção das colónias de dípteros no laboratório, após a 5ª geração, é importante inserir insetos selvagens (coletados da natureza) dentro das gaiolas com as moscas existentes. Isto se deve ao facto de que após 5 gerações, o cruzamento entre parentes pode acarretar prejuízos para devido a erros genéticos transmitidos aos descendentes. A contagem das gerações inicia-se a partir da geração selvagem ou G0 (geração zero) que é aquela que vem da natureza como ovo e nasce no laboratório. A geração que nasce da G0 é chamada de G1 (primeira geração) e assim consecutivamente. As moscas vivem cerca de 60 dias, à temperatura ambiente, sob condições laboratoriais.

As larvas de *C. vicina* são muito resistentes ao frio, conseguindo sobreviver à temperatura de -1 °C. Num simples ensaio, após extração da NES, foram armazenadas cerca de 280 larvas em 3º estadio em uma garrafa tipo PET, à temperatura de -1 °C, onde verificou-se que as larvas ainda permaneciam viáveis após dois meses

armazenadas no frigorífico. As larvas, ao entrarem em contacto com a temperatura ambiente, voltaram a movimentar-se, saindo do estado letárgico em que se encontravam.

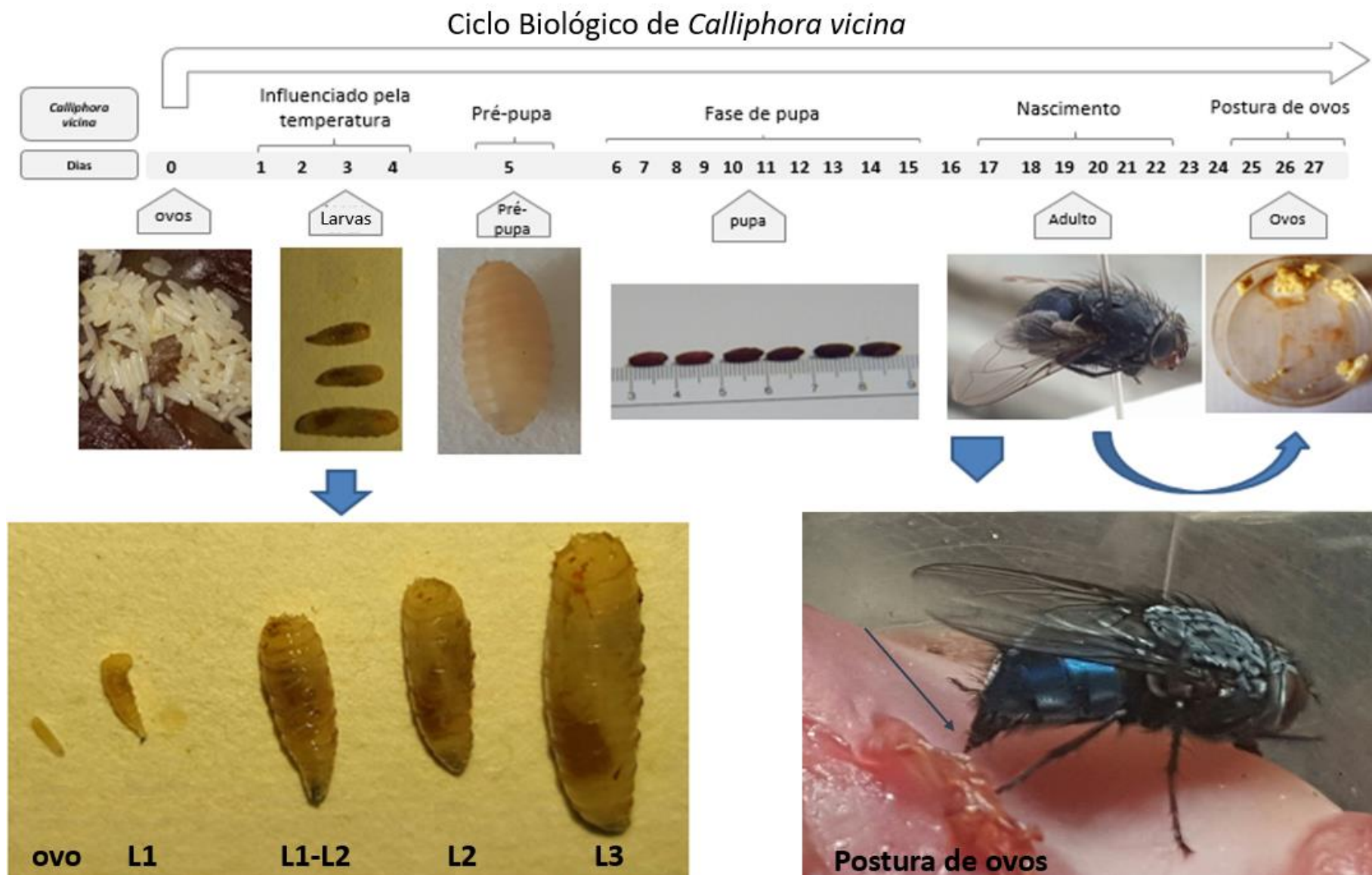


Fig. 6: Esquemática do ciclo biológico de *Calliphora vicina* desde o ovo até a fase adulta e oviposição, com duração total de 27 dias.

4. Discussão

C. vicina adaptou-se bem a todas às condições laboratoriais e resistiu a todas as estações do ano, facilitando o estabelecimento de colónias e a sua manutenção. O mesmo foi observado com outras espécies de califorídeo em países frios ou tropicais, tais como *L. sericata*, *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria* (Sheram *et al.* 2007, Ferraz *et al.* 2011, Dallavecchia *et al.* 2015).

Santos *et al.* (1996) ao criarem larvas de *C. megacephala* observaram um pico de abandono no terceiro dia, semelhante ao do presente estudo. Já a duração entre a postura e a eclosão das larvas aumentou com a redução da temperatura, esse fato também foi observado nos estudos feitos com *C. vicina*.

A longevidade total dos insetos criados no nosso laboratório não apresentou diferença da longevidade de *C. megacephala* criada por Dallavecchia *et al.* (2015), mostrando duração média de 60 dias, o que é comum para os califorídeos.

Ao longo das gerações é indispensável inserir novos indivíduos nas gaiolas, devido ao cruzamento entre irmãos, o que pode ser visivelmente notado após 5 gerações em laboratório. É perceptível a diferença entre a primeira geração e as subsequentes, havendo uma diminuição no tamanho das larvas, pupas e, conseqüentemente no tamanho das moscas, acarretando prejuízos à colónia.

A temperatura é fundamental para a manutenção da maioria dos dípteros. Dias *et al.* (2009), verificou que as larvas não passam para a fase pupar em temperaturas abaixo dos 16 °C. O mesmo não foi observado neste estudo, onde até a temperatura de 10 °C as larvas conseguiam desenvolver-se até a fase adulta, porém, aumentando o tempo para completar o seu ciclo de vida.

Concluindo, *C. vicina* é uma espécie de califorídeo ideal para ser utilizado em alternativa à *Lucília sericata*, atendendo à sua prolificidade e capacidade de adaptação às condições laboratoriais.

Capítulo III

Eficácia dos raios UV-C na esterilização da superfície dos ovos de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) para uso em terapia de desbridamento por larvas.

I. Dallavecchia, L.D., Ricardo, E., Aguiar, V.M., Silva, S.A., Rodrigues, A.G. 2019 Efficacy of UV-C ray sterilization of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) eggs for use in maggot debridement therapy, *Journal of Medical Entomology*, 56:40-44

Resumo

A terapia de desbridamento de larvas (MDT - sigla em inglês para *Maggot Desbridement Therapy*) é uma técnica simples de desbridamento de feridas. É um tratamento natural licenciado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e é cada vez mais utilizado nos Estados Unidos e na Europa. Este tratamento é seguro quando as larvas têm origem em estoques de ovos esterilizados em laboratório. Este estudo descreve uma técnica simples e barata de descontaminação de ovos por radiação UV-C. Atendendo à crescente exigência por larvas medicinais em hospitais ou centros médicos, esta técnica é bastante útil uma vez que produz ovos livres de resíduos químicos e é de fácil manuseamento. Três tratamentos (T1, T2, T3) envolvendo 3, 6 e 12 min. de exposição aos raios ultravioleta (UV-C), respetivamente, foram comparados. A esterilidade dos ovos foi avaliada por uma cultura de caldo tioglicolato, incubado a $32 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ em condições aeróbias até 14 dias. O tratamento T3 (12 min de exposição) apresentou resultados eficientes no processo de esterilização por radiação UV-C. A viabilidade larval foi de 57%, a viabilidade pupar foi de 54% e a emergência dos adultos foi de 54%. A razão sexual foi de 50%, dentro dos valores esperados. Não houve alterações morfológicas nas moscas associadas ao tratamento com UV-C. Concluindo, a esterilização por raios UV-C é indicada para a obtenção de larvas estéreis destinadas à MDT.

Palavras-chave: descontaminação, esterilização física, terapia com larvas, raios UV-C

1.Introdução

A resistência aos antibióticos é um problema global, sério e crescente. Pacientes com feridas infectadas por bactérias resistentes apresentam alto risco de amputação ou mesmo morte, especialmente se forem feridas associadas a doenças coexistentes, como diabetes, grandes queimaduras e úlceras de pressão. Esses tratamentos são extremamente caros, em particular, devido aos longos períodos de hospitalização necessários (WHO 2017). O desbridamento cirúrgico da ferida infectada envolve a remoção mecânica de tecido desvitalizado sendo, por vezes, a única opção disponível, uma vez que a preparação do leito da ferida requer a remoção de tecidos necróticos infectados com bactérias e / ou biofilme, expondo assim o tecido saudável para receber o tratamento mais adequado até a cura (Fowler e Van Rijswijk, 1995).

As larvas medicinais realizam um desbridamento bastante meticuloso, associado ao seu processo de alimentação. O seu aparelho bucal tem ganchos que, durante a alimentação, rasgam o tecido necrótico e libertam sucos digestivos contendo enzimas proteolíticas, liquefazendo a ferida que é então sugada pelas larvas. Este processo é capaz de eliminar pequenos fragmentos do tecido (incluindo ossos); as larvas realizam uma espécie de microcirurgia, chegando a zonas da ferida onde nenhum outro tratamento consegue (Nitsche *et al.* 2010). As enzimas e pequenos peptídeos libertados pelas larvas da mosca, têm forte ação antimicrobiana e destroem as bactérias (Cerovsky e Bém, 2014).

A MDT foi aprovada pela *Food Drug Administration* (FDA) em 2004 como uma terapia alternativa para o desbridamento de feridas e desde então tem sido usada por vários profissionais de saúde como um tratamento de primeira linha (Teick e Myers 1986, Mumcuoglu *et al.* 2001, Sherman 2014, Nassori e Hoomand 2017). Inúmeros ensaios clínicos e pesquisas básicas foram publicados na literatura médica e científica desde 1995 e foi desde esse ano também que as larvas medicinais passaram a ser

produzidas nos EUA, em Israel e no Reino Unido. Até 2002, mais de uma dúzia de laboratórios produzem kits com larvas medicinais, em 2011 estimou-se que 50.000 kits com larvas tenham sido produzidos por pelo menos 24 laboratórios e enviados para mais de 30 países. (Sherman *et al.* 2013)

Algumas espécies de moscas da família Calliphoridae podem causar miíase primária, isto é, colocar ovos na pele saudável, alimentando-se de tecido viável, como por exemplo, o género *Cochliomyia*. Já na miíase secundária, as moscas são atraídas pelo cheiro do tecido necrótico da ferida. MDT envolve a inserção intencional de larvas com cerca 1 dia de vida (L1), previamente estéreis, em feridas difíceis de cicatrizar (Guimarães e Pavavero, 1999). Cada larva é capaz de remover 25 mg de material necrótico em até 24 h (Mumcuoglu *et al.* 2001). A espécie mais utilizada na MDT é *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Baer 1931, Sherman 2003, Contreras *et al.* 2005), mas outras espécies pertencentes a esta família foram também utilizadas: *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) (Baer 1931), *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Aaron *et al.* 2009), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826) (Leclercq 1990), *Calliphora vicina* (Robineau Desvoidy, 1830) (Teick e Myers 1986) e *Phormia regina* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Reames 1988).

C. vicina (Robineau-Desvoidy 1830) é uma espécie de mosca originária da região holártica, sendo muito comum em Portugal. É frequentemente encontrada em áreas urbanas (Smith 1986, Byrd e Castner 2010). Apresenta alta capacidade reprodutiva de massa de ovos, desenvolve-se bem sob condições laboratoriais, é uma mosca necrobiontófaga, possuindo características essenciais para uso em MDT.

Quando o médico-cirurgião William Baer (1931) começou a usar MDT para limpar feridas, alguns dos seus doentes desenvolveram tétano. Ele concluiu que para evitar isso os ovos das moscas precisavam ser esterilizados antes da eclosão das larvas.

Desde então, muitas metodologias têm sido utilizadas para esterilização dos ovos, a maioria das quais envolve o uso de hipoclorito de sódio, frequentemente associado ao ácido bórico (Sherman *et al.* 2014).

Métodos alternativos de esterilização, como por exemplo raios UV-C, têm sido usados em diferentes setores como a indústria alimentar (Ingram e Roberts 1980, Faria 2001). Para que a desinfecção /esterilização de um produto por raios UV seja eficiente, deve-se ter em atenção a intensidade de radiação, o tempo de contato com os microrganismos, assim como o material a ser utilizado na embalagem.

Os raios ultravioletas dividem-se em diferentes comprimentos de onda e tradicionalmente são apresentados como: UV-A - 315 e 400 nm, principal responsável pelo fotoenvelhecimento, afetando negativamente a elasticidade natural da pele e agravando fotodermatoses, como o lúpus eritematoso e a erupção polimorfa à luz solar. UV-B - 280 e 315 nm estimula a produção da vitamina D₃ (colecalfiferol), envolvida no metabolismo ósseo e no funcionamento do sistema imunológico no organismo. Também interage diretamente com o DNA, produzindo mutações nos dímeros de pirimidina que estão associadas ao cancro da pele não-melanoma (carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas). UV-C - 200 e 280 nm, pode causar mutações genéticas, porém, a radiação é praticamente toda retida pela camada de ozono. UV-V (vazio) - 100 e 200 nm, é fortemente absorvido pela água e pelo ar, e só pode ser transmitido no vácuo (Balogh *et al.*2010).

A camada de ozono absorve 100% da radiação UV-C, 90% da radiação UV-B e quase nada da radiação UV-A. Desse modo, para utilizar a radiação UV-C adequadamente, são necessárias fontes artificiais como lâmpadas, usadas geralmente para desinfecção do ar, água ou superfícies e esterilização de certos materiais. Os raios

UV-C são absorvidos por alguns materiais específicos, tais como polietileno, polipropileno, polibutileno, etileno-acetato de vinilo, nylon e álcool etileno-vinílico.

O processo de esterilização dos ovos deve ser eficaz e ter uma razão custo × benefício vantajosa em relação ao tempo gasto no procedimento. Os raios UV-C não deixam resíduos, em comparação com a esterilização feita por agentes químicos, tais como a formalina 5% e o hidróxido de sódio 1%, sulfito de sódio 2,5% acrescido de formaldeído 2,5%, ortoftaldeído, fenol 3%, hipoclorito de sódio 0,5%, Glutaraldeído 2% (Simmons 1934, Mumcuoglu *et al.* 1999, Contreras *et al.* 2005, Sherman *et al.* 2007, Dallavecchia *et al.* 2014).

Os raios UV-C atuam de forma rápida, sendo eficientes e seguros; uma lâmpada UV-C com 254 nm de comprimento de onda de luz tem atividade germicida. Os raios UV-C possuem uma eficácia de radiação de cerca de 99,99% contra microrganismos em geral, sendo altamente letais para bactérias, vírus, fungos e protozoários, requerendo apenas alguns minutos para esterilizar os materiais (ICMSF, 1980).

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência dos raios UV-C na esterilização da superfície de ovos de *C. vicina*, uma mosca abundante em Portugal, fácil de criar em laboratório e com potencial para uso em MDT.

2. Materiais e métodos

2.1. Colónia de Dípteros

Uma colónia de *C. vicina*, mantida no Laboratório de Estudo de Dípteros do Serviço de Microbiologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, foi utilizada. As moscas eram mantidas em três gaiolas diferentes, feitas a partir de material de polietileno (40 × 30 × 20), transparentes com aberturas superiores e frontais para arejamento. Os insetos foram mantidos, numa sala

com ventilação, à temperatura ambiente e com luz natural com fotoperíodo de 10 horas dia e 14 horas noite; como o estudo foi realizado no período de inverno, as horas de luz eram menores.

2.2.Comida e Substrato

A dieta larvar oferecida diariamente aos insetos adultos era baseada em hidratos de carbono (mel diluído em água numa proporção de 1:2). Para a hidratação, eram oferecidos 3 recipientes com 20 ml de água (também trocada diariamente) por cada gaiola contendo cerca de 100 indivíduos. Nos primeiros cinco dias após o nascimento da colônia, foi oferecida uma dieta rica em proteína, moela de frango (Dallavecchia *et al.* 2015) para induzir a maturação dos ovários das fêmeas. Esta dieta também foi utilizada como substrato para as moscas depositarem os seus ovos.

2.3.Colheita dos ovos

Para estimular a oviposição 12h antes do início de cada experiência, foram colocadas 12g da dieta de moela de frango em cada gaiola (n = 3). Uma gaiola foi selecionada e as massas dos ovos foram transferidas com a ajuda de uma pinça estéril para uma placa de Petri contendo 1 ml de água destilada estéril para dissociar os ovos. Desta massa, 90 ovos foram selecionados com o auxílio de um pincel húmido estéril e distribuídos para quatro caixas de polipropileno com três divisórias internas (triplicado), colocando-se em cada uma 30 ovos. Para cada tratamento com exposição aos raios UV-C foi utilizada uma caixa de polipropileno e uma caixa como controlo, sem exposição aos raios UV-C (**figura1**).

