

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

**PROSPECÇÃO DE BIOATIVIDADE DE *Brevibacillus laterosporus* SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830)  
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE), EM LABORATÓRIO**

**RENATA ROCHA PESSANHA**

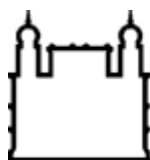
Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como  
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Biodiversidade e Saúde

Orientador: Prof. Dra. Viviane Zahner

Coorientador: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

**RIO DE JANEIRO**

**2013**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

**PROSPECÇÃO DE BIOATIVIDADE DE *Brevibacillus laterosporus* Laubach, 1916**  
**SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Lucilia cuprina***  
**(Wiedemann, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), EM LABORATÓRIO**

**RENATA ROCHA PESSANHA**

Orientador: Prof. Dra. Viviane Zahner

Coorientador: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Aprovado em:

12 / 07 / 2013

EXAMINADORES:

Dra Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Dra Deise Maria Fontana Capalbo

Dr José Mario D'Almeida

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

P475 Pessanha, Renata Rocha

Prospecção de bioatividade de *Brevibacillus laterosporus* Laubach, 1916 sobre o desenvolvimento pós embrionário de *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae), em laboratório. Renata Rocha Pessanha. – Rio de Janeiro, 2013.

xi, 53 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2013

Bibliografia: f. 45-53

1. Controle biológico. 2. Bioatividade. 3. Diptera

CDD 596.774

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus. Em segundo lugar aqueles que em nenhum momento deixaram de olhar por mim. A todos os Orixás por me proteger e iluminar. Especialmente à minha Mãe Iemanjá, à Maria Padilha, Seu Zé, Vovó Maria Conga, Seu Boiadeiro, Guerreiro de Fogo por abrirem meus caminhos, me ajudarem nas dificuldades e por estarem sempre em minha companhia.

Às minhas orientadoras Viviane Zahner e Margareth Queiroz pela oportunidade de encarar um novo desafio, e pela infraestrutura oferecida para que o trabalho fosse realizado.

À Dr. Jacenir Mallet pela paciência e grande ajuda para confecção das micrografias.

À CAPES pelo financiamento que permitiu a concretização do estudo.

Aos amigos de laboratório Alexandre, Carlos, César, Eliane, Isabel, Lucas, Luis, Marcio, Paloma, Rebecca, Rodrigo, Tayra, Vinícius, Vítor e Zeneida em pela grande ajuda com ideias diante dos diversos imprevistos e empecilhos que permearam durante um longo tempo.

Às amigas do mestrado Aline Schilithz, Ana Carolina Bastos, Ana Carolina Valente, Ana Paula Gomes, Carolina Dale, Caroline Fonseca, Karla Bitencourth, e ao César Pinto pelo companheirismo durante esses dois anos de muito *stress*.

Aos Familiares pelo suporte. Aos meus pais, Helena e Paulo pela compreensão, à minha irmã Paula pela ajuda, aos irmãos Luana e Júnior simplesmente por fazerem parte da minha vida.

Finalmente a Steven Tyler, Axel Rose, Diogo Nogueira, Chris Cornell, Chad Kroeger, Ana Carolina, Seu Jorge, dentre outros pela grande companhia durante a confecção deste texto.

“Ter consciência da ignorância é o início da sabedoria”

Marion Zimmer Bradley

## ÍNDICE

Resumo.....	ix
Abstract.....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Dípteros causadores de miíases .....	3
1.2. Métodos de controle de insetos vetores .....	4
1.2.1. Controle mecânico.....	4
1.2.2. Controle químico.....	5
1.2.3. Controle biológico.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	8
2.1. Família Calliphoridae.....	8
2.2. Gênero <i>Lucilia</i> .....	8
2.3. <i>Lucilia cuprina</i> .....	9
2.4. <i>Brevibacillus laterosporus</i> .....	10
3. METODOLOGIA .....	12
3.1. Estabelecimento da colônia de <i>Lucilia cuprina</i> .....	12
3.2. Preparo das suspensões .....	13
3.3. Obtenção das neolarvas.....	14
3.4. Bioensaio.....	15
3.3. Microscopia.....	17
3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura .....	17
3.3.2 Microscopia óptica.....	18
3.4. Análise de dados.....	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1. Grupo testado com suspensões não diluídas .....	25
4.2. Grupo testado com suspensões diluídas a $10^{-4}$ .....	29
4.3. Grupo testado com suspensões diluídas a $10^{-5}$ .....	32
4.4. Efeitos subletais .....	36