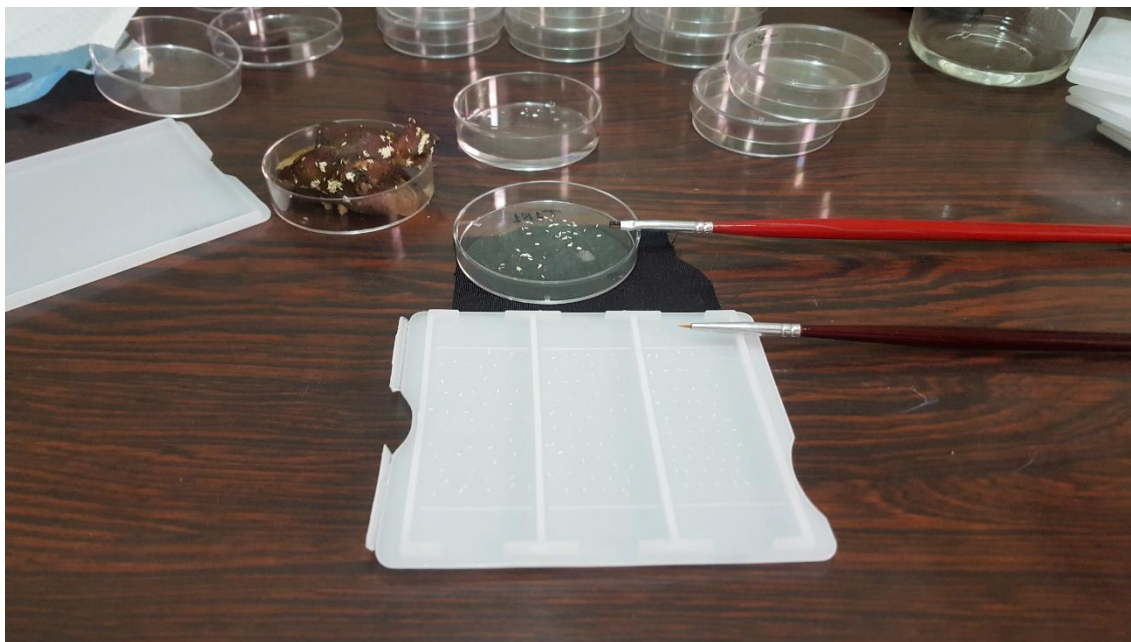


Fig. 1: Ovos transferidos para caixas de polipropileno com 3 divisões internas.

2.4.Tratamento de Esterilização

Foram realizados três tratamentos: T1, T2, T3, nomeadamente em 3, 6 e 12 min de exposição, respetivamente, e um controle sem exposição a radiação UV-C (25W - comprimento de onda da lâmpada - 254 nm - Phillips), a uma distância de 50 cm da fonte luminosa. A distância da fonte foi calculada segundo o ICMSF (1980), que determina que para ser germicida, uma lâmpada de 50 W, deve estar posicionada a pelo menos 1 m de um alvo, o que gera uma intensidade de $100 \text{ mW} / \text{cm}^2$ (**figura 2**).



Fig. 2: Câmara de Fluxo laminar com lâmpada UV-C utilizada nas experiências.

Seguindo as normas da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010) para produtos sólidos, foram separados três ovos de cada tratamento e incubados em tubos contendo 5 mL de caldo tioglicolato (Oxoid Ltd, Reino Unido) para confirmar a eficácia da esterilização. Os tubos foram incubados a $32\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ em aerobiose, verificando-se 24h após o início da incubação indícios de crescimento bacteriano; essa verificação foi repetida diariamente por um período de 14 dias. Todas as experiências foram conduzidas numa cabine de segurança biológica de classe tipo II e os ensaios foram realizados em triplicado.

Para avaliar a viabilidade das larvas, os restantes ovos ($n = 27$, por grupo) esterilizados por radiação UV-C e o controle, foram transferidos para 30 g de dieta de moela de frango na proporção de 1 g de dieta por larva para avaliar o desenvolvimento larvar. Os ensaios decorreram à temperatura ambiente.

As larvas, após abandonarem a dieta, foram pesadas individualmente em balança analítica. Os espécimes foram transferidos para tubos de ensaio (20 × 200 mm) contendo 1 g de substrato estéril (feno) para pupariação e foram rotulados de acordo com cada tratamento. As observações foram realizadas diariamente e sempre à mesma hora - 12 h - até o nascimento dos insetos.

Para determinar que os raios UV-C não causaram danos aos insetos, os seguintes parâmetros biológicos foram analisados: massa corporal; duração de desenvolvimento larvar; anormalidade e razão sexual (RS). A RS foi obtida da seguinte forma: $RS = F / M + F$, onde F é o número de fêmeas e M é o número de machos.

3. Análise Estatística

Os testes qui-quadrado e exato de Fisher foram usados para comprovar a independência entre as variáveis qualitativas. Para a análise do peso das larvas, testes não paramétricos (Kruskal Wallis) foram escolhidos após a hipótese de normalidade ter sido rejeitada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em todos os testes, foi considerado um nível de significância de 0,005. A análise foi efetuada no programa R versão 3.4.4.

4. Resultados

A eficácia do tratamento com raios UV-C foi comprovada pelo teste de esterilidade indicado pela farmacopeica, utilizando caldo tioglicolato. Os tratamentos 1 e 2, com exposição à radiação UV-C por 3 e 6 min., não foram eficazes, como comprovado pelo teste de esterilidade microbiológica (em triplicado); observou-se turbidez nos tubos, indicando crescimento de microrganismos (**figura 3-a e 3-b**). O tratamento 3, com exposição à radiação UV-C por 12 min. mostrou-se eficaz uma vez

que não havia sinais de turbidez nos tubos tratados, indicando ausência de crescimento bacteriano (**figura 3- c, 3-d e 3-e**).

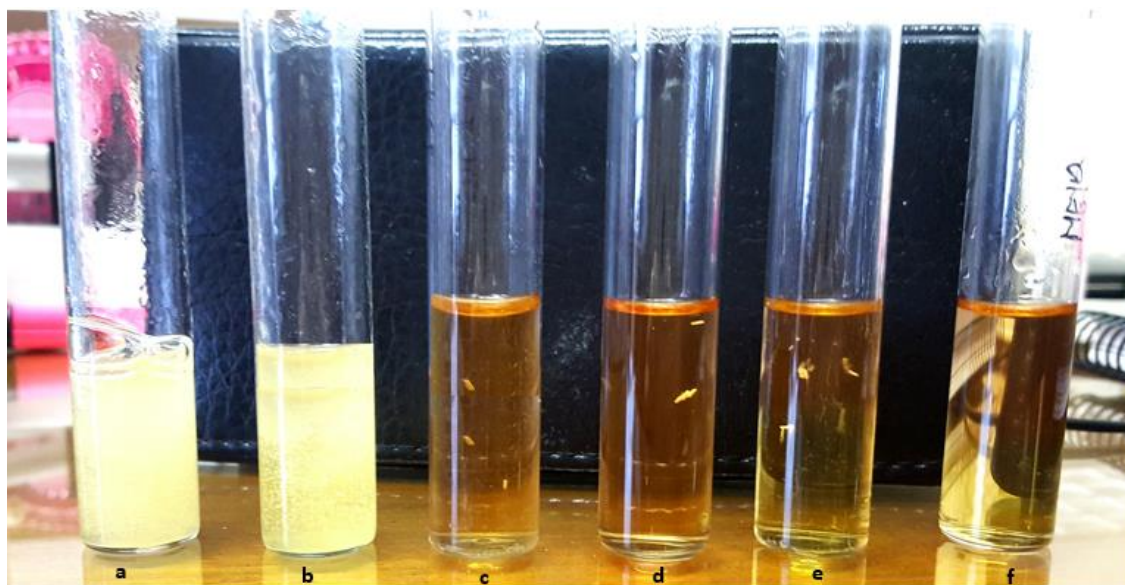


Fig. 3: Testes de esterilização com caldo tioglicolato. Tubo (a) e (b), uma réplica do tratamento 1 e do tratamento 2, respetivamente; tubos (c, d e e - 3 réplicas), expostos ao tratamento 3; tubo (f) contendo apenas meio de cultura, para comparação de transparência do meio (controlo negativo).

Considerando a massa corporal das larvas, tanto o controle, T1 e T2 apresentaram uma média de 0,100 g para todas as larvas, sem variabilidade nestes tratamentos. T3 apresentou um peso médio de 0,104 g e desvio-padrão de 0,0143, devido a quatro larvas que apresentaram pesos superiores (0,125 g, 0,135 g, 0,150 g e 0,175 g). Contudo, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P = 0,01235$) a diferença de peso das larvas nos diferentes tratamentos e controlo não foi estatisticamente significativa.

O pico de abandono das larvas, de pupariação e de emergência dos adultos de *C. vicina* nos três diferentes tratamentos e controlo são mostrados na **figura 4**, onde não houve diferenças entre os tratamentos testados e o controlo. O pico de abandono larvar ocorreu no sexto dia após a transferência dos ovos para a dieta. A pupariação ocorreu no sétimo dia e o nascimento dos adultos no 20º dia.

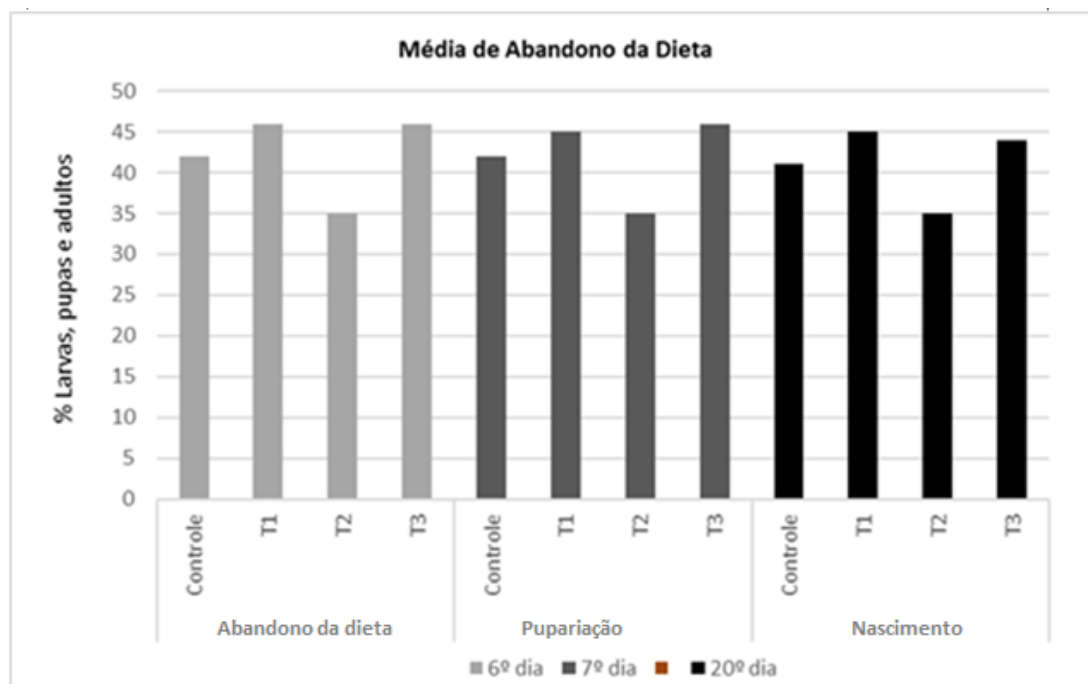


Fig. 4: Taxa de abandono (%) de larvas de *Calliphora vicina* na pupariação e nascimento nos três tratamentos e controle (27 larvas por repetição). Controle = sem exposição aos raios UV-C; T1 = 3 min de exposição aos raios UV-C; T2 = 6 min de exposição aos raios UV-C e T3 = 12 min de exposição aos raios UV-C.

De acordo com o teste qui-quadrado, comparando todos os tratamentos e o controle, não houve diferença estatisticamente significativa ($P = 0,3811$) entre o número de larvas que eclodiram e o número de larvas que se desenvolveram até a fase adulta ($P = 0,3915$) (tabela 1).

Tab. 1: Viabilidade larvar, pupar e de neo-larvas do adulto de *Calliphora vicina* após exposição aos raios UV-C

Tratamento	Tempo de exposição	Nº de indivíduos			% Viabilidades		
		*Ovos	Larvas	Adultos	Larvar	Pupar	Adultos
Controle	s / exposição	81	42	41	52%	51%	51%
T1	3 minutos	81	46	45	57%	55%	55%
T2	6 minutos	81	35	35	43%	43%	43%
T3	12 minutos	81	46	44	57%	54%	54%

Quanto ao sexo dos indivíduos, os resultados (**tabela 2**) mostram mais nascimentos de machos no controle e no tratamento T2, enquanto nos tratamentos T1 e T3 os nascimentos foram semelhantes para ambos os sexos. No entanto, excluindo valores de não nascidos (NN) e utilizando o teste de qui-quadrado, de acordo com o valor de P obtido ($P = 0,5814$), as proporções sexuais encontradas nos três tratamentos e no controle não diferiram do esperado. Podemos assim concluir que o número de adultos que nasceram em cada grupo não foi afetado pela radiação UV-C.

Tab. 2: Parâmetros biológicos detalhados de ovos que eclodiram após a incubação na dieta e desenvolvimento após a esterilização com radiação UV-C.

Tratamento	No. Indivíduos por réplicas			Total	NN	% indivíduos		% Razão sexual	Normalidade	
	R1	R2	R3			M	F		Normais	Anormais
Controle	18	12	12	42	1	63	37	0,37	40	1
T1	24	16	6	46	1	51	49	0,49	45	0
T2	11	4	20	35	0	57	43	0,43	34	1
T3	11	23	12	46	2	50	50	0,50	43	1

Nota: Cada réplica tinha o valor inicial de 27 larvas, Controle = sem exposição aos raios UV-C, T1 = 3 minutos de exposição aos raios UV-C, T2 = 6 minutos de exposição aos raios UV-C, T3 = 12 minutos de exposição aos raios UV-C, NN = não nascido.

** A razão sexual (SR) foi obtida da seguinte forma: $SR = F / M + F$, onde F é o número de fêmeas e M o número de machos.

Todos os adultos (100%) submetidos ao T1 eram normais, ou seja, não apresentaram deformidades morfológicas; nos T2, T3 e controle, verificou-se um pequeno número de indivíduos com deformidades morfológicas (ausência de perna, asa quebrada). Usando o teste exato de Fisher ($P = 0,7075$), concluiu-se que não houve diferença estatisticamente significativa.

5. Discussão

A superfície dos ovos das moscas depositados na natureza encontra-se extremamente contaminada, já que as fêmeas ovipositam em dietas/tecidos em estado de

putrefação. As moscas são atraídas por matéria orgânica em decomposição para ovipor os seus ovos, e para se alimentar de proteína. Também é importante para o desenvolvimento dos ovários das fêmeas após o nascimento. (Sherman, 2000, Ferraz *et al.* 2014, Dallavecchia *et al.* 2014). Laboratórios com salas livres de germes já são adotadas em alguns países para que as moscas ovipositem ovos livres de contaminação (Sherman, 2000), porém, essa tecnologia requer recursos financeiros consideráveis para produzir larvas medicinais estéreis.

Limsopatham *et al.* (2017) testaram três agentes químicos para esterilizar ovos de *Chrysomya megacephala* e *Lucília cuprina* obtendo sucesso no processo de esterilização. No entanto, durante a eclosão das larvas, verificaram haver contaminação; segundo os autores, isto deve-se provavelmente à transferência dos ovos para o meio de cultura ou, devido ao fato dos ovos de *L. cuprina*, (confirmado em microscopia de varrimento) apresentarem sulcos onde os detergentes não podem alcançar. No caso da esterilização UV-C, esse fenômeno não ocorre, pois os raios UV-C atuam sobre a parede dos ovos uniformemente, eliminando todos os microrganismos; este fato foi comprovado pelo teste de esterilidade em caldo tioglicolato.

Masri *et al.* (2005) dissociaram os ovos de *L. cuprina* com clorexidina e depois esterilizaram com raios UV-C (comprimento de onda de 190 nm) a cada intervalo de 1 min., até 10 min. Segundo os autores, a esterilização foi eficaz entre 7 e 10 minutos de exposição. No presente estudo a dissociação dos ovos foi feita com água ultrapura e o período de tempo efetivo para a esterilização foi mais longo - 12 minutos de exposição aos raios UV-C (comprimento de onda de 254 nm). Essa diferença pode estar relacionada com o fato de que a clorexidina é por si só um desinfetante, enquanto a água não interfere com a carga microbiana dos ovos.

A massa corporal das larvas não variou significativamente nos tratamentos realizados (exceto em T3). Esta homogeneidade no peso das larvas está relacionada com a dieta moela de frango. Em uma experiência anterior (Dallavecchia *et al.* 2015), ao comparar duas dietas (carne bovina e moela de frango) observaram o mesmo padrão de homogeneidade.

A taxa de abandono não variou; larvas, pupas e nascimento de adultos atingiram o pico no mesmo dia em todos os tratamentos (6, 7 e 20 respectivamente). O mesmo foi observado no trabalho de Dallavecchia *et al.* (2014), em que os ovos de *Chrysomya putoria* foram esterilizados com glutaraldeído a 2%. Esta constância no desenvolvimento de insetos também pode estar relacionada com a dieta de moela de frango, sendo vantajoso para a produção em larga escala.

Nos ensaios efetuados, a taxa de eclosão larvar foi maior do que 40%, ao contrário de Masri *et al.* (2005), que apresentaram uma viabilidade de 14 a 16%. Os autores afirmaram que os raios UV-C podem ter destruído os embriões dentro dos ovos; entretanto, a clorexidina usada pode ter sido responsável pelo ressecamento da superfície dos ovos, impedindo que as larvas eclodissem.

De acordo com testes qui-quadrado e exato de Fisher (1930), uma população só mostra estabilidade quando a RS é de 1: 1, ou seja, 50% de machos e 50% de fêmeas. Neste estudo, a razão sexual dos indivíduos testados nos três tratamentos com a radiação UV-C e o controle indicaram estabilidade populacional. Ainda de acordo com Fisher, um desvio nesta RS não é evolutivamente favorável, porque aumentos graduais ocorrerão nas gerações futuras, em relação à proporção do sexo observada em menor número. A maioria dos clínicos que utilizam a terapia larvar, adquire as larvas medicinais de grandes laboratórios (van Der Plas *et al.* 2009); aqueles que fazem as suas

próprias produções não costumam descrever parâmetros biológicos de suas moscas, como massa, RS ou viabilidade.

Apenas T1 produziu 100% dos indivíduos adultos normais (T2, T3, e controle = 99%), no entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa. Ferraz *et al.* (2014), testaram diferentes concentrações do antibiótico ciprofloxacina no desenvolvimento de *C. putoria* (Diptera: Calliphoridae) e apresentaram 100% de normalidade para o controle, T1 = 96%, T2 = 98% e T3 = 99%, semelhante aos valores encontrados no presente estudo. A saída do adulto da pupa acontece através de uma alternância entre dilatação e contração do líquido de *ptilinum*, localizado na cabeça, que quebra o pupário, permitindo o deslocamento da pupa para fora (Smith 1986, Gennard 2007). Durante esta fase, algumas moscas não conseguem completar este processo sem perda de material. Este fato pode explicar as anormalidades mencionadas (duas moscas com uma asa quebrada e outra sem perna), retirando a hipótese de tal resultar de efeitos mutagênicos pela ação dos raios UV-C.

A esterilização por raios UV-C é amplamente utilizada na indústria alimentar (Ingram e Roberts 1980, Faria, 2001) para desinfetar vários tipos de produtos e seus recipientes. Também tem sido utilizada para inativar ovos de insetos parasitas (Brownell *et al.* 2006). É um método eficiente de esterilização, no entanto, é necessário o uso de material específico que absorva os raios UV-C assim como o controle do período de tempo ideal para esterilizar os ovos das moscas.

A esterilização da superfície dos ovos de *C. vicina*, utilizando raios UV-C demonstrou ser um método válido e eficiente. Este processo físico de esterilização apresentou várias vantagens, nomeadamente os baixos custos operacionais, não deixou resíduos químicos nos ovos das moscas, é rápido e este fato pode vir a atender à

crecente demanda de produção em larga escala de larvas para estudos, tanto das excreções e secreções das larvas, assim como para a terapia larvar.

Capítulo IV

Atividade antibacteriana e antifúngica das excreções e secreções de *Calliphora vicina*.

II. Dallavecchia, L.D., Ricardo, E., Silva, A.S., Rodrigues, A.G. 2020 Antibacterial and antifungal activity of excretions and secretions of *Calliphora vicina*, *Medical and Veterinary Entomology*, doi: 10.1111/mve.12486

Resumo

Bactérias resistentes a antibióticos representam uma grande ameaça à saúde global no século 21, exigindo uma resposta rápida, barata e eficaz das autoridades de saúde pública. Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana de excreções / secreções nativas (NES) produzidas por larvas de terceiro ínstar (3 dias de idade) de *Calliphora vicina* usando um protocolo adaptado do Instituto de Padrões Laboratoriais Clínicos (CLSI). Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e o fungo *Candida albicans*. Após o período de incubação, as suspensões foram diluídas e espalhadas em placas de ágar nutriente para contagem das unidades formadoras de colônias. Foi também realizado um ensaio turbidimétrico para testar a ação da NES de *C. vicina* sobre *Staphylococcus aureus*, uma espécie bacteriana muito comum, com enorme capacidade de adaptação e resistência, sendo uma das bactérias de importância médica que mais causa infecções hospitalares e comunitárias no mundo. De acordo com nossos resultados, a NES de *C. vicina* exibe atividade antimicrobiana em diferentes diluições, sendo mais eficaz sobre as bactérias gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Palavras-chave: atividade antimicrobiana, larvas de califorídeos, excreções / secreções nativas (NES), antibióticos naturais.

1.Introdução

A resistência aos antibióticos é uma das ameaças globais mais graves. De acordo com um estudo de 2016, cerca de 700.000 pessoas morrem a cada ano de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos. Os especialistas preveem que este número poderá aumentar para 10 milhões de mortes por ano até 2050 (O'Neill, 2016). Apesar da resistência bacteriana fazer parte do mecanismo natural de sobrevivência relacionado à evolução das bactérias, o uso indiscriminado de antibióticos têm acelerado esse mecanismo de ação, criando microrganismos multirresistentes.

Muitas drogas como aspirina, codeína, quinina e penicilina são feitas de compostos naturais, como plantas, microrganismos e organismos marinhos, entre outros. Extratos feitos de insetos, como abelhas, vespas, formigas, moscas, borboletas, mariposas, baratas, besouros, etc., têm sido usados como remédios populares, agindo como antialérgico, anti-inflamatório, analgésico, antimicrobiano, antiviral e até contra células cancerígenas (Ratcliffe *et al.* 2011).

Chernysh *et al.* (2015) realizaram um estudo para comparar o desenvolvimento da resistência de bactérias tratadas com antibióticos convencionais e com antimicrobianos derivados de insetos, nomeadamente Díptera, ao longo de múltiplas gerações. Os autores observaram que já nas gerações iniciais, as bactérias tratadas com antibióticos convencionais adquiriram resistência, o mesmo não foi observado com o tratamento feito com antimicrobianos derivados de insetos. Isso mostra que os antimicrobianos de insetos são uma alternativa eficiente para a criação de novos antibióticos no futuro.

Moscas da família Calliphoridae são necrófagas e, devido aos seus hábitos alimentares e por serem decompositores naturais de matéria orgânica, ao longo de seu

ciclo biológico, entram em contacto com vários patógenos. Este contato, ao longo da evolução, deve ser o principal motivo para o desenvolvimento de um sistema imunológico com alta eficiência contra numerosos microrganismos, dando aos califórídeos a capacidade de produzir e secretar substâncias antimicrobianas potentes, com elevado potencial para o desenvolvimento de uma medicina natural (Yakovleva *et al.* 2019).

As excreções e secreções de larvas de moscas são ricas em compostos naturais com numerosos metabólitos de baixo peso molecular com atividade reconhecida contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Elas também têm em sua composição proteínas como a serina protéase (semelhante à tripsina e quimiotripsina), além de outros componentes desconhecidos (Díaz-Roa *et al.* 2014).

Alguns estudos descobriram que a excreção e secreções de larvas de mosca nativa (NES) são divididas em frações moleculares ou pequenas partículas de defesa chamadas peptídeos antimicrobianos (AMPs). Contudo, para extrair esses compostos para uso de antibióticos, é necessário o uso de ultrafiltração ou separadores moleculares, que são protocolos relativamente complicados, além de aumentar os custos da produção devido ao uso de dispositivos e reagentes caros (Bexfield *et al.* 2008; Chernysh *et al.* 2015; Evans *et al.* 2015).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana da NES de *Calliphora vicina* (Robineau – Desvoidy 1830) (Diptera: Calliphoridae) em seu estado puro (sem fracionamento ou qualquer separação de seus componentes) sobre as bactérias *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e a levedura *Candida albicans*, principais microrganismos encontrados nas feridas de pacientes tratados com a terapia larval.

2.Material e Métodos

2.1.Larvas

As larvas utilizadas neste estudo são originárias da colónia estoque de *C. vicina*, criadas no Laboratório de Estudos de Dípteros da Divisão de Microbiologia, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, de acordo com metodologia desenvolvida por Dallavecchia *et al.* (2019). Larvas de terceiro instar de primeira e segunda geração de moscas nascidas em laboratório foram usadas.

2.2.Produção de excreções / secreções nativas (NES).

Após as larvas eclodirem, estas foram alimentadas com moela de frango e mantidas em temperatura ambiente até atingirem o terceiro ínstar (3 dias de idade) (Dallavecchia *et al.* 2015). Em seguida, as larvas foram transferidas para um recipiente contendo água fria (4 °C) com o objetivo de reduzir os seus movimentos para poder pesá-las em uma balança semi-analítica.

Posteriormente, o excesso de água foi drenado e as larvas foram colocadas em placas de Petri com discos de papel-filtro até a secagem completa. Em seguida, uma massa conhecida de larvas (100 g) foi colocada em um tubo cónico de centrífuga de 50mL contendo um volume de água ultrapura Milli-Q® (Milli-Q® UPW; Merck, Darmstadt, Alemanha) equivalente a 100 µL por grama de larva e foi incubado a 37 °C por 1 h. O sobrenadante, contendo a NES produzida, foi então coletado e transferido para tubos de micro-centrífuga de 1000 µL, centrifugados a 12.000 g por 10 min a 4 °C, com o objetivo de separar os detritos e o material insolúvel. O restante do sobrenadante foi esterilizado por filtração através de um filtro de membrana com poro de 0,22 µm.

Para verificar se havia contaminação, uma alíquota de 50 µL da amostra foi espalhada em uma placa com Mueller-Hinton Agar (MHA, Liofilchem, Roseto degli

Abruzzi (Te), Itália), em seguida a placa foi incubada por 24 h a 37 °C, após o período de incubação as placas foram analisadas quanto ao crescimento de colónias bacterianas. O pH da NES foi determinado (medidor de pH Consort C860, Turnhout, Bélgica) e a concentração de proteína foi quantificada usando o kit BCA (Protein Assay Reagent, Pierce, Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EUA). As amostras de NES foram armazenadas a -20 °C até a sua utilização.

2.3.Microorganismos

Os microrganismos testados foram três espécies de bactérias e um fungo. As cepas do tipo *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) e a cepa *K. pneumoniae* LM1102, assim como a levedura *C. albicans* LM026, ambos isolados clínicos, foram obtidas da coleção depositada na Divisão de Microbiologia do Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

2.4.Ensaio antimicrobianos

2.4.1.Ensaio de unidades formadoras de colónias

Dois protocolos foram adaptados para a preparação dos microrganismos: M07-A9 para bactérias e M27-A3 mais o suplemento M27-S4 para as leveduras, de acordo com o Instituto de Padrões Laboratoriais Clínicos (CLSI). Resumidamente, as bactérias foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (Te), Itália) e as leveduras em Agar Sabouraud (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (Te), Itália), e em seguida foram incubadas a 37 °C por 24 h.

Para cada microrganismo, de acordo com os protocolos citados acima, as colónias isoladas foram selecionadas e uma suspensão foi preparada na escala de densidade 0,5

McFarland (densidade celular aproximada de 1×10^8 UFC / mL). A suspensão microbiana foi preparada com um inóculo de tamanho 1×10^6 UFC / mL para bactérias e 1×10^3 UFC / mL para *C. albicans*.

A NES com concentração de proteína de 306,45 $\mu\text{g} / \text{mL}$ foi diluída serialmente em 50%. A concentração usada nos ensaios com bactérias foi diluída dez vezes (1/2 a 1/1024) e para *C. albicans* nove vezes (1/2 a 1/512). Cem microlitros de cada diluição de NES e 100 μL de inóculo microbiano foram misturados em uma microplaca de 96 poços, em triplicata. As microplacas foram incubadas a 37 °C e os resultados foram lidos após 24 h. Após o período de incubação, 50 μL da cultura de cada poço foi semeado em MHA para bactérias ou em Sabouraud Agar para *C. albicans*, em triplicata, e incubado a 37 °C. A unidade formadora de colônia (UFC) foi contada após 24 h de incubação.

2.4.2. Ensaio turbidimétrico

O ensaio turbidimétrico foi adaptado de Thomas *et al.* (1999). As cepas bacterianas foram incubadas em 10 mL de caldo de triptona soja (TSB; Merck, Darmstadt, Alemanha) durante a noite a 37 °C com agitação (150 rpm). Posteriormente, 100 μL de inóculo foram transferidos para 5 mL de meio TSB e incubados novamente a 37 °C com agitação (150 rpm), até a densidade ótica alcançar o valor de 0,200 - 0,250 com comprimento de onda de 600 nm (fase exponencial).

Em uma microplaca de poliestireno de 96 poços, 20 μL de inóculo bacteriano foram incubados com 180 μL de NES (concentração de proteína equivalente a 306,45 $\mu\text{g} / \text{mL}$), perfazendo um volume final de 200 μL em cada poço. Dois controles foram usados: para o controle positivo, 20 μL de inóculo bacteriano foram incubados com 180 μL de água estéril ultrapura Milli-Q® (substituindo a NES); para o controle negativo, 180 μL de NES foram incubados com 20 μL de TSB.

A microplaca de NES foi lida por um leitor de ELISA Tecan Sunrise (Infinite 200, Tecan Trading AG, Suíça) com comprimento de onda de 600 nm, a cada hora, por 7 horas seguidas e após 24 horas de incubação a 37 °C. O leitor agitou as placas por 5 s antes de cada leitura. Os ensaios foram realizados em triplicado.

3. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o software R, versão 1.2.1335 (RStudio versão 1.2.1335). O teste paramétrico Shapiro-Wilk foi usado para testar a suposição de normalidade. O teste de Kruskal-Wallis (teste não paramétrico) foi usado em relação a contagem de UFC e para o ensaio turbidimétrico. Em todos os testes usados, o nível de significância considerado foi $P \leq 0,05$. As experiências foram realizadas em triplicata; os dados são expressos como aritmética média \pm erro padrão da média (SEM).

4. Resultados

4.1. Características NES

A NES extraída de larvas de *C. vicina* tinha uma concentração de proteína de 306,45 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e um pH de 8,05.

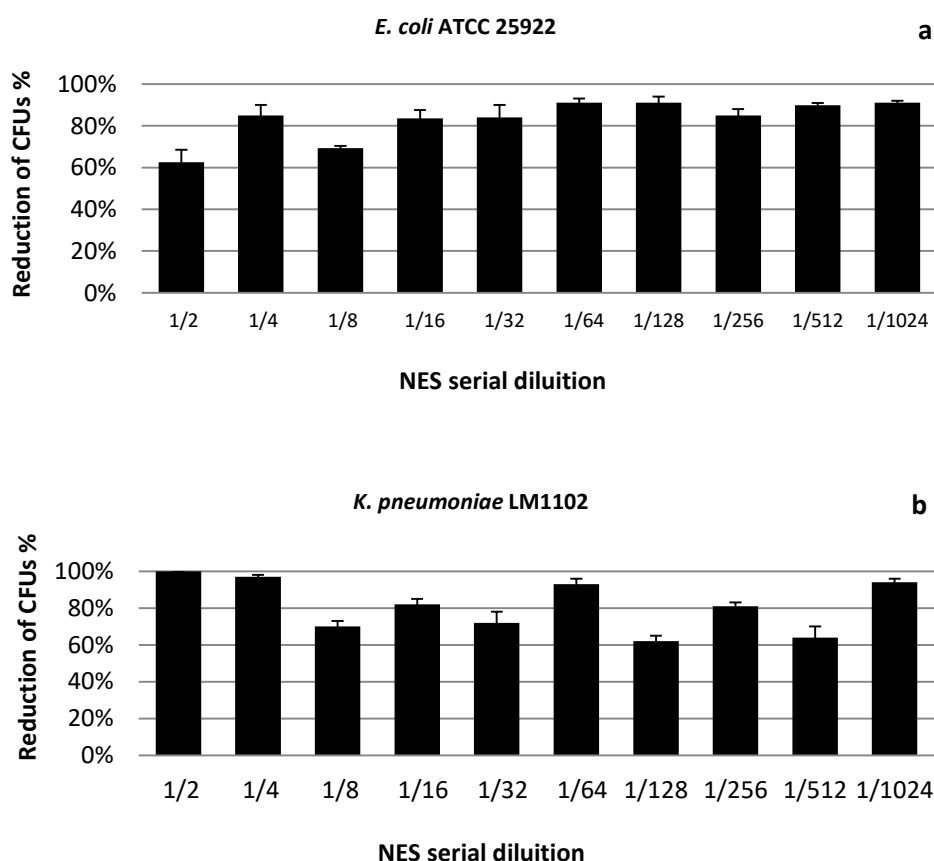
4.2. Actividade antimicrobiana

De acordo com a contagem de UFC, todas as diluições de NES (1/2 a 1/1024) mostraram inibição do crescimento bacteriano das bactérias gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae*. O fungo *C. albicans* também sofreu inibição em todas as diluições de NES testadas (1/2 a 1/512). Analisando as diferentes diluições, nenhuma diferença significativa foi observada ($P \geq 0,05$) para os microrganismos avaliados.

A **Figura-1a** mostra a inibição percentual de até 91% ($n = 3$) do crescimento de *E. coli* nas diluições de 1/64, 1/128 e 1/1024 em comparação com o controlo positivo. As

outras diluições tiveram uma inibição média que variou entre 61 e 90% (n = 3). Para *K. pneumoniae*, uma inibição de 100% (n = 3) do crescimento bacteriano foi observada com a diluição de 1/2, seguida por 97% (n = 3) com a diluição de 1/4 e acima de 80% (n = 3) para as diluições de 1/64 e 1/1024 (**figura- 1b**).

O crescimento do fungo *C. albicans* incubado com NES pode ser visto na **figura- 1c**, onde 81% (n = 3) dos microrganismos foram inibidos com a diluição de 1/64. Inibição inferior (17%, n = 3) foi observada com a diluição 1/8. Todas as demais diluições apresentaram uma redução acima de 50% do crescimento microbiano.



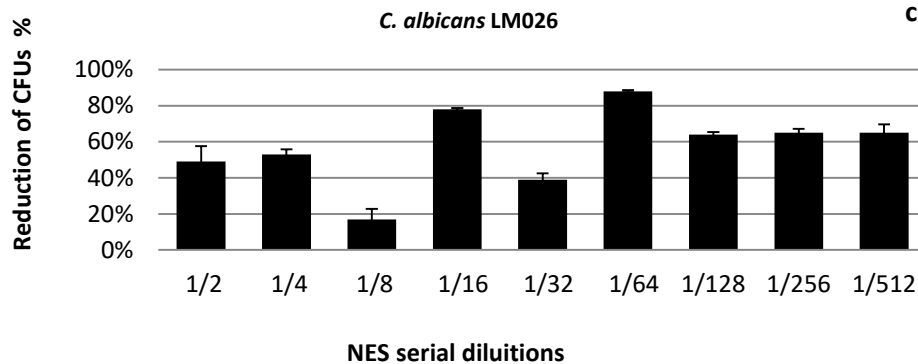


Fig. 1. Atividade antimicrobiana de excreções e secreções nativas da mosca *Calliphora vicina* determinado pela contagem de UFC de cepas bacterianas de (A) *Escherichia coli*, (B) *Klebsiella pneumoniae* e a levedura (C) *Candida albicans*. As contagens de UFC são apresentadas como valores médios (n = 3) de cada concentração obtida pela razão entre o crescimento do controle positivo (sem NES) / crescimento bacteriano na presença de NES. As barras de erro indicam o desvio padrão (P <0,05).

Em estudos anteriores (dados não publicados), observamos que a NES de *C. vicina* tem pouco efeito sobre *S. aureus*, uma espécie patogénica que causa grande preocupação aos profissionais de saúde. Devido à quantidade limitada de amostras de NES disponíveis, decidimos realizar um teste turbidimétrico para observar o crescimento de *S. aureus* com uma alta quantidade de NES em relação ao inóculo (180 µL de NES incubados com 20 µL de inóculo). A NES foi capaz de inibir esta espécie por até 4 h, onde pôde ser visto, através da curva de crescimento, que o poder de ação antibacteriano da NES diminuiu com o tempo (**figura 2**).

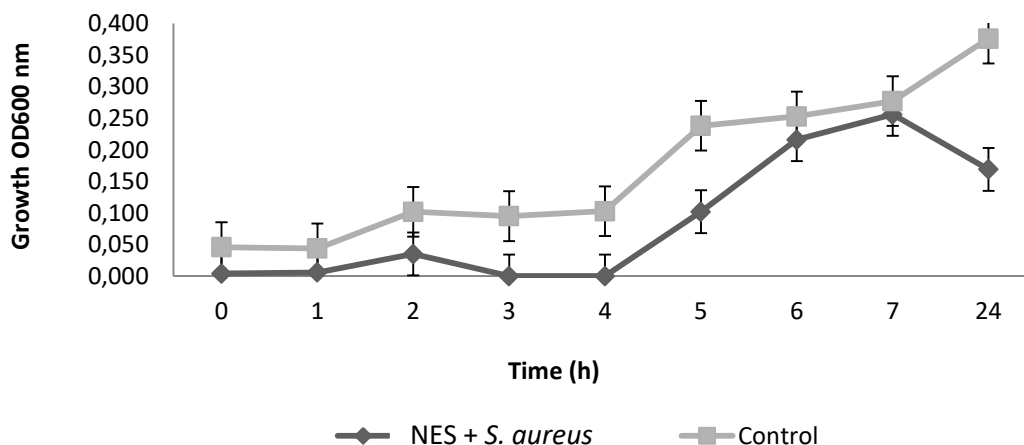


Fig. 2. Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 na presença de excreções e secreções nativas da mosca *Calliphora vicina* (concentração de proteína de 306,45 µg / mL) em comparação com o controle (sem NES). Os valores da OD600 nm são apresentados como valores médios (n = 3) e a curva de crescimento foi calculada pela razão de crescimento do controle positivo / crescimento bacteriano (OD2 / OD1) e as barras de erro indicam o desvio padrão.