5. CONCLUSÕES .....	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

## LISTA DE FIGURAS

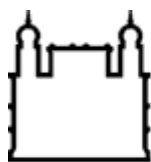
Figura 1 – Local da captura de adultos de <i>Lucilia cuprina</i> para formação de colônia em laboratório. (A) e (B) caçamba utilizada para deposição de lixo. (C) localização da caçamba na comunidade do Amorim – RJ. ....	12
Figura 2 – Gaiola para criação de adultos de <i>Lucilia cuprina</i> contendo água e açúcar para manutenção dos insetos (colônia estoque). ....	13
Figura 3– Recipientes utilizados para criação dos imaturos de <i>Lucilia cuprina</i> . ....	15
Figura 4 – Tubo de ensaio contendo vermiculita para pupação da larva de <i>Lucilia cuprina</i> . .	16
Figura 5 - Insetos fixados nos <i>stubs</i> para visualização em microscópio de varredura. ....	18
Figura 6 - Mortalidade de pupas de <i>Lucilia cuprina</i> de acordo com a suspensão de <i>Brevibacillus laterosporus</i> oferecida. ....	22
Figura 7 – Duração do período de neolarva a adulto (dias) de <i>Lucilia cuprina</i> tratado com soluções não diluídas (ctrl = controle puro; NaCl = controle salina). ....	23
Figura 8 – Duração do período de neolarva a adulto (dias) de <i>Lucilia cuprina</i> tratado com soluções diluídas a $10^{-4}$ (ctrl = controle puro; NaCl = controle salina). ....	23
Figura 9 – Duração do período de neolarva a adulto (dias) de <i>Lucilia cuprina</i> tratado com soluções diluídas a $10^{-5}$ (ctrl = controle puro; NaCl = controle salina). ....	24
Figura 10– Micrografia mostrando indivíduos tratados com <i>Brevibacillus laterosporus</i> incapazes de sair do pupário. (A) adulto de <i>Lucilia cuprina</i> com parte do corpo exteriorizado do pupário. (B) indivíduo incapaz de ir além da abertura da pupa. ....	38
Figura 11– Asa deformada de <i>Lucilia cuprina</i> tratada com <i>Brevibacillus laterosporus</i> . ....	39
Figura 12 – Micrografia de adulto de <i>Lucilia cuprina</i> tratado com estirpes de <i>Brevibacillus laterosporus</i> com corpo deformado achatado dorso-ventralmente e não inflado. ....	40
Figura 13 – Micrografia evidenciando a região da inserção das antenas em indivíduos da espécie <i>Lucilia cuprina</i> tratados com estirpes de <i>Brevibacillus laterosporus</i> . (A) tratado - saco ptilineal não retraído cobrindo a lúnula e o pedicelo, (B) não tratado - região em estado normal, SP – saco ptilineal, L – lúnula, P - pedicelo. ....	40



Figura 14 – Corte histológico evidenciando o corpo gorduroso em uma seção do segmento abdominal de larvas de terceiro ínstar de <i>Lucilia cuprina</i> . (A) controle, (B) tratado com <i>Brevibacillus laterosporus</i> , CG – corpo gorduroso. ....	42
Figura 15 – Corte histológico evidenciando uma das camadas da cutícula em uma seção do segmento abdominal de larvas de terceiro ínstar de <i>Lucilia cuprina</i> . (A) controle, (B) tratado com <i>Brevibacillus laterosporus</i> , C - cutícula. ....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso (mg) de larvas maduras (L3) de <i>Lucilia cuprina</i> dos grupos controle e tratado com cepas de <i>Brevibacillus laterosporus</i> nas diferentes diluições, em laboratório.....	20
Tabela 2 – Mortalidade larval dos grupos teste em relação à UFC/mL da suspensão inicial ..	25
Tabela 3 - Duração (dias) e mortalidade (%) larval, pupal e de neolarva a adulto de <i>Lucilia cuprina</i> do grupo tratado com cepas de <i>Brevibacillus laterosporus</i> sem diluição em laboratório.....	27
Tabela 4 - Duração (dias) e mortalidade (%) larval, pupal e de neolarva a adulto de <i>Lucilia cuprina</i> do grupo tratado com cepas de <i>Brevibacillus laterosporus</i> com diluição de $10^{-4}$ , em laboratório.....	30
Tabela 5 - Duração (dias) e mortalidade (%) larval, pupal e de neolarva a adulto de <i>Lucilia cuprina</i> do grupo tratado com cepas de <i>Brevibacillus laterosporus</i> com diluição de $10^{-5}$ , em laboratório.....	34
Tabela 6– Razão sexual dos indivíduos de <i>Lucilia cuprina</i> testados com diluições de <i>Brevibacillus laterosporus</i> e sua comparação aos grupos controle, em laboratório. ....	37
Tabela 7 - Deformidades apresentadas por <i>Lucilia cuprina</i> nos grupos teste e controle de acordo com a diluição oferecida contendo estirpes de <i>Brevibacillus laterosporus</i> .....	41



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### PROSPECÇÃO DE BIOATIVIDADE DE *Brevibacillus laterosporus* Laubach, 1916 SOBRE O DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE), EM LABORATÓRIO