5. Discussão

Em nosso estudo, todas as diluições de NES pura de *C. vicina* mostraram atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *K. pneumoniae* e *C. albicans*. Variações nos resultados foram relatadas por vários autores (Barnes *et al.* 2010; Ratcliffe *et al.* 2011; Ratcliffe *et al.* 2015) e talvez os motivos sejam fatores abióticos como dieta alimentar, estresse provocado pelas condições de laboratório (temperatura e umidade), método de extração da NES, diferentes diluentes utilizados ou devido à perda de atividade da NES pelo contaminante bacteriano LPS (lipopolissacarídeos).

Ratcliffe *et al.* (2015) relataram ter observado redução no crescimento de *E. coli* testando a NES de três espécies de Calliphoridae (*Chrysomya megacephala*, *C. albiceps* e *C. putoria*). Em contraste, Thomas *et al.* (1999) ao incubarem a NES de *Lucília sericata* com *E. coli* perceberam que a população bacteriana, além de não sofrer redução, parece ter utilizado a NES como substrato para aumentar sua população microbiana. Já Chernysh *et al.* (2015) ao analisarem peptídeos antimicrobianos de NES

fraccionada de *C. vicina* contra *E. coli* observaram alta inibição desta cepa, corroborando com os resultados encontrados em nossos estudos.

A NES pura de *C. vicina* também agiu de forma eficiente sobre *K. pneumoniae*. Resultados semelhantes foram encontrados por Bexfield *et al.* (2008), quando os autores usaram NES ultrafiltrada (moléculas <500 daltons) de *L. sericata*, no entanto, no mesmo estudo, eles observaram que a NES pura desta espécie não era tão eficiente quando comparada ao ultrafiltrado.

Quanto à atividade antifúngica, as diluições de NES menos concentradas (1/64 a 1/512) foram mais eficazes quando comparadas com as diluições de NES mais concentradas (1/2 a 1/8). Evans *et al.* (2015) também testaram a ação da NES pura de *L. sericata* e a NES fracionada (> 10 kDa, 10-0,5 kDa e <0,5 kDa), onde encontraram atividade antifúngica significativa da NES pura e somente na menor fração de NES (<0,5 kDa).

Esses resultados e os resultados de estudos anteriores mostram que ambas as formas de usar a NES, pura ou fracionada têm eficiência antimicrobiana com potenciais de ação semelhantes. A NES Pura é mais simples, rápida e barata de produzir quando comparada a NES fracionada que exige tempo de preparação em seu processo, adicionalmente precisa ainda de equipamentos e reagentes. Nos casos em que grandes quantidades de antimicrobianos são necessários, como nos casos de epidemia ou para utilização em locais com difícil acesso a equipamentos de laboratório, é essencial que um antimicrobiano seja simples e rápido de se produzir. (Thomas *et al.* 1999, Bexfield *et al.* 2004, Bexfield *et al.* 2008, Barnes *et al.* 2010).

Chaiwong *et al.* (2016), analisando a NES de *Chrysomya* incubada com *S. aureus* não observaram inibição do crescimento microbiano, mas ao contrário, houve indução do crescimento. Ratcliffe *et al.* (2015) analisando três espécies de *Chrysomya*,

observaram que houve uma redução no crescimento de *S. aureus*. Masiero *et al.* (2017), testaram a NES de *Cochliomyia macellaria* e observaram inibição de *S. aureus* apenas durante as primeiras 2 h, resultado semelhante foi observado em nosso estudo, onde *S. aureus* foi inibido pela NES de *C. vicina* por até 4 h. Por outro lado, a NES de *L. sericata* tem mostrado ser mais eficiente na redução de *S. aureus*, incluindo *S. aureus* resistente à metilina (MRSA).

Essa contradição nos resultados também foi observada por Barnes *et al.* (2010) que afirmaram que as causas podem ser diversas, variando de diferentes técnicas experimentais, tamanho dos inóculos bacterianos, bem como diferentes protocolos e diluentes usados na extração de NES. Outra hipótese seria a apresentada por Chernysh *et al.* (2015) que fracionaram a NES de *C. vicina* em 53 partes de peptídeos antimicrobianos e descobriram que 19 dessas partes foram responsáveis por uma resposta específica a um determinado microrganismo. Essas respostas específicas acontecem quando insetos entram em contacto com patógenos ao longo de suas vidas e adquirem infecções, criando defesas naturais que se desenvolvem e se acumulam na hemolinfa, produzindo AMPs complexos de defesa. Esses complexos abrangem todas as famílias principais de AMPs de insetos, como defensinas, cecropinas, dipterinas, peptídeos ricos em prolina e peptídeos antivirais alloferon.

Em conclusão, a NES de *C. vicina* apresenta elevado nível de atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-negativas como *E. coli* e *K. pneumoniae*, atividade moderada sobre *C. albicans* e atividade de curta duração sobre a bactéria gram-positiva, como *S. aureus*. Portanto, a NES de *C. vicina* pode ser considerada como um potencial antibiótico natural simples e barato de fabricar.

Capítulo V

**Atividade antifúngica de *Calliphora vicina*
(Diptera: Calliphoridae) contra *Candida glabrata*,
C. albicans e *C. parapsilosis*.**

III. Dallavecchia, L.D., Ricardo, E., Silva-Filho, R.G., Silva, A.S., Rodrigues, A.G. 2020
Atividade antifúngica de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) contra *Candida glabrata*,
C. albicans e *C. parapsilosis*, ***Brazilian Journal of animal and Environment Research***
(enviado).

Resumo

As excreções e secreções de larvas de moscas têm sido muito estudadas quanto às suas propriedades antimicrobianas contra bactérias gram positivas e gram negativas, porém, existem poucos estudos relatando a atividade antifúngica das larvas. Deste modo, o objetivo deste estudo foi analisar a ação antifúngica das excreções e secreções de larvas nativas (NES) de *Calliphora vicina* sobre 3 espécies de fungos: *Candida glabrata*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Fungicida Mínima seguida da contagem das unidades formadoras de colônias. A NES de *C. vicina* exibiu atividade antifúngica eficiente sobre *Candida glabrata*, uma espécie de fungo com alto índice de resistência, pouca atividade sobre *C. albicans* e nenhuma atividade sobre *C. parapsilosis*.

Palavras-chave: atividade antifúngica, *Calliphora vicina*, antibióticos naturais, extração de excreção / secreção, teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

1.Introdução

Infeções fúngicas, nomeadamente, provocadas pelo género *Candida*, afetam essencialmente indivíduos com o sistema imunológico comprometido, são geralmente, de evolução lenta e podem afetar diversas áreas do corpo, atuando de forma sistémica ou apenas numa área, como uma infeção localizada. Em todo o mundo, o género *Candida* é o isolado com maior frequência (70-90%) nos hospitais (Matilde *et al.* 2014)

Os fungos possuem cerca de 150 espécies, dentre estas, apenas 5 são responsáveis pela maior parte das infeções fúngicas sistémicas detetadas: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. O aumento de infeções fúngicas tem vindo a levantar questões sobre se esta situação não poderá estar relacionada com o uso abusivo de azoles. Na Europa, por exemplo, 14% das infeções fúngicas são causadas por *C. glabrata*, sendo que esta apresenta maior taxa de mortalidade quando comparada com *C. albicans* (Pfaller *et al.* 2010).

Para além disso, atualmente *Candida auris*, é considerado o fungo mais infeccioso e letal do mundo. Deste modo torna-se crucial lançar à luz da ciência novas alternativas aos antifúngicos existentes.

As excreções e secreções de larvas nativas (NES) são capazes de matar bactérias, fungos e até vírus (Bexfield *et al.* 2004, Evans *et al.* 2015, Mohammad *et al.* 2019). Porém, embora existam muitos estudos publicados relatando a atividade antimicrobiana da NES sobre bactérias (Bexfield *et al.* 2008, Barnes *et al.* 2010, Dallavecchia *et al.* 2020) ainda há poucos estudos sobre sua atividade em relação aos fungos (Evans *et al.* 2015).

O objetivo do presente trabalho foi testar a atividade antifúngica da NES de *Calliphora vicina* (Robineau – Desvoidy 1830) (Diptera: Calliphoridae) através da

determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre os fungos *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

2.Material e Métodos

2.1.Larvas

As larvas utilizadas nesta experiência são originárias de moscas capturadas no centro da cidade do Porto, Portugal (latitude: 41.146484, longitude: -8.599921). A colónia estoque de *C. vicina* foi criada no Laboratório de Estudo de Dípteros (LED) no Serviço de Microbiologia, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, de acordo com a metodologia desenvolvida por Dallavecchia *et al.* (2014). Foram utilizadas larvas de terceiro ínstar da primeira e segunda geração de moscas nascidas em laboratório.

2.2.Produção de excreção / secreção nativa (NES)

As larvas em terceiro ínstar (3 dias de idade) foram transferidas para um recipiente contendo água gelada (4 °C) com o objetivo de deixá-las imóveis para evitar fuga enquanto eram pesadas em uma balança semi-analítica. Para retirar o excesso de água das larvas, foram utilizadas placas de Petri com discos de papel de filtro, onde as larvas ficavam por cerca de 5 min até remover o excesso de água. Em seguida, uma massa conhecida de larvas (100 g) foi colocada num tubo contendo um volume equivalente a 100 µL de água ultrapura estéril Milli-Q® por grama de larvas. O tubo contendo as larvas foi incubado a 37 °C por 1 h no escuro. A NES foi então recolhida e transferida para tubos eppendorf de 2 mL, foi centrifugada a 12.000 g a 4 °C por 10 min., para separar e sedimentar o material particulado. O sobrenadante foi removido e filtrado através de um filtro de membrana com poros de 0,22 µm (**figura 1**).

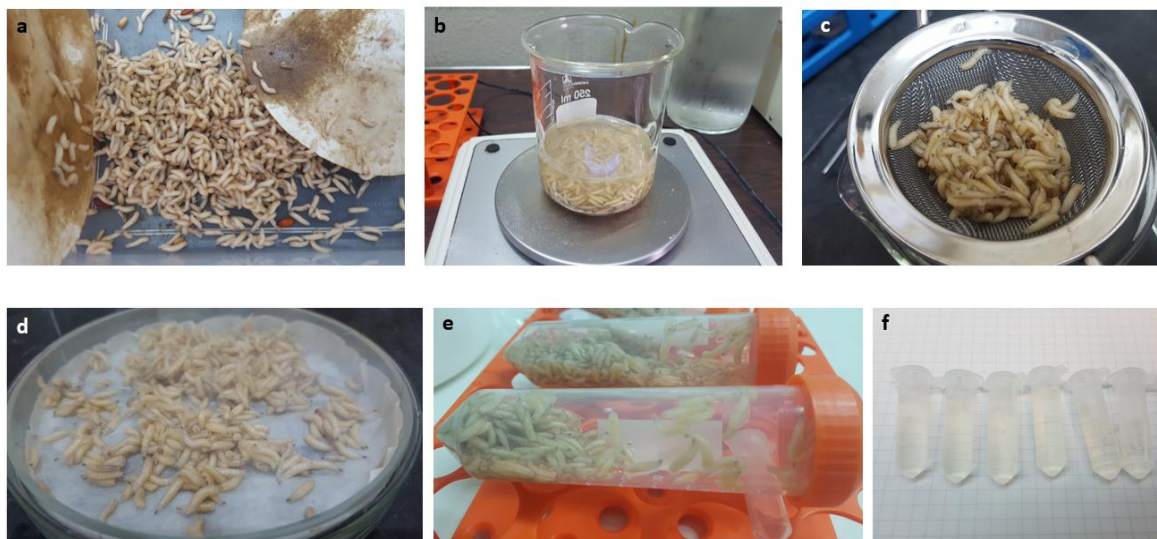


Fig. 1: a) Larvas em 3º instar, b) Pesagem das larvas com água gelada, c) Remoção do excesso de água, d) Larvas a secar em papel de filtro, e) Tubos cónicos com larvas em 3º instar preparadas para incubação, f) Tubos de 2ml com NES filtrada.

Para verificar se havia contaminação da NES filtrada, uma alíquota de 50 μ L foi espalhada numa placa de Mueller-Hinton agar (MHA, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (Te), Itália) e incubada por 24 h a 37 °C; após o período de incubação, as placas foram analisadas quanto ao crescimento de colónias. O pH da NES foi determinado (medidor de pH Consort C860, Turnhout, Bélgica) e a concentração de proteína quantificada usando o kit BCA (Protein Assay Reagent, Pierce, Thermo Scientific-USA). A NES foi armazenada a -20 °C até o seu uso.

2.3. Microorganismos

A levedura *C. albicans* 90028 foi obtida da American Type Culture Collection (ATCC) e as leveduras *C. glabrata* LM025 e *C. parapsilosis* LM021 da coleção do Serviço de Microbiologia, Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Universidade do Porto.

2.4. Ensaio antimicrobiano

2.4.1.Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CIM e a CFM foram determinadas de acordo com o protocolo de microdiluição estabelecido pelo “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI) M27-A3 mais o suplemento S4.

Resumidamente, as leveduras foram cultivadas em meio de agar Sabouraud (Liofilchem) a 37 °C por 24h. Para cada microrganismo, de acordo com os protocolos mencionados acima, foram selecionadas colônias isoladas e uma suspensão foi preparada na escala de densidade de 0,5 Macfarland (aproximadamente 1×10^6 UFC/mL). A suspensão microbiana foi diluída até o tamanho de inóculo de 1×10^3 UFC/mL. A NES testada foi diluída usando o meio de cultura RPMI 1640 (Sigma - Aldrich, St Louis, MO, EUA) em diluições seriadas de 1:2 de acordo com as recomendações da CLSI.

As microplacas foram incubadas a 37 °C e os resultados foram lidos após 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração de NES que inibiu visualmente o crescimento microbiano.

Para confirmar a análise visual do MIC e determinar o CFM, 50 µL de cultura de cada poço foram semeados em placas de MHA, em triplicado, e incubadas a 37 °C. As unidades formadoras de colônias (UFCs) foram contadas após 24 h de incubação e a CFM foi considerada como a concentração mínima que eliminou totalmente o crescimento microbiano.

3.Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o software R, versão 1.2.1335 (R-Studio versão 1.2.1335). Em todos os testes utilizados, o nível de significância considerado foi $P < 0,05$. As experiências foram realizadas em triplicata; os dados são expressos como média aritmética \pm erro padrão da média (SEM).

4.Resultados

4.1.Determinação do pH e quantificação da proteína extraída da NES

A NES extraída foi quantificada quanto ao seu teor proteico e apresentou dosagem proteica de 306,45 $\mu\text{g/mL}$ e a leitura do pH foi de 8.05.

4.2.Atividade antimicrobiana

A determinação da CIM foi realizada com base na leitura visual. A CIM que inibiu visualmente *Candida glabrata* foi a concentração de 9.57 $\mu\text{g/mL}$ da NES de *C. vicina* (**figura 2**). Para determinar a CFM foi realizada inicialmente a contagem das UFCs das concentrações 153.22, 76.61, 38.3 e 19.5 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, por uma questão de exatidão e devido à resultados anteriores paradoxais, todos os demais poços foram semeados para contagem. Foram encontrados 3 diluições de CFMs com redução de 100% dos microrganismos, 153,22, 19,15 e 9,57 $\mu\text{g/mL}$ de NES (**figuras 3 e 4**).

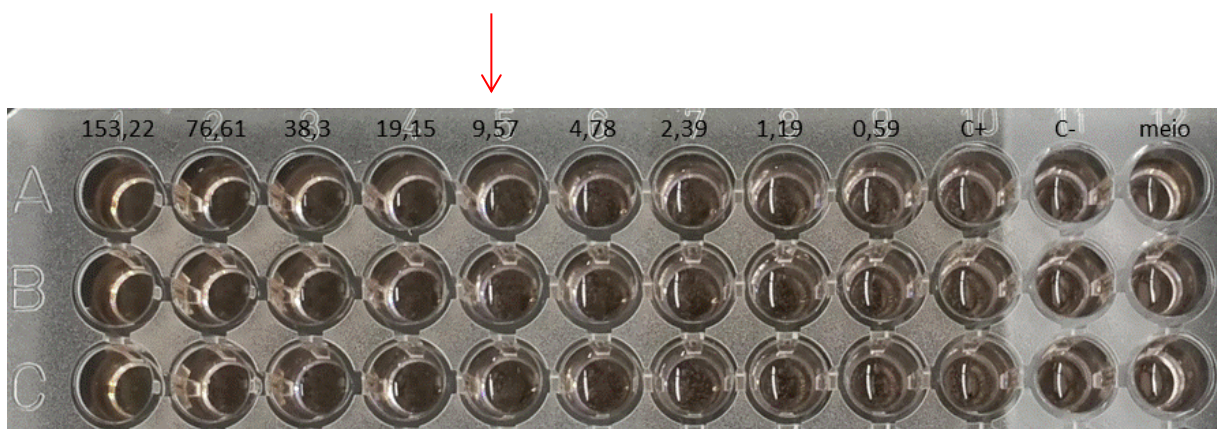


Fig. 2: Placa com 96 poços para determinação da CIM e a CFM. A CIM encontrada com base na leitura visual foi de 9.57 $\mu\text{g/mL}$ de NES. E CFM que inibiu 100% de *C. glabrata* foram as concentrações 153,22, 19,15 e 9,57 $\mu\text{g/mL}$ de NES Valores médios (n = 3).

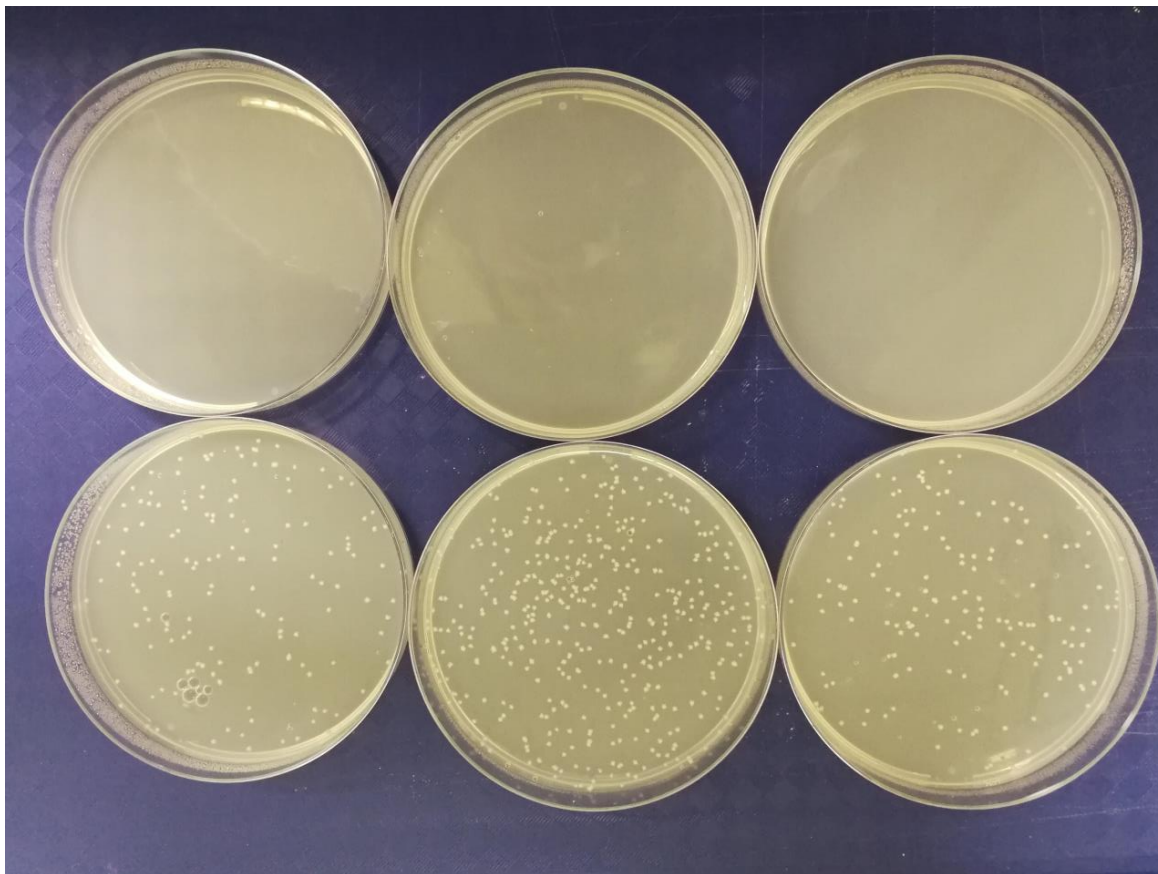


Fig. 3: Placas de ágar após 24 horas de incubação com amostras de NES sobre *C. glabrata*. Redução de 100% dos microrganismos nas concentrações de 153,22, 19,15 e 9,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de NES e os controles positivos (*C. glabrata* + meio de cultura). Três repetições foram realizadas para cada experiência, na foto consta uma réplica de cada concentração citada.

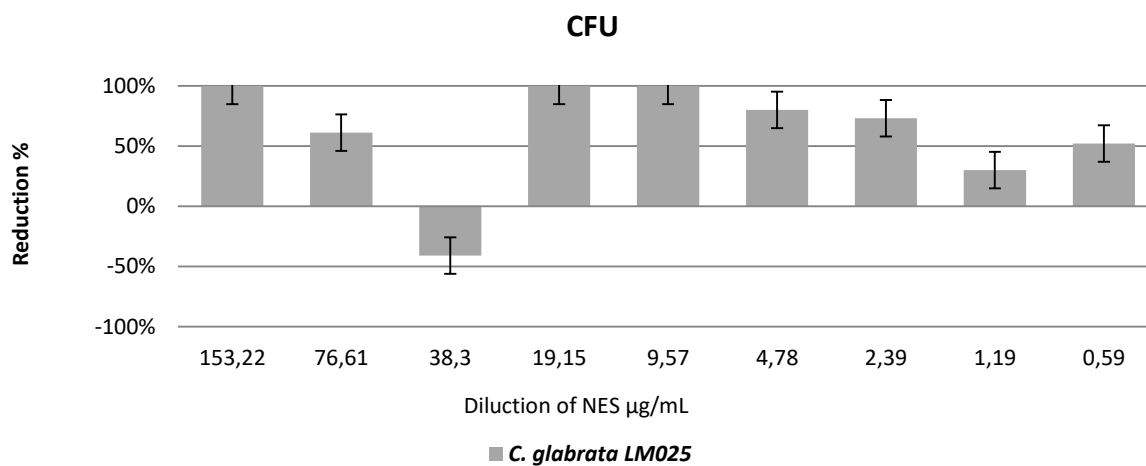


Fig. 4: Redução do número de UFC apresentado em percentagens determinado pelas diluições seriadas de NES incubadas com *C. glabrata*. As percentagens são definidas pela contagem de UFCs como valores médios ($n = 3$) de cada diluição obtida pela razão entre o crescimento do controlo positivo (sem NES) / crescimento bacteriano na presença de NES. As barras de erro indicam o erro padrão ($p < 0,05$).

Para *C. albicans* a CIM que reduziu visualmente o crescimento microbiano foi a concentração de 76,61 µg/mL. Na contagem de UFC, no entanto, foi observada redução diferente da encontrada visualmente na CIM. As concentrações de NES 153,22 e 4.78 µg/mL reduziram as células em torno dos 50% (56%) (figura 5).

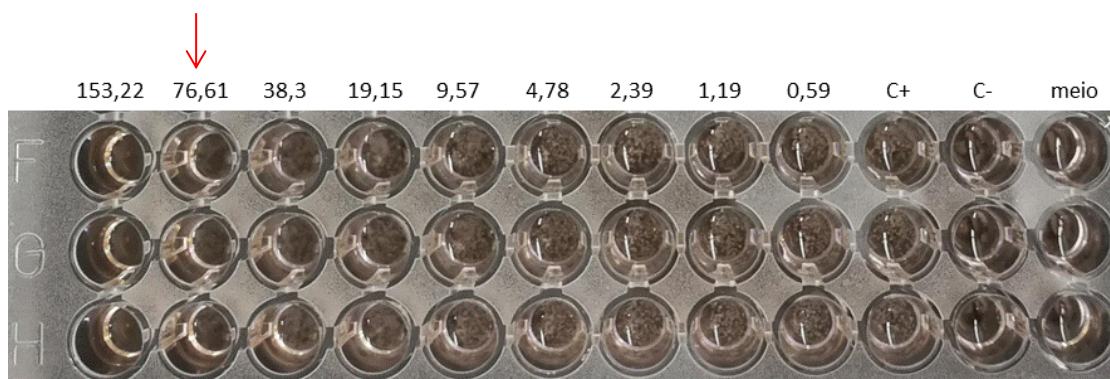


Fig. 5: Placa de 96 poços com as 9 diluições de NES para determinação da concentração mínima inibitória. O MIC para *C. albicans* foi de 76.61 µg/mL de NES. Controle positivo (inóculo + meio de cultura) e o controle negativo (NES + meio de cultura).

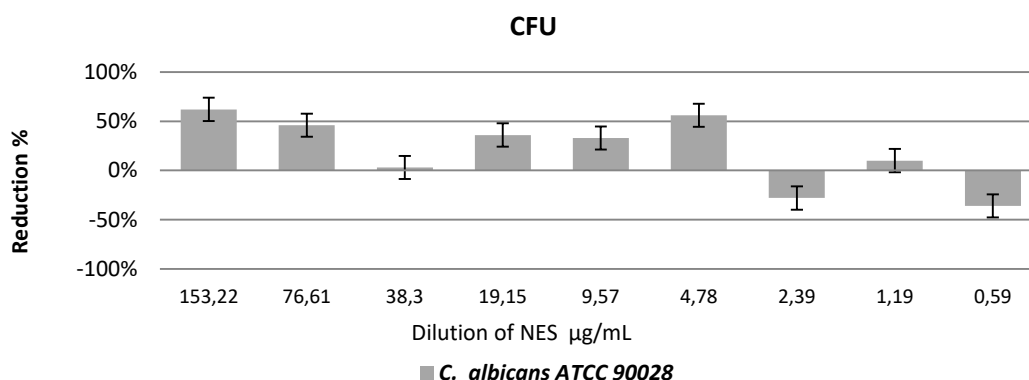


Figura 6: Redução no número de UFC apresentado em percentagens. As percentagens de redução da contagem de UFC são valores médios (n = 3) e as barras de erro indicam erro padrão (p <0,05).

A baixa dosagem de NES de *L. sericata* foi ineficiente sobre *C. parapsilosis*, inclusive, induzindo ao seu crescimento em até 100% na concentração de 4.78 µg/mL, (figura 7).

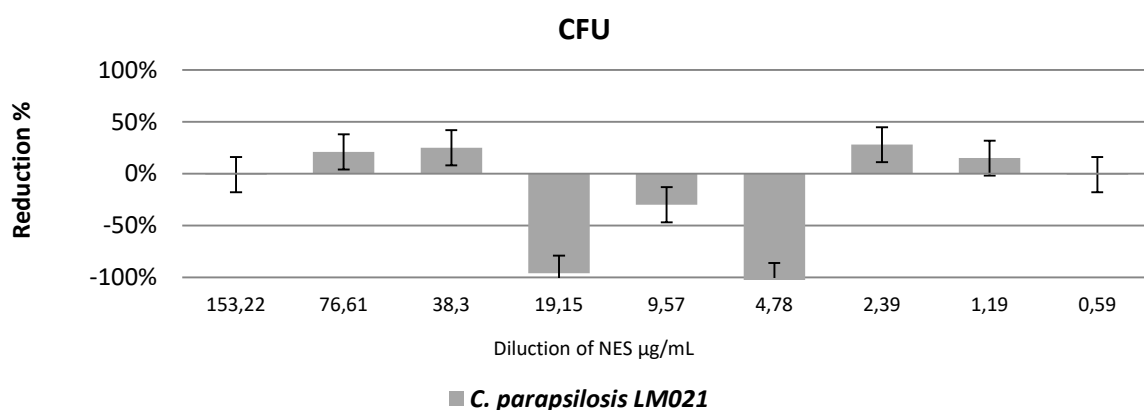


Fig. 7: Contagem das unidades formadoras de colônias apresentado em percentagens para *C. parapsilosis*. As percentagens de redução da contagem de UFCs são valores médios (n = 3) e as barras de erro indicam erro padrão (p <0,05).

Para todos as experiências, não houve diferença significativa entre as diluições testadas, sendo considerado como nível de significância o valor de p <0,05.

Discussão

Os insetos têm uma convivência muito estreita com microrganismos como bactérias, fungos, vírus e parasitas, devido aos seus hábitos alimentares. Por este motivo desenvolveram, ao longo da evolução, um sistema imunológico altamente eficaz contra agentes patogénicos. A NES é um complexo composto por inúmeros peptídeos antimicrobianos que possuem uma capacidade de evolução constante, adaptando-se rapidamente às mudanças e potenciando o aparecimento de novos peptídeos com propriedades distintas (Pöppel *et al.* 2014, Dallavecchia *et al.* 2020).

A NES pura de *C. vicina* exibiu atividade antifúngica eficiente sobre *C. glabrata* com redução celular de 100% em comparação com o controle. Porém, nesta dosagem baixa, mostrou ser pouco eficiente sobre *C. albicans* ATCC e completamente ineficiente sobre *C. parapsilosis*.

C. albicans é o fungo com maior incidência em infecções fúngicas, porém, *C. glabrata* é a estirpe que mais causa preocupação aos profissionais de saúde devido ao desenvolvimento de resistência aos azoles.

Existem poucos estudos sobre a atividade antifúngica da NES. Pöppel *et al.* (2014) ao estudarem os peptídios antifúngicos da NES de *L. sericata*, encontraram um novo peptídeo com resíduos de histidina que são comparados às histatinas, peptídeos ativos contra a levedura *C. albicans*.

Evans *et al.* (2015) testaram a NES de *L. sericata* em dois modos: NES pura e NES fracionada (> 10 KDa, 10-0,5 KDa e <0,5 KDa) sobre *C. albicans*, onde encontraram atividade antifúngica significativa da NES pura e da NES com a menor fração (< 0,5 KDa). Porém, os autores não forneceram dados sobre a NES utilizada na experiência (dosagem proteica e pH). Eles testaram 360 µL de NES incubados com 40 µL de inóculo (9:1) e um meio de cultura 10 x concentrado. Em nossos estudos encontramos uma ação antifúngica moderada contra esta espécie de levedura. Utilizamos uma proporção de 1:1 e sem u meio de cultura concentrado. Talvez esta diferença de metodologia possa ter influenciado na diferença dos resultados entre as experiências.

A falta estudos sobre a atividade antifúngica da NES, assim como a falta de padronização nas metodologias utilizadas nos testes antimicrobianos dificulta uma comparação real dos dados, impedindo um avanço maior para o desenvolvimento da NES como um antibiótico natural.

Concluindo, o potencial de ação da NES será melhor estudado contra as estirpes *C. albicans* e *C. parapsilosis*, aplicando futuramente dosagens proteicas maiores de NES e novas metodologias propostas por estudos com fungos.

Capítulo VI

Considerações finais

1. Discussão Geral

1.1.A escolha do díptero

C. vicina é uma espécie de califorídeo facilmente encontrada nos meios urbanos, devido à sua sinantropia, isto é, adapta-se bem às condições criadas pelo homem. Além disso, é uma mosca que também se consegue adaptar bem às condições laboratoriais, reproduzindo-se em todas as estações do ano. Esta característica facilita a estabilidade e manutenção das colónias criadas em laboratório, assim como a sua fácil recolha na natureza sempre que seja necessário revitalizar as colónias de laboratório. Produz grandes quantidades de massas de ovos, o que é vantajoso para utilização na terapia de desbridamento por larvas (MDT) assim como para o estudo da ação das suas excreções e secreções.

Para utilizar essa espécie de díptero em MDT, assim como testar o seu potencial de ação antimicrobiano, é necessário esterilizar a superfície dos seus ovos. Esta encontra-se extremamente contaminada, devido aos hábitos das fêmeas que utilizam matéria orgânica em estado de putrefação, tanto para alimentação quanto para depositarem os seus ovos.

1.2. Radiação por UV-C

A utilização de larvas no desbridamento de feridas crónicas implica a descontaminação da superfície dos ovos das moscas, sendo a esterilização através de agentes químicos a mais comumente utilizada. No entanto, exige mão-de-obra especializada e equipamentos pessoais de proteção, o que onera os custos desse processo. A esterilização através de agentes químicos também pode deixar resíduos nos ovos, tóxicos para as larvas eclodidas e que podem morrer nas feridas causando grande incómodo ao utente. Alguns grandes laboratórios utilizam salas livres de germes, especialmente montadas e equipadas para manter o ar descontaminado. No entanto,

montar uma sala livre de germes, é um processo complexo e muito caro, além de exigir a contratação de pessoal especializado, o que pode ser inviável financeiramente para pequenos laboratórios.

Uma alternativa à esterilização química e salas livre de germes é a esterilização física, através de luz UV-C. Esse tipo de esterilização requer a utilização de lâmpadas UV-C e embalagens apropriadas para acondicionar os ovos e absorver a radiação.

Nos ensaios realizados com radiação UV-C, foi possível esterilizar ovos de moscas após 12 minutos de exposição, utilizando uma caixa de polipropileno para armazenar os ovos após a sua dissociação. Os testes de esterilidade com caldo tioglicolato comprovaram a eficácia da esterilização. A esterilização por raios UV-C permite uma NES livre de microrganismos contaminantes, assim como pode vir a ser utilizada como alternativa para esterilizar as larvas L1 armazenadas e, posteriormente enviadas aos clientes utilizadores de MDT, com o intuito de atender a um mercado com uma demanda cada vez maior de larvas estéreis para o tratamento de feridas infectadas.

1.3. Ação antimicrobiana da NES

A NES de *C. vicina* apresentou atividade antimicrobiana sobre as bactérias gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae* e ação de curta duração contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*. Foi eficiente na redução celular de *C. glabrata* e *C. albicans* LM026. É necessária ser melhor estudada em relação a sua atividade sobre *C. albicans* ATCC e *C. parapsilosis*.

Portanto, a NES pura de *C. vicina* pode ser considerada com potencial para desenvolvimento de futuros antibióticos e antifúngicos naturais simples e baratos de fabricar

Referências

- Baer, WS. 1931.** The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). Clin Orthop Relat Res, DOI: 10.1007/s11999-010-1416-3
- Balogh, TS., Velasco, MVR., Pedriali, CA., Kaneko, TM., Baby, AR. 2011.** Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. An. Bras. Dermatol. 4:732-742
- Barnes, KM., Dixon, AR., Gennard, EDE. 2010.** The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): Variation in laboratory evaluation. J Microbiol Methods 82: 234–237
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S., Ratcliffe, NA., 2004.** Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretion/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Microbes Infect. 6, 1297–1304.
- Bexfield, A., Bond, EA., Roberts, CE., Dudley, E., Nigam, Y., Thomas, S., Newton, PR. and Ratcliffe AN. 2008.** The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fractions from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Microbes Infect 10: 325-333
- Byrd, JH and Castner, J.L. 2010.** Insects of forensic importance. In: Byrd JH, Castner JL, editors. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Brasil. 2010.** Farmacopeia Brasileira, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2, 546p.
- Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária,** Ordem dos Farmacêuticos, Revisão nº 3 de 2009;

https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf

Brownell, SA., Chakrabarti, AR., Kaser, FM., Connelly, LG., Peletz, RL., Reygadas, F., Lang, MJ., Kammen, DM., Nelson, KL. 2008. Assessment of a low-cost, point-of-use, ultraviolet water disinfection technology. *J Water Health* 6: 53-65.

Cazander, G., van Veen, KEB., Bernardis, AT., Jukema. GN. 2009. Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *J. Tissue Viab.* 18: 80–87.

Chaiwong, T., Srivoramas, T., Sebsumran, P., Panya, M., Wanram, S. and Panomket, P. (2016) Antibacterial activity of excretions-secretions from *Chrysomya megacephala* against *Escherichia coli*. *J Med Assoc Thai*, 99, S7–S11.

Cerovsky, V. and Bém, R. 2014. Lucifensins, the Insect Defensins of Biomedical Importance: The Story behind Maggot Therapy – Pharmaceuticals (Basel), DOI: 10.3390/ph7030251

Chernysh, S., Gordya, N., Suborova, T. 2015. Insect Antimicrobial Peptide Complexes Prevent Resistance Development in Bacteria. *PLoS ONE* 10: e0130788. doi:10.1371/journal.pone.0130788

Chevalier J., Gheerbrant A. 2007. Dicionário de Símbolos. 21.ed. Rio de Janeiro: José Olympio,

Contreras, RJ., Suarez, AF., Orantes, MK., Mares, MLE. and Cherit DJ. 2005. Larval debridement therapy in México. *Wound Care Can.* 3:45–46.

- Dallavecchia, DL., Silva Filho, RG., Figueiredo, NMA and Aguiar-Coelho, VM. 2010.** Esterilização da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) para utilização em biodesbridamento. R. pesq. cuid. fundam. online. 1–4.
- Dallavecchia, DL., Silva Filho, RG., Aguiar, VM. 2014.** Sterilization of eggs of the screw worm *Chrysomya putoria*, for use in biotherapy. J Insect Sci, 14: 1-5.
- Dallavecchia, DL., Ferraz, ACP., Miranda, GS., Silva, AS. and Magalhães de Aguiar, V.2015.** Comparative study between chicken gizzards and beef as diets and its influences on the post-embryonic development and longevity of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). EntomoBrasilis 8: 17–23.
- Dallavecchia, LD., Ricardo, E., Aguiar, V., Silva, SA., Rodrigues, AG. 2019.** Efficacy of UV-C Ray Sterilization of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) Eggs for Use in Maggot Debridement Therapy, J. Med. Entomol. 56:40-44
- Dallavecchia, DL., Ricardo, E., da Silva, AS. and Rodrigues, AG. 2020,** Atividade antibacteriana e antifúngica das excreções e secreções de *Calliphora vicina* . Med Vet Entomol. doi: [10.1111 / mve.12486](https://doi.org/10.1111/mve.12486)
- Dias, IME. 2014. Efeito** da fluoxetina no desenvolvimento de formas imaturas de *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). Dissertação de Mestrado, Departamento de Parasitologia, Instituto Superior de Ciências da Saúde - Norte, Gandra, Portugal.
- Evans, R., Dudley, Ed., Nigam, Y. 2015.** Detection and partial characterization of antifungal bioactivity from the secretions of the medicinal maggot, *Lucilia sericata*. Wound Rep and Reg 00: 1–8

- Faria, JAF. 2001.** Packaging sterilization system. BR National Institute of Industrial Properties (INPI). Pat. 1427
- Ferraz, ACP., Bosisio, DB., and Aguiar, VMA. 2011.** Dieta para larvas de *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). EntomoBrasilis, 4: 125-129.
- Ferraz, ACP., Dallavecchia, DL., Carvalho, RP., SILVA, DC., Silva Filho, RG., Aguiar, VM. 2014.** Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of an Old World screwworm fly, *Chrysomya putoria*. J Insect Sci, DOI:10.1093/jis/14.1.3.
- Figueroa, L., Flores, J. And Rodriguez, S. 2007.** Método de cultivo de larvas de moscas *Lucilia sericata* para terapia larval. Parasitol. latinoam. 62: 79-82.
- Figueroa, L., Uherek, F., Yusef, P., López, L. and Flores. J. 2006.** Maggot therapy in patients with chronic skin ulcers. Parasitol. Latinoam. 61:160–164.
- Fine, A and Alexander, H. 1934.** Maggot Therapy: Technique and Clinical Application J Bone Joint Surg Am.16:572-582.
- Fisher, RA. 1930.** Gene selection. In: Futuyma DJ, Editor. Evolutionary Biology Brazilian Society of Genetics, 631p
- Fowler, E and van Rijswijk, L. 1995.** Using wound debridement to help achieving the goals of care. *Ostomy Wound Manage.* p.(suppl): 41,23S-36S.
- Gennard, DE. 2007.** The life cycles of flies and beetles In: Gennard DE, editor. Forensic Entomology - an introduction. England: Wiley
- Gottrup, F and Jørgensen, B. 2011.** Desbridamento de larvas: um método alternativo para desbridamento. Eplasty, 11 , e33.

- Guimarães, JN and Papavero, N. 1999.** Myiasis in man and animals in the Neotropical Region: bibliographic database. São Paulo, FAPESP, 308 p
- Ingram, M., Roberts, TA. 1980.** Application of the “D-concept” to heat treatments involving curing salts. *J. Food Technol.*, 6:21-28
- International Commission on Microbiological Specification For Foods (ICMSF). 1980.** Microbial ecology of foods. New York: Academic, v. 1.
- Limsopatham, K., Khamnoi, P., Sukontason, KL., Boonyawan, D., Chaiwong, T. and Sukontason, K. 2017.** Sterilization of blow fly eggs *Chrysomya megacephala* and *Lucilia cuprina*, (Diptera: Calliphoridae) for maggot debridement therapy application. *J Parasitol Res*, 116:1581–1589
- Kocisova, A., Pistl, J., Link, R., Conkova, E., Goldova, M. 2006.** Maggot debridement therapy in the treatment of footrot and foot scald in sheep. *Acta Veterinaria Brno*. 75: 277–281.
- Masri, MS., Nazni, WA., Lee, HL., T. Rogayah, TAR and Subramaniam, S. 2005.** Sterilisation of *Lucilia cuprina* Wiedemann maggots used in therapy of intractable wounds. *Trop Biomed*, 22:185–189
- Mello, RS., Queiroz, MMC and Aguiar-Coelho, VM. 2007.** Population fluctuations of calliphorids species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia Série Zool*. 97: 1–5.
- Mohammad, RK Abdel-Samad. 2019.** Antiviral and virucidal activities of *Lucilia cuprina* maggots’ excretion/secretion (Diptera: Calliphoridae): first work, *Heliyon*, 5: 11
- Mohd, MS., Nazni, WA., Lee, HL., Rogayah, TAT and Subramaniam, S. 2005.** Sterilisation of *Lucilia cuprina* Wiedemann maggots used in therapy of intractable wounds. *Trop. Biomed*. 22: 185–189

- Mumcuoglu, KY., Ingber, A., Gilead, L., Stessman, J., Friedman, R., Schulman, H., Bichucher, H., Ioffe-Uspensky, I., Miller, J., Galun, R and Raz, I. 1999.** Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *Int. J. Dermatol.* 38: 623–627
- Mumcuoglu, KY., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M and Tarshis, M. 2001.** Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol.* 38:161-166.
- Nasoori, A and Hoomand, R. 2017.** Maggot debridement therapy for an electoral burn injury with instructions for the use of *Lucilia sericata* larvae
- Nigam, Y., Bexfield, A., Thomas, S and Ratcliffe, NA. 2006.** Maggot Therapy: The Science and Implication for CAM Part I—History and Bacterial Resistance. *Evid Based Complement Alternat Med.* (3):303-8.
- Nitsche MJT. 2010.** Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar. PhD Tesis, UNESP
- O’Neill, J. 2016.** Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The review on antimicrobial resistance. [Internet]. London. <https://amr-review.org/Publications.html>. Review Paper – Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf [accessed on 14 January 2020].
- Pare, A. 1952.** The Apologie and Treatise of Ambroise Pare Containing The Voyages Made Into Divers Places With Many of His Writings Upon Surgery. Chicago: University of Chicago Press.
- Pöppel AK., Koch A, Kogel KH., Vogel, H., Kollwe, C., Wiesner, J., Vilcinskas, A. 2014.** Lucimycin, an antifungal peptide from the therapeutic maggot of the

common green bottle fly *Lucilia sericata*. Biol Chem. 395(6):649-56. doi: 10.1515/hsz-2013-0263..

Ratcliffe, NA., Mello, CB., Garcia, ES., Butt, TM and Azambuja, P. 2011. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 41, 747–769.

Ratcliffe, AN., Vieira, SC., Mendonça, MP., Caetano, LR., Queiroz, CMM., Garcia, SE., Mello, BC and Azambuja, P. 2015. Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. Acta Tropica 147: 6–11

Santos, MB., Martin, C and Milward-de-Azevedo, EMV. 1996. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) criada em dieta a base de sardinha previamente exposta, por diferentes períodos à condições controladas. Braz Arch Biol Technol 39: 799–805

Simmons, SW.1934. Sterilization of blowfly eggs in the culture of surgical maggots for use in the treatment of pyogenic infections. Am. J. Surg. 25:140–147

Sherman, RA., Hall, MJ. and Thomas, S. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. Annu Rev Entomol 45: 55-81

Sherman, RA. 2003. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. Diabetes Care. 26: 446–451.

Sherman, RA., Morrisson, S and Ng, D. 2007. Maggot debridement therapy for serious horse wounds—a survey of practitioners. Vet. J. 174: 86–91.

- Sherman RA., Khavari, B., Werner, D. 2013** .Effect of hyperbaric oxygen on the growth and development of medicinal maggots. *Undersea Hyperb Med.* 40 :377-80.
- Sherman, RA. 2014.** Mechanisms of Maggot-Induced Wound Healing: What Do We Know, and Where Do We Go from Here? Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 13p.
- Simmons, SW.1934.** Sterilization of blowfly eggs in the culture of surgical maggots for use in the treatment of pyogenic infections. *Am. J. Surg.* 25: 140–147
- Smith, KGV. 1986.** A manual of forensic entomology. London: Trustees of the British Museum (Natural History).
- Stadler, F. 2019.** The maggot therapy supply chain: a review of the literature and practice. *Med. Vet. Entomol.* doi: 10.1111/mve.12397
- Szpila, K. 2010.** Key for the Identification of Third Instars of European Blowflies (Diptera: Calliphoridae) of Forensic Importance. 10.1007/978-1-4020-9684-6_3.
- Teick, S. and Myers, RAM. .1986.** Maggot Therapy for Severe Skin Infections. *South Med J*, 79:9.
- Thomas, S., Andrews, AM., Hay, NP., Bourgoise, S. 1999.** The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *J. Tissue Viability* 9: 127–132.
- Van Der Plas, MJA., Baldry, M., Van Dissel, JT., Jukema, GN and Nibbering, P.H. 2009.** Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia*, 52:1962–1970.
- Varzim, LSBF. 2005.** Esterilização de ovos de moscas varejeiras *Chrysomya putoria* (Wedermann, 1830), (Diptera Calliphoridae) para utilização em bioterapia.

Dissertação de Mestrado, Departamento de Parasitologia, UNICAMP, São Paulo, Brazil.

Whitaker, SI., Twine, C., Whitaker, MJ., Welck, M., Brown, CS., Shandall, A.

2007. Larval therapy from antiquity to the present day: Mechanisms of action, clinical applications and future potential. *Postgrad. Med. J.* 83:409-13

WHO. 2017. Antimicrobial resistance

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>)

Yakovleva, AY., Kruglikova, AA and Chernysh, SI. 2019 Calliphoridae flies in medical biotechnology. *Entomological Review*, 99, 292–301.

Zumpt, F. 1965. Myiasis in Man and Animals in the Old World. London: Butterworths.

267

pp.

Publicações

Publicação 1

(Capítulo IV)

Efficacy of UV-C Ray Sterilization of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) Eggs for Use in Maggot Debridement Therapy

Daniele L. Dallavecchia,^{1,2,3,7} Elisabete Ricardo,^{1,4} Valéria M. Aguiar,^{3,9} Alexandre S. da Silva,⁵ and Acácio G. Rodrigues^{1,4,6}

¹Microbiology Service and Department of Pathology, Faculty of Medicine of the University of Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal, ²CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília - DF 70040-020, Brazil (Research fellow Bex 133-51-133), ³Laboratory of Diptera Studies of the Federal University of the State of Rio de Janeiro - UNIRIO, Street Frei Caneca, 94, Center, CEP 20211-040 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ⁴Center for Health Technology and Services Research – CINTESIS, Faculty of Medicine of the University of Porto, Porto, Portugal, ⁵Department of Quantitative Methods, Federal University of the State of Rio de Janeiro - UNIRIO, Street Frei Caneca, 94, Center, CEP 20211-040 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ⁶Burn Unit, Hospital Center São João, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal, and ⁷Corresponding author, e-mail: danieledallavecchia@gmail.com

Subject Editor: Jason Byrd

Received 17 May 2018; Editorial decision 26 July 2018

Abstract

Maggot debridement therapy (MDT) is a simple wound debridement technique. It is a natural treatment licensed by the Food and Drug Administration (FDA) and is increasingly used in the United States and in Europe. This treatment is safe when the larvae originate from laboratory stocks of eggs that have been sterilized. In this study, a simple, inexpensive microbe decontamination technique is described. It yields eggs that are free of chemical residues and are easy to handle, meeting the growing demand for medicinal larvae in hospitals or medical centers. Three treatments (T1, T2, T3) involving 3, 6, and 12 min of exposure to ultraviolet (UV-C) rays, respectively, were compared. Egg sterility was evaluated by culture in thioglycollate broth, incubated at 32°C ± 2.5°C under aerobic conditions for up to 14 d. The UV-C radiation sterilization process obtained satisfactory results after 12 min exposure (treatment 3). Larval viability was 57%, pupal viability was 54%, and 54% of the adults emerged. The sex ratio was 50%, within the expected values. There were no morphological abnormalities associated to the UV-C treatment in the flies. In conclusion sterilization by UV-C rays is indicated to obtain sterile larvae destined for MDT.

Key words: decontamination, physical sterilization, maggot therapy, UV-C ray

Resistance to antibiotics is a serious, growing global problem. Patients with wounds infected by resistant bacteria are at high risk of amputation or even death, particularly if these are wounds associated with co-existing diseases such as diabetes, large burns, and pressure ulcers. Such wound treatments are extremely costly, in particular, due to long hospitalization times (WHO 2017). Surgical wound debridement involves the mechanical removal of devitalized tissue from an infected injury. Sometimes it is the only option available since preparation of the wound bed requires removal of necrotic tissues infected with bacteria and/or biofilm, thereby exposing healthy tissue that will require further treatment and healing (Fowler and Van Rijswijk 1995).

Medicinal larvae perform a quite meticulous debridement that is associated with their feeding process. Their buccal apparatus has hooks which, during feeding, tear the necrotic tissue and release digestive juices containing proteolytic enzymes, thereby liquefying the

tissue which is then sucked by the larvae. This process is able to eliminate small fragments of tissue (including bone), reaching places that no other treatment does (Nitsche et al. 2010). The enzymes and small peptides released by the fly larvae, known as lucifensins, have strong antimicrobial action and destroy bacteria (Cerovsky and Bém 2014).

Maggot debridement therapy (MDT) was approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 2004 as an alternative therapy for wound debridement and has since been used by several professionals as a first-line treatment (Teick and Myers 1986, Mumcuoglu et al. 2001, Sherman 2014, Nassori and Hoomand 2017). In 2005, about 30,000 debridement treatments employing maggots were performed in Europe (Geary et al. 2009).

Some species of Calliphoridae flies can cause the primary myiasis, that is, lay eggs on healthy skin by feeding on viable tissue, e.g., *Cochliomyia* genus. On the other hand, in the secondary myiasis the flies are attracted by the smell of the wound necrotic tissue. MDT is

the intentional insertion of previously sterile larvae into wounds that are difficult to heal (Guimaraes and Pavavero 1999). Each larva is capable of removing 25 mg of necrotic material in 24 h (Mumcuoglu et al. 2001). The species most used in MDT is *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Baer 1931, Sherman 2003, Contreras et al. 2005) but other species belonging to this family were also used: *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) (Baer 1931), *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Aaron et al. 2009), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826) (Leclercq 1990), *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Tick and Myers 1986) and *Phormia regina* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Reames 1988).

C. vicina (Robineau-Desvoidy 1830) is a species of fly from the Holarctic region, being very common in Portugal and frequently found in urban areas (Smith 1986, Byrd and Castner 2010). It presents high reproductive capacity of egg mass, develops well under laboratory conditions, is a necrobiontophagous fly, thus possessing essential characteristics for use in MDT.

When the physician-surgeon William Baer (1931) started to use MDT to cleanse wounds, some of his patients develop tetanus. He concluded that, to avoid this, the fly eggs needed to be sterilized before larvae hatch. From that time on many distinct methodologies have been used for sterilization of eggs, most of which involve the use of chemical products. The most commonly used procedure involves the use of sodium hypochlorite, often associated with boric acid (Sherman et al. 2014).

Alternative sterilization methods have been used in different areas such as the food industry (Ingram and Roberts 1980, Faria 2001), i.e., using UV-C rays. For an efficient system of disinfection/sterilization of a product by ultraviolet rays, attention should be paid to the intensity of the radiation, the time of contact with the microorganisms and the material to be used as packaging. The ultraviolet rays are divided in different wavelengths—UV-A: 315 and 400 nm, responsible for tanning in the human skin; UV-B: 280 and 315 nm, responsible for the synthesis of vitamin D in the body, burns in the body skin; UV-C: 200 and 280 nm, can cause genetic mutations; UV-V (empty): 100 and 200 nm, strongly absorbed by water and air, and can only be transmitted in a vacuum.

The ozone layer filters out 100% of UV-C rays; therefore, artificial sources are used for disinfecting the air, water or surfaces and sterilization of certain materials. UV-C rays are only absorbed by some materials, such as polyethylene, polypropylene, polybutylene, ethylene-vinyl acetate, nylon, and ethylene-vinyl alcohol. The UV-C radiation efficiency is about 99.99% lethal against microorganisms.

The process of eggs sterilization must have an efficient cost versus benefit, especially in relation to the time spent in the procedure. UV-C rays do not leave residues, compared to sterilization by chemical agents such as Formalin 5% and sodium hydroxide 1%, Sodium sulphite 2.5% and formaldehyde 2.5%, Orthophthaldehyde, Phenol 3% or sodium hypochlorite 0.5%, Glutaraldehyde 2% (Simmons 1934, Mumcuoglu et al. 1999, Contreras et al. 2005, Sherman et al. 2007, Dallavecchia et al. 2014). UV-C rays act fast, are effective and safe, It is known that a UV lamp with 254 nm of light wave has lethal germicidal activity on bacteria, viruses, fungi, and protozoa, requiring only a few minutes to sterilize materials (ICMSF 1980).

The aim of this work was to test the efficiency of UV-C rays on egg surface sterilization of *C. vicina*, an abundant fly in Portugal, easy to create in the laboratory and with a potential for use in MDT.

Materials and Methods

Fly Colony

A stock colony of *C. vicina*, maintained at the Laboratory of Diptera Studies, Microbiology Service, Department of Pathology, Faculty of

Medicine of the University of Porto, was used. The colony was reared in three different transparent polyethylene cages (40 × 30 × 20) with top and front openings for aeration. The insects were kept, during winter, in a room with ventilation, at room temperature with natural light on a 10:14 (L:D) h cycle.

Food and Substrate

The larval diet based on carbohydrates (honey diluted in water in a ratio of 1:2) was offered daily to adult insects. For hydration, a container filled with 20 ml of water (water changed daily), was placed in each cage. For females' ovary maturation, chicken gizzard was offered as a protein source during the first 5 d after the colony was born (Dallavecchia et al. 2015).

Egg Collection

To stimulate the oviposition of the stock colony (approximately 100 adults of the first generation), 12 g of chicken gizzard diet was inserted in each cage ($n = 3$) 12 h prior to the beginning of the experiment. One cage was selected, and the egg masses were transferred, with the aid of a sterile forceps to a Petri dish containing 1 ml of sterile distilled water to dissociate the eggs. From this mass, 90 eggs were collected using a sterile wet brush and distributed in four polypropylene boxes with three sections (triplicate), each containing 30 eggs. Three boxes were used for each of the different treatments of exposure to UV-C rays and one box as the control with no exposure to UV-C rays.

Sterilization Treatments

Three treatments were performed: T1, T2, T3, i.e., 3, 6, and 12 min of exposure, respectively, and a control without exposure to UV-C radiation (25W - 254 nm wavelength - Phillips), at a distance of 50 cm from the source. The distance from the source was calculated according to ICMSF (1980), which determines that a germicidal lamp of 50 W, positioned 1 m away from a target, has an intensity of 100 mW/cm².

According to the norms of the Brazilian Pharmacopoeia (Brasil 2010) for solid products, three eggs were separated from the lot of each treatment and incubated in tubes containing 5 ml of thioglycollate broth (Oxoid Ltd, United Kingdom) to confirm the efficacy of the sterilization. The tubes were incubated at 32°C ± 2.5°C in aerobiosis for up to 14 d. Daily visual check for signs of bacterial growth was repeated after an initial incubation period of 24 h. All experiments were carried out in triplicate and conducted in a Class II Biological Safety Cabin.

To verify the viability of the larvae, the eggs sterilized by UV-C radiation ($n = 27$ per group) and the control were transferred to 30 g of chicken gizzard diet at a ratio of 1 g of diet per larvae to evaluate larval development. The experiments were performed at room temperature.

The larvae, after abandoning the diet, were weighed individually on an analytical scale. The specimens were transferred to test tubes (20 × 200 mm) containing 1 g of sterile substrate (hay) for pupation and were labeled according to each treatment. Observations were conducted daily and were always performed at the same hour—12 h—until the emergence of adults. The following biological parameters were determined: body mass; duration of larval development; abnormality and sex ratio (SR). The SR was obtained as follows: $SR = F / M + F$, where F is the number of females and M the number of males.

Statistical Analysis

Chi-square and Fisher's exact tests were used to prove the independence between the qualitative variables. For the analysis of larval

weight, nonparametric tests (Kruskal Wallis) were chosen after the normality hypothesis was rejected by the Shapiro-Wilk test. In all tests, a significance level of 0.005 was considered. The tests were run in program R version 3.4.4.

Results

Microbiological sterility was confirmed by the growth test with thioglycollate broth. Treatments 1 and 2 (exposure to UV-C radiation for 3 and 6 min) were not efficient, as the microbiological sterility test (in triplicate) presented turbidity, indicating growth of microorganisms. Treatment 3 (12 min of exposure) showed to be efficient since there were no turbidity signals, i.e., microbial contamination in the tubes (in triplicate) with the sterilized egg samples ($n = 3$). Since the control was not treated by radiation it was expected to present microbial contamination in the tubes; therefore it was not tested in the thioglycollate broth.

Considering the body mass of larvae both the control, T1 and T2 presented an average of 0.100 g for all larvae, with no variability in these treatments. T3 presented a mean weight of 0.104 g and a standard deviation of 0.0143, due to four larvae that presented higher weights, i.e., 0.125 g, 0.135 g, 0.150 g, and 0.175 g. However, according to the Kruskal-Wallis test ($P = 0.01235$) the difference of the larvae weight in the different treatments and control was not statistically significant.

The larvae abandonment peak, pupariation and adult emergence peak obtained for *C. vicina* in the three different treatments and control are shown in Fig. 1. There were no differences in the peaks of larvae abandonment, pupariation and in the emergence of adults among the three treatments and control tested. The larval abandonment peak occurred on the sixth day after the transfer of the eggs to the diet. The pupariation occurred on the seventh day and the emergence of the adults on the 20th day.

According to the Chi-square test comparing all treatments and control, there was no statistically significant difference ($P = 0.3811$) between the amount of eggs used in each treatment and the number of larvae that hatched, as well as the number of eggs larvae born until the development of the adult phase ($P = 0.3915$) (Table 1).

As for the sex of the individuals, the results (Table 2) showed higher births of males in control and T2, whereas in the T1 and

T3 similar births on both sexes occurred. However, excluding values non-born (NB) and using the Chi-square test according to the P value obtained ($P = 0.5814$), the sexual proportions found in the three treatments and control did not differ from the expected that is, the number of adults that emerged in each group was unaffected by UV-C radiation.

All adults (100%) submitted to T1 were normal, i.e., they did not present morphological deformities; in T2, T3, and control, they presented a small number of morphological deformities in the individuals (absence of leg, broken wing). Using the Fisher exact test ($P = 0.7075$), it was observed that there was no statistically significant difference (Fig. 2).

Discussion

The surface of fly egg is extremely contaminated, since females oviposit in putrefying meats. Even the ovaries of laboratory-created fly are stimulated to develop in diets based on raw meat, liver or chicken gizzard (Sherman 2000, Ferraz et al. 2014, Dallavecchia et al. 2014). Germ-Free rooms are used in many countries to rear fly and uncontaminated eggs (Sherman 2000). This technology requires considerable seed capital to produce sterile medicinal larvae.

Limsopatham et al. (2017) tested three chemical agents to sterilize eggs of *Chrysomya megacephala* and *L. cuprina* with success in the sterilization process. However, during the hatching of the eggs, the sterility test showed contamination probably due to the transfer of the eggs to the culture medium or, due to the fact that the eggs of *L. cuprina*, (seen under a scanning microscope) present grooves where the detergents cannot reach. In the case of UV-C sterilization, this phenomenon does not occur, as the UV-C rays cross the wall of the eggs uniformly, like a scanner, eliminating all bacteria. Proven fact in the sterility test using thioglycollate broth, incubated for 14 d without presenting bacterial growth.

Masri et al. (2005) dissociated the eggs of *L. cuprina* with chlorhexidine and then sterilized with UV-C rays (wavelength 190 nm) every 1-min intervals, up to 10 min. According to the author, sterilization was effective between 7 and 10 min of exposure. In our work, the dissociation of the eggs was done with ultrapure water and the effective time period for sterilization was longer—12 min of exposure to UV-C rays (wavelength of 254 nm). This difference may

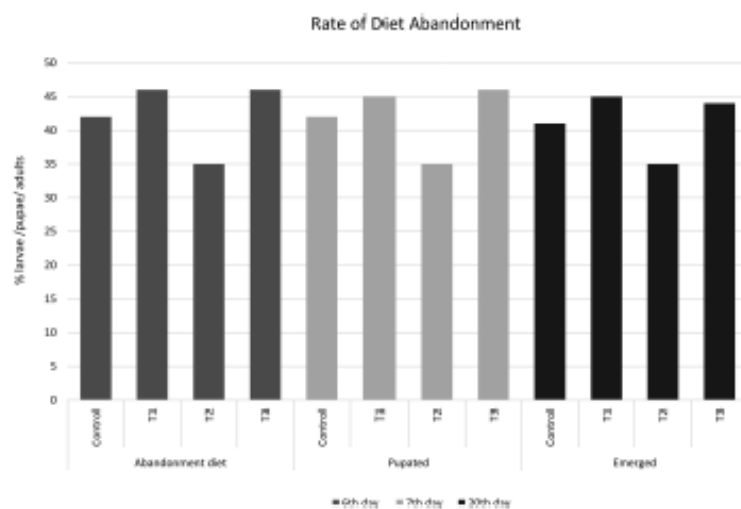


Fig. 1. Abandonment rate of *Calliphora vicina* maggots at pupation and emergence (%) from three treatments and control (27 maggots per replication). Control – without exposure to UV-C rays; T1 – 3 min exposure to UV-C rays; T2 – 6 min exposure to UV-C rays and T3 – 12 min exposure to UV-C rays.

Table 1. The viability of larval, pupal and neo-larvae to adult of *Calliphora vicina* after exposure to UV-C rays

Treatment	UV exposure time	No. of individuals			% Viabilities		
		Eggs*	Larvae	Adults	Larvae	Pupae	Adults
Control	w / exposure	81	42	41	52	51	51
T1	3 min	81	46	45	57	55	55
T2	6 min	81	35	35	43	43	43
T3	12 min	81	46	44	57	54	54

*Eggs: Each replicate contained 27 eggs ($n = 3 \times 27$) after the sterility test. Control = without exposure to UV-C rays; T1 = 3 min exposure to UV-C rays; T2 = 6 min exposure to UV-C rays and T3 = 12 min exposure to UV-C rays.

Table 2. Detailed biological parameters of eggs hatched after UV-C sterilization

Treatment	No. of individuals per replicates				% individuals				Normality	
	R1	R2	R3	Total	NB	M	F	% SR*	Normality	Anormality
Control	18	12	12	42	1	63	37	37	40	1
T1	24	16	6	46	1	51	49	49	45	0
T2	11	4	20	35	0	57	43	43	34	1
T3	11	23	12	46	2	50	50	50	43	1

NB = non-born, SR = sex ratio.

*The SR was obtained as follows: $SR = F / M + F$, where F is the number of females and M the number of males.

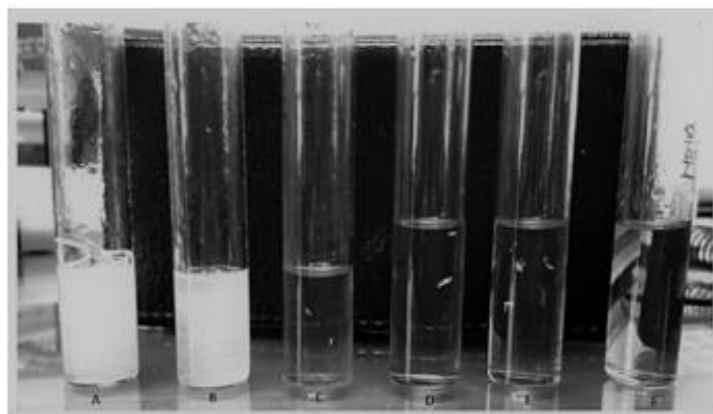


Fig. 2. Sterilization tests with thioglycollate broth were conducted for all treatments, in triplicate: (A) test tube, pertaining treatment 1, indicating contamination; (B) treatment 2, showing turbidity and indicating contamination; (C, D, and E) tubes in triplicate pertaining treatment 3, with culture medium and egg samples, where it is clear that the eggs were sterilized: there is no turbidity, indicating absence of contamination; (F) Tube containing single culture medium only, for comparison of transparency of the medium.

be related to the fact that chlorhexidine is a disinfectant, whereas water does not interfere with the microbial load of the eggs.

The body mass of the larvae did not vary significantly in the treatments performed (except in T3). This homogeneity in the weight of the larvae is related to the chicken gizzard diet. In a previous study (Dallavecchia et al. 2015), when comparing the two diets (beef and chicken gizzard) the same pattern of homogeneity was observed.

The abandonment rate did not vary, larvae, pupae and adult emergence peaked on the same day in all treatments (6, 7 and 20, respectively). The same was observed in the work of Dallavecchia et al. (2014), who sterilized *Chrysomya putoria* eggs with 2% glutaraldehyde. This constancy in insect development may also be related to the chicken gizzard diet, being advantageous for large-scale laboratory production. In our test, the larval hatching rate

was greater than 40%, unlike Masri et al. (2005), which presented a viability of 14–16%. The authors claim that UV-C rays may have destroyed the embryos inside the eggs; however, chlorhexidine used may have been responsible for drying the eggs' surface, preventing larvae from hatching.

According to quadratic analysis and the Fisher (1930) principles, a population only shows stability when the SR is 1:1. In this study, the sexual rates of individuals tested in the three treatments with UV-C radiation and control indicated population stability. According to Fisher, a deviation in this SR is not evolutionarily stable, because gradual increases will occur in future generations, in relation to the proportion of the sex observed in smaller numbers.

Most clinicians who use larval therapy acquire the medicinal larvae from large laboratories (van Der Plas et al. 2009); those who

make their own productions do not usually keep track of biological parameters of their flies, such as mass, SR or viability.

Only T1 produced 100% of normal adult individuals (T2, T3, and control = 99%); however, the difference was not statistically significant. Ferraz et al. (2014), tested different concentrations of ciprofloxacin antibiotic in the development of *C. putoria* (Diptera: Calliphoridae) and showed a 100% normality for the control, T1 = 96%, T2 = 98% and T3 = 99%, similar to the values found in our study. The emergence of the adult happens through an alternation between dilation and contraction of the liquid of the ptilinum (Smith 1986, Gennard 2007), located in the head, that breaks the puparium allowing the displacement out of the pupa. During this phase, some flies cannot complete this course without loss of material. This fact may explain the mentioned abnormalities (two flies with one wing broken and one without a leg) and not the mutagenic action of the UV-C rays.

Sterilization by UV-C rays is widely used in the food industry (Ingram and Roberts 1980, Faria 2001) to disinfect various types of products and their containers. It has also been used to inactivate eggs of parasitic insects (Brownell et al. 2006). It is an efficient method of sterilization; however, the use of specific material that absorbs the UV-C rays is required, as well as the control of the ideal time period for not disabling the eggs of the flies.

Sterilization of *C. vicina* eggs using UV-C rays proved to be a valid and efficient method. This physical process of sterilization presented several advantages, namely its low operating costs, does not leave chemical residues in the fly eggs, is quick, and is able to keep with the increasing demand for the large-scale production of therapeutic larvae.

References Cited

- Aaron, G. P., W. A. Nazni, H. L. Lee, M. A. Ariff, M. Saranam, A. S. Naicker and Z. Osman. 2009. Maggot debridement Therapy with *Lucilia cuprina*: a comparison with conventional debridement in diabetic foot ulcers. *Int. Wound J.* 6: 39-46.
- Baer, W.S. 1931. The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *J. Bone. Surg.* 13: 438-75.
- Brasil. 2010. Farmacopeia Brasileira, Vol. 2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Anvisa, Brasília. 546 p.
- Brownell, S. A., and K. L. Nelson. 2006. Inactivation of single-celled *Ascaris suum* eggs by low-pressure UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2178-2184.
- Byrd, J. H., and J. L. Castner. 2010. Insects of forensic importance. In J. H. Byrd and J. L. Castner (eds.), *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. 2nd ed. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Cerovsky, V., and R. Bém. 2014. Lucifensins, the insect defensins of biomedical importance: the story behind maggot therapy. *Pharmaceuticals (Basel)*. 7: 251-64.
- Contreras, R. J., A. F. Suarez, M. K. Orantes, M. L. E. Mares, and D. J. Cherit. 2005. Larval debridement therapy in México. *Wound Care Can.* 3: 45-46.
- Dallavecchia, D. L., R. G. Silva Filho, and V. M. Aguiar. 2014. Sterilization of eggs of the screw worm, *Chrysomya putoria*, for use in biotherapy. *J. Insect Sci.* 14: 1-5.
- Dallavecchia, D. L., A. C. P. Ferraz, G. S. de Miranda, A. S. da Silva, and V. Magalhães-de-Aguiar. 2015. Comparative study between chicken gizzards and beef as diets and its influences on the post-embryonic development and longevity of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *EntomoBrasilis* 8: 17-23.
- Faria, J. A. E. 2001. Packaging sterilization system. BR National Institute of Industrial Properties (INPI). Patent 1427.
- Ferraz, A. C. P., D. L. Dallavecchia, R. P. Carvalho, D. C. Silva, R. G. Silva Filho, V. M. Aguiar. 2014. Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of an Old World screwworm fly, *Chrysomya putoria*. *J. Insect Sci.* 14: 1-11.
- Fisher, R.A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.
- Fowler, E., and L. van Rijswijk. 1995. Using wound debridement to help achieve the goals of care. *Ostomy. Wound. Manage.* 41: 23S-35S; discussion 36S.
- Geary, M. J., A. Smith, and R. C. Russell. 2009. Maggots down under. *Wound Practice and Research*. 17: 1.
- Gennard, D. E. 2007. *Forensic entomology - an introduction: The life cycles of flies and beetles*. Wiley, United Kingdom.
- Guimarães, J. H. and N. Papavero. 1999. Myiasis in man and animals in the Neotropical Region: bibliographic database. FAPESP, São Paulo, Brazil. 308 p.
- Leclercq, M. 1990. Utilisation de larves de Diptères - Maggot Therapy - en médecine: historique et actualité. *Bull. Ann. Soc. R. Belge Entomol.* 126: 41-50.
- Ingram, M., and T. A. Roberts. 1980. Application of the "D-concept" to heat treatments involving curing salts. *J. Food Technol.* 6: 21-28.
- International Commission on Microbiological Specification For Foods (ICMSF). 1980. *Microbial ecology of foods*, vol. 1. Academic Press, New York, NY.
- Limsopatham, K., P. Khamnoi, K. L. Sukontason, D. Boonyawan, T. Chairwong, and K. Sukontason. 2017. Sterilization of blow fly eggs, *Chrysomya megacephala* and *Lucilia cuprina*, (Diptera: Calliphoridae) for maggot debridement therapy application. *Parasitol. Res.* 116: 1581-1589.
- Mohd Masri, S., W. A. Nazni, H. L. Lee, T. A. T. Rogayah, and S. Subramaniam. 2005. Sterilisation of *Lucilia cuprina* Wiedemann maggots used in therapy of intractable wounds. *Trop. Biomed.* 22: 185-189.
- Mumcuoglu, K. Y., A. Ingber, L. Gilead, J. Stessman, R. Friedmann, H. Schulman, H. Bichucher, I. Ioffe-Uspensky, J. Miller, R. Galun, et al. 1999. Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. *Int. J. Dermatol.* 38: 623-627.
- Mumcuoglu, K. Y., J. Miller, M. Mumcuoglu, M. Friger, and M. Tarshis. 2001. Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 38: 161-166.
- Nasoori, A., and R. Hoomand. 2017. Maggot debridement therapy for an electrical burn injury with instructions for the use of *Lucilia sericata* larvae. *J. Wound Care.* 26: 734-741.
- Nitsche, M. J. T. 2010. Avaliação da recuperação das lesões cutâneas por meio da terapia larval utilizando como modelos ratos Wistar. PhD Thesis. UNESP, São Paulo, Brasil.
- van der Plas, M. J., M. Baldry, J. T. van Dissel, G. N. Jukema, and P. H. Nibbering. 2009. Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia.* 52: 1962-1970.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Reames, M. K., C. Christensen, and E. A. Luce. 1988. The use of maggots in wound debridement. *Ann. Plast. Surg.* 21: 388-91.
- Sherman, R. A. 2003. Maggot therapy for treating diabetic foot ulcers unresponsive to conventional therapy. *Diabetes Care.* 26: 446-451.
- Sherman, R. A. 2014. Mechanisms of maggot-induced wound healing: what do we know, and where do we go from here? *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014: 1-13.
- Sherman, R. A., M. J. Hall, and S. Thomas. 2000. Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 55-81.
- Sherman, R. A., S. Morrison, and D. Ng. 2007. Maggot debridement therapy for serious horse wounds - a survey of practitioners. *Vet. J.* 174: 86-91.
- Simmons, S. W. 1934. Sterilization of blowfly eggs in the culture of surgical maggots for use in the treatment of pyogenic infections. *Am. J. Surg.* 25: 140-147.
- Smith, K. G. V. 1986. *A manual of forensic entomology*. Trustees of the British Museum (Natural History), London, United Kingdom.
- Teick, S., and R. A. M. Myers. 1986. Maggot therapy for severe skin infections. *South Med. J.* 79: 9.
- WHO. 2017. Antimicrobial resistance. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>


Publicação 2

(Capítulo V)



SHORT COMMUNICATION

Antibacterial and antifungal activity of excretions and secretions of *Calliphora vicina*

D. L. DALLAVECCHIA^{1,2} , E. RICARDO^{1,3}, A. S. DA SILVA⁴
and A. G. RODRIGUES^{1,3,5}

¹Microbiology Division, Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Porto – Alameda Prof. Hernani Monteiro, Porto, Portugal, ²CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília, Brazil, ³Center for Health Technology and Services Research – CINTESIS, University of Porto, Porto, Portugal, ⁴Department of Quantitative Methods, Federal University of the State of Rio de Janeiro - UNIRIO, Rio de Janeiro, Brazil and ⁵Burn Unit, São João Hospital Center, Porto, Portugal

Abstract. Antibiotic-resistant bacteria pose a major threat to global health in the 21st century, requiring a quick, cheap and effective response from public health officials. This study evaluated the antimicrobial activity of native excretions/secretions (NES) produced by third instar (3 days old) larvae of *Calliphora vicina* using a protocol adapted from the Institute of Clinical and Laboratory Standards (CLSI). The microorganisms tested were: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* and the fungus *Candida albicans*. After the incubation period, the suspensions were diluted and spread on nutrient agar plates to count the colony-forming units. A turbidimetric test also was carried out to test the action of the NES of *C. vicina* against *S. aureus*, a very common bacterial species, with an enormous capacity for adaption and resistance, being one of the bacteria of medical importance that causes the most hospital and community infections in the world. According to our results, the NES of *C. vicina* exhibits antimicrobial activity at different dilutions, being most effective against the gram-negative bacteria *E. coli* and *K. pneumoniae*.

Key words. antimicrobial activity, calliphorid larvae, native excretions/secretions (NES), natural antibiotics.

Introduction

Antibiotic resistance is one of the most serious global health threats. According to a 2016 study, approximately 700 000 people die each year from infections caused by antibiotic-resistant bacteria. Experts predict that this number could increase by up to 10 million deaths per year by 2050 (O'Neill, 2016). Although bacterial resistance is part of the natural survival mechanism related to the evolution of bacteria, the indiscriminate use of antibiotics has been accelerating this mechanism of action, creating multi-resistant microorganisms.

Many drugs like aspirin, codeine, quinine and penicillin are made from natural compounds such as plants, microorganisms and marine organisms, among others. Extracts made from

insects, such as bees, wasps, ants, flies, butterflies, moths, cockroaches, beetles etc., have been used as folk medicines, acting as anti-allergic, anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial, antiviral and even anticancer (Ratcliffe *et al.*, 2011).

Chernysh *et al.* (2015) conducted a study to compare the development of resistance of bacteria treated with conventional antibiotics and with antimicrobials derived from insects, namely Diptera, over multiple generations of selection. The authors observed that already in the initial generations, the bacteria treated with conventional antibiotics acquired resistance, the same was not observed with the treatment made with antimicrobials derived from insects. This shows that insect antimicrobials are an efficient alternative for creating new antibiotics in the future.

Correspondence: Daniele Lourinho Dallavecchia, Microbiology Division, and Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Porto, Alameda Prof. Hernani Monteiro, 4200-319 Porto, Portugal. Tel.: +351 915779691; E-mail: daniele@dallavecchia@gmail.com

Flies of the Calliphoridae family, due to their necrophagous eating habits and because they are natural decomposers of organic matter throughout their biological cycle, come into contact with several pathogens. This contact is the principal reason for the development of an immune system with high resistance to numerous microorganisms giving the calliphorids the ability to produce and secrete potent antimicrobial substances, with a high potential for the development of natural medicine (Yakovleva et al., 2019).

The excretions and secretions of fly larvae are rich in natural compounds with numerous low-molecular-weight metabolites with recognized activity against gram-positive and gram-negative bacteria. They also have in their composition proteins such as serine protease (similar to trypsin and chymotrypsin), lucifensine and three proline-rich antimicrobial peptides (Díaz-Roa et al., 2014).

Some studies have found that native fly larvae excretions and secretions (NES) are divided into molecular fractions or small defence particles called antimicrobial peptides (AMPs). However, to extract those compounds for antibiotic use, requires the use of ultrafiltration or molecular separators, which are relatively complicated protocols, in addition to increasing production costs due to the use of expensive devices and reagents (Bexfield et al., 2008; Chernysh et al., 2015; Evans et al., 2015).

Thus, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of NES of *Calliphora vicina* (Robineau – Desvoidy 1830) (Diptera: Calliphoridae) in its pure state (without molecular fractionation or any separation of its components) against the bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and the yeast *Candida albicans*.

Material and methods

Larvae

The larvae used in this study originated from the stock colony of *C. vicina*, reared at the Diptera Study Laboratory, Microbiology Division, Department of Pathology of the Faculty of Medicine, University of Porto, according to the methodology developed by Dallavecchia et al. (2019). Third instar larvae from the first and second generation of flies born in the laboratory were used.

Production of native excretions/secretions (NES)

After the larvae hatched, they were fed chicken gizzards and kept at room temperature until they reached the third instar (3 days old) (Dallavecchia et al., 2015). Then, the larvae were transferred to a glass containing cold water (4 °C) with the objective to reduce their movements in order to obtain their mass on a semi-analytical scale.

Subsequently, the excess water was drained and the larvae were placed in Petri dishes with filter paper discs until complete dry. Next, a known mass of larvae (100 g) was placed into a conical 50 mL centrifuge tube containing a volume of sterile Milli-Q[®] ultrapure water (Milli-Q[®] UPW; Merck, Darmstadt, Germany) equivalent to 100 µL per gram of larvae and incubated

at 37 °C for 1 h. The supernatant, containing the produced NES, was then collected and transferred to 1000 µL microcentrifuge tubes, centrifuged at 12 000 g for 10 min at 4 °C, in order to separate the debris and insoluble material. The remaining supernatant was sterilized by filtration through a 0.22 µm pore membrane filter.

To check for contamination, a 50 µL aliquot of the NES sample was spread on a plate with Mueller-Hinton Agar (MHA, Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (Te), Italy), then the plate was incubated for 24 h at 37 °C, after the incubation period the plates were analysed for growth of bacterial colonies. The pH of the NES was determined (pH meter Consort C860, Tumbout, Belgium) and the protein concentration quantified using the BCA kit (Protein Assay Reagent, Pierce, Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA). NES were stored at –20 °C until use.

Microorganisms

The microorganisms used in this study were three bacteria species and one fungi. The type strains *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and *K. pneumoniae* LM1102 and the yeast *C. albicans* LM026, both clinical isolates, were obtained from the collection deposited at the Microbiology Division, Department of Pathology of the Faculty of Medicine, University of Porto.

Antimicrobial assays

Colony-forming unit assay. Two protocols were used for the preparation of microorganisms: M07-A9 for bacteria and M27-A3 plus supplement M27-S4 for yeasts, according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Briefly, the bacteria were grown on Soybean Tryptone Agar (TSA; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (Te), Italy) and yeasts on Sabouraud Agar (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi (Te), Italy) and incubated at 37 °C for 24 h.

For each microorganism, according to the protocols mentioned above, isolated colonies were selected and a suspension was prepared on the 0.5 McFarland density scale (approximate cell density 1×10^8 CFU/mL). The microbial suspension was prepared with 1×10^6 CFU/mL for bacteria and 1×10^5 CFU/mL for *C. albicans*.

The NES with protein concentration 306.45 µg/mL was serially diluted by 50%. The concentration used in the assays with bacteria was diluted ten times (1/2 to 1/1024) and for *C. albicans* nine times (1/2 to 1/512). One hundred microliters of each NES dilution and 100 µL of microbial inoculum were mixed in a 96-well microplate, in triplicate. The microplates were incubated at 37 °C and the results were read after 24 h. After the incubation period, 50 µL of culture from each well was plated onto MHA for bacteria or onto Sabouraud Agar for *C. albicans*, in triplicate, and incubated at 37 °C. Colony-forming unit (CFU) were counted after 24 h of incubation.

Turbidimetric assay. The turbidimetric assay was adapted from Thomas *et al.* (1999). The bacterial strains were incubated in 10 mL Soybean Tryptone Broth (TSB; Merck, Darmstadt, Germany) medium overnight at 37 °C with shaking (150 rpm). Subsequently, 100 µL of inoculum was transferred to 5 mL of TSB medium and incubated again at 37 °C with shaking (150 rpm), until the optical density of 0.200–0.250 at 600 nm (exponential phase).

In a 96 well polystyrene microplate, 20 µL of bacterial inoculum was incubated with 180 µL of NES (protein concentration equivalent to 306.45 µg/mL), making a final volume of 200 µL in each well. Two controls were used: for the positive control, 20 µL of bacterial inoculum incubated with 180 µL of sterile Milli-Q[®] ultrapure water (replacing the NES); for the negative control, 180 µL of NES was incubated with 20 µL of TSB medium.

The NES microplate was read by a Tecan Sunrise ELISA reader (Infinite 200, Tecan Trading AG, Switzerland) at 600 nm, every hour for 7 h and after 24 h of incubation at 37 °C. The reader shook the plates for 5 s before each reading. The assays were performed in triplicate.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the software R, version 1.2.1335 (RStudio Version 1.2.1335). The Shapiro-Wilk parametric test was used to test the assumption of normality. The Kruskal-Wallis test (non-parametric test) was used, with regard to the CFU count and turbidimetric assay. In all tests used, the level of significance considered was $P \leq 0.05$. The experiments were carried out in triplicate; data are expressed as arithmetic mean \pm standard error of mean (SEM).

Results

NES characteristics

The NES extracted from *C. vicina* larvae had a protein concentration of 306.45 µg/mL and a pH of 8.05.

Antimicrobial activity

According to the counting of CFU, all dilutions of NES (1/2 to 1/1024) showed inhibition of the bacterial growth of gram-negative bacteria *E. coli* and *K. pneumoniae*. The fungus *C. albicans* also suffered inhibition in all dilutions of NES tested (1/2 to 1/512). Analysing the different dilutions, no significant difference was observed ($P \leq 0.05$) for the microorganisms evaluated.

Fig. 1A shows percentage inhibition of up to 91% ($n = 3$) of *E. coli* growth in the 1/64, 1/128 and 1/1024 dilutions compared to the positive control. The other dilutions had an average inhibition that varied between 61 and 90% ($n = 3$). For *K. pneumoniae*, a 100% ($n = 3$) inhibition of bacterial growth was observed with the 1/2 dilution, followed by 97% ($n = 3$) with the 1/4 dilution and above 80% ($n = 3$) for 1/64 and 1/1024 dilutions (Fig. 1B).

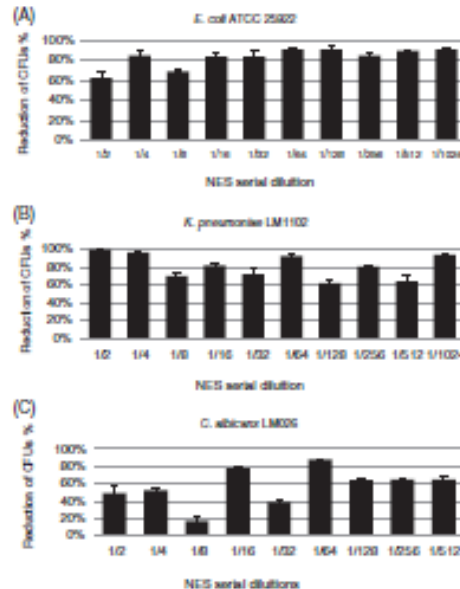


Fig. 1. Antimicrobial activity of native excretions and secretions of the fly *Calliphora vicina* determined by CFU count of bacterial strains of (A) *Escherichia coli*, (B) *Klebsiella pneumoniae* and the yeast (C) *Candida albicans*. CFU counts are presented as mean values ($n = 3$) of each concentration obtained by the ratio between the growth of the positive control (without NES)/bacterial growth in the presence of NES. The error bars indicate the standard error ($P < 0.05$).

The growth of the fungus *C. albicans* incubated with NES can be seen in Fig. 1C, where 81% ($n = 3$) of the microorganisms were inhibited with 1/64 dilution. Lower inhibition (17%, $n = 3$) was observed with a 1/8 dilution. All other microbial dilutions reduced growth by >50%.

In previous studies (unpublished data), we observed that the NES of *C. vicina* has little effect on *S. aureus*, a pathogenic species that causes great concern to health professionals. Due to the limited amount of NES samples available, we decided to perform a turbidimetric test to observe the growth of *S. aureus* with a high concentration of NES (180 µL of NES incubated with 20 µL of inoculum). NES was able to inhibit this species for up to 4 h, where it can be seen, through the growth curve, that the antibacterial action power of the NES decreased with time (Fig. 2).

Discussion

In our study, all dilutions of pure *C. vicina* NES showed antimicrobial activity for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *C. albicans*. Variations in results have been reported by various authors (Barnes *et al.*, 2010; Ratcliffe *et al.*, 2011; Ratcliffe *et al.*, 2015) and perhaps the reasons are abiotic factors such as diet, stress caused by

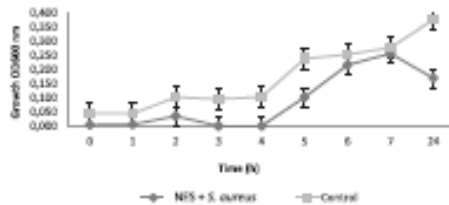


Fig 2. Growth curve of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in the presence of native excretions and secretions of the fly *Calliphora vicina* (protein concentration of 306.45 µg/ml.) compared to the control (without NES). OD600 nm values are presented as mean values ($n = 3$) and the growth curve was calculated by the ratio of growth of the positive control/bacterial growth (OD2.001) and the error bars indicate standard error.

laboratory conditions (temperature and humidity), NES extraction method, different diluents, or due to loss of NES activity due to bacterial contaminant LPS (lipopolysaccharides).

Ratcliffe *et al.* (2015) reported reduction in *E. coli* growth using NES of three species of Calliphoridae (*Chrysomya megacephala*, *C. albiceps* and *C. putoria*). In contrast, Thomas *et al.* (1999) when incubating NES by *Lucilia sericata* with *E. coli* noticed that the bacterial population, in addition to not undergoing reduction, seems to have used the NES as a substrate to increase its microbial population. Already Chernysh *et al.* (2015) when analysing antimicrobial peptides from the fractional NES of *C. vicina* against *Escherichia coli*, observed a high inhibition of this strain, corroborating with the results found in our studies.

The pure NES of *C. vicina* also acted efficiently against *K. pneumoniae*. Similar results were found by Bexfield *et al.* (2008), when the authors used ultra-filtered NES (molecules <500 daltons) of *L. sericata*, however, in the same study, they observed that the pure NES of this species was not as efficient as the ultra-filtered one.

As for antifungal activity, the less concentrated NES (1/64 to 1/512) were more effective when compared to the more concentrated NES (1/2 to 1/8). Evans *et al.* (2015) also tested the action of the pure NES of *L. sericata* and fractionated NES (>10 kDa, 10–0.5 kDa and <0.5 kDa), where they found significant antifungal activity of the pure NES and the smallest fraction NES (<0.5 kDa).

These results and the results of previous studies show that both pure NES and fractionated NES have antimicrobial efficiency with similar potentials of action. Pure NES is a simpler, faster and cheaper product to produce when compared to fractionated NES that demands preparation time in its process, additionally needing equipment and reagents. In cases where large amounts of antimicrobials are in high demand or required in remote locations with difficult access to laboratory equipment, it is essential that an antimicrobial is simple and quick to produce.

Chaiwong *et al.* (2016), analysing the NES of *Chrysomya* incubated with *S. aureus* did not observe the inhibition of microbial growth, on the contrary, there was even growth induction. Ratcliffe *et al.* (2015) analysing three species of *Chrysomya*, observed that there was a reduction in growth of

S. aureus. Masiero *et al.* (2017), tested the NES of *Cochliomyia macellaria*, and observed inhibition of *S. aureus* only during the first 2 h, this same result was found in our study, where *S. aureus* was reduced by the NES of *C. vicina* for up to 4 h. On the other hand, *L. sericata* NES has been shown to be more efficient in reduction of *S. aureus*, including methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) (Thomas *et al.*, 1999; Bexfield *et al.*, 2004; Bexfield *et al.*, 2008; Barnes *et al.*, 2010).

This contradiction in the results also was observed by Barnes *et al.* (2010) who stated that the causes can be various, ranging from different experimental techniques, size of bacterial inoculums, as well as different protocols and diluents used in the extraction of NES. Another hypothesis would be the one presented by Chernysh *et al.* (2015) who fractionated the NES of *C. vicina* into 53 parts of antimicrobial peptides and found that 19 of these parts were responsible for a specific response to a given microorganism. These specific responses happen when insects come into contact with pathogens throughout their lives and acquire infections creating natural defences that develop and accumulate in the haemolymph, which produce AMP defence complexes. These complexes comprise all major families of insect AMPs, such as defensins, cecropins, dipterocins, proline-rich peptides and alloveron antiviral peptides.

In conclusion, the NES of *C. vicina* has high antimicrobial action against gram-negative bacteria such as *E. coli* and *K. pneumoniae*, moderate action against *C. albicans* and short-lived action against gram-positive bacteria such as *S. aureus*. Therefore, the NES of *C. vicina* can be considered to have potential as a natural antibiotic that is simple and cheap to manufacture.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Data availability statement

Data available on request from the authors - The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- Barnes, K.M., Dixon, R.A. & Genard, D.E. (2010) The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): variation in laboratory evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, **82**, 234–237.
- Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S. & Ratcliffe, N.A. (2004) Detection and partial characterization of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and Infection*, **6**, 1297–1304.
- Bexfield, A., Bond, A.E., Roberts, F.C. *et al.* (2008) The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria of a <500 Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Microbes and Infection*, **10**, 325–333.

- Chaiwong, T., Srivoramas, T., Sebsumran, P., Panya, M., Wanran, S. & Panomkit, P. (2016) Antibacterial activity of excretions-secretions from *Chrysomya megacephala* against *Escherichia coli*. *Journal of the Medical Association of Thailand*, **99**, S7–S11.
- Chernysh, S., Godya, N. & Suborova, T. (2015) Insect antimicrobial peptide complexes prevent resistance development in bacteria. *PLoS One*, **10**, e0130788.
- Dallavechia, D.J., Ferraz, A.C.P., Miranda, G.S., Silva, A.S. & Aguiar, V.M. (2015) Comparative study between chicken gizzards and beef as diets and its influences on the post-embryonic development and longevity of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Entomofauna*, **8**, 17–23.
- Dallavechia, D.J., Ricardo, E., Aguiar, V.M., Silva, A.S. & Rodrigues, A.C. (2019) Efficacy of UV-C ray sterilization of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) eggs for use in maggot debridement therapy. *Journal of Medical Entomology*, **56**, 40–44.
- Díaz-Roa, A., Gaona, A.M., Segura, A.N., Suárez, D., Palamoyo, A.M. & Bello, J.F. (2014) *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have potent antibacterial activity. *Acta Tropica*, **136**, 37–43.
- Evans, R., Dudley, E. & Nigam, Y. (2015) Detection and partial characterization of antifungal bioactivity from the secretions of the medicinal maggot, *Lucilia sericata*. *Wound Repair and Regeneration*, **23**, 361–368.
- Mastero, F.S., Aquino, M.F., Nassu, M.P., Pereira, D.J., Leite, D.S. & Thysen, P.J. (2017) First record of larval secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (Diptera: Calliphoridae) inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotropical Entomology*, **46**, 125–129.
- O'Neill, J. (2016) Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The review on antimicrobial resistance. [Internet]. London. <https://amr-review.org/Publications.html>. Review Paper – Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf [accessed on 14 January 2020].
- Ralcliffe, N.A., Mello, C.B., Garcia, E.S., Bull, T.M. & Azambuja, P. (2011) Insect natural products and processes: new treatments for human disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **41**, 747–769.
- Ralcliffe, N.A., Vieira, C.S., Mendonça, P.M. et al. (2015) Detection and preliminary physico-chemical properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. *Acta Tropica*, **147**, 6–11.
- Thomas, S., Andrews, A.M., Hay, N.P. & Bourgoise, S. (1999) The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of Tissue Viability*, **9**, 127–132.
- Yakovleva, A.Y., Kruglikova, A.A. & Chernysh, S.I. (2019) Calliphoridae flies in medical biotechnology. *Entomological Review*, **99**, 292–301.

Accepted 25 September 2020