#### RESUMO

Pertencendo a uma das famílias de insetos mais comuns do mundo, *Lucilia cuprina* possui grande importância médica-veterinária por ser causadora de miíases em animais com importância econômica e no Homem. Devido a essa importância, tentativas de controle desta espécie têm sido realizadas, porém o uso de inseticidas químicos além de ocasionarem o desenvolvimento de resistência pelos insetos é prejudicial ao ambiente. Neste trabalho, buscou-se encontrar uma estirpe de *Brevibacillus laterosporus* que pudesse ser utilizada como agente de controle biológico de *L. cuprina*. Para tal, foram realizados testes com 12 estirpes de *B. laterosporus* através de suspensões misturadas à dieta oferecida para as larvas e neolarvas. Como resultado, foram obtidas taxas de mortalidade larval que variaram de 30 a 70%, sendo inversamente proporcional a concentração bacteriana. Foram observados efeitos subletais, como a ocorrência de deformidades tanto interior quanto exteriormente - evidenciadas através das micrografias realizadas - desvios na razão sexual e alteração na viabilidade da emergência dos adultos dos grupos teste. A estirpe NRS 1648 mostrou ser a mais promissora devido à alta mortalidade larval e por ter demonstrado, assim como a estirpe NRS 661, eficácia em todas as diluições oferecidas. Os resultados obtidos neste trabalho contrapõem os resultados de Oliveira et al. (2004) que obtiveram, segundo seus critérios, a menor toxicidade em Diptera Nematocera, Lepidoptera, Coleoptera e sobre o molusco *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), justamente com essas estirpes. Sendo assim, nossos dados sugerem que esta bactéria é promissora para o uso como agente de controle de *L. cuprina*.

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EXPLORATION OF BIOACTIVITY OF *Brevibacillus laterosporus* Laubach, 1916 ON THE DEVELOPMENT OF POST-EMBRYONIC *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae), IN LABORATORY

#### ABSTRACT

Belonging to one of the most common families of insects in the world, *Lucilia cuprina* has great importance for being a veterinary causing of myiasis in animals of economic importance and humans. Due to its importance, attempts to control this species have been carried out. However the use of chemical insecticides besides the development of resistance by insects, is harmful to the environment. The present work, sought to find a strain of *Brevibacillus laterosporus* that could be used as biological control agent of *L. cuprina*, given the lack of side effects to the environment and to humans. For such tests twelve solutions containing strains of this bacterium were mixed to the diet offered to newly hatched larvae. As a result, we obtained rates of larval mortality 30-70% being inversely proportional to the concentration of bacteria in dilution afforded by having the highest mortality occurred with the lower density of bacteria. Besides sublethal effects such as the occurrence of deformities both inside and outside - as evidenced by the micrographs taken - deviations in sex ratio and changes in the viability of adult emergence of the test groups. The strain NRS 1648 proved to be the most promising as it caused the highest larval mortality. Moreover, it demonstrated, as well as the strain NRS 661, effectiveness in all dilutions afforded. The results of this study contradict the findings of Oliveira et al. (2004) that according to their criteria, NRS 1648 and NRS661 had the lowest toxicity to Nematocera Diptera, Lepidoptera, Coleoptera and the mollusk *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). Our results suggests that this bacterium is promising in the control of *L. cuprina*.

## 1. INTRODUÇÃO

A miíase (do grego *myia*=mosca) é conhecida desde a remota antiguidade e é relatada diversas vezes nas rapsódias de Homero (Perez et al. 1997), como descrita a seguir em uma passagem da *Ilíada*: “tenho receio de que entrementes as moscas penetrem nas chagas abertas pelo cruel bronze no corpo do filho do claro Menécio e criem larvas” (Homero, 2011).

Diversas famílias de Diptera aproveitam-se dos recursos disponibilizados por seus hospedeiros vertebrados, sejam para reprodução e nutrição através de suas excretas, ou para reproduzirem-se em seus cadáveres, tendo apenas algumas poucas passado para a vida parasitária, os quais são dípteros produtores de miíases (Perez et al. 1997).

A primeira definição de miíase é a descrita por Hope (1840) que diz ser o processo patológico referido a infestação de qualquer órgão do hospedeiro vertebrado por larvas de Diptera. Porém, a definição aceita universalmente é a de Zumpt (1965) que define como sendo a infestação de animais vertebrados e o homem com larvas de dípteros, os quais por pelo menos durante um período de tempo se alimentam de tecidos vivos ou mortos do hospedeiro, líquidos ou alimentos ingeridos (Perez et al. 1997).

O tipo de infestação causada por essas larvas é classificado pelas características da própria larva e pela lesão que esta irá produzir. As larvas biontófagas parasitam tecidos vivos, e necrobiontófagas as que parasitam tecidos necrosados em indivíduos vivos. Como exemplo, as lesões causadas por *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (espécie de hábito biontófago) são do tipo furunculóides individualizadas, com secreção serosa ou purulenta, já indivíduos que apresentam tecido necrosado em suas lesões podem ser acometidos por larvas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) (espécie necrobiontófaga), geralmente tida como invasora secundária, após o abandono de larvas de *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel, 1858) (espécie biontófaga) (Batista-da-Silva et al. 2009).

Em termos anatômicos, baseado na posição do corpo que irão ocorrer, as miíases podem ser classificadas em cutânea, subcutânea ou cavitária (quando afeta nariz, seios da face, ouvido, boca, ânus, vagina). São denominadas obrigatórias quando ocasionadas por dípteros que naturalmente se desenvolvem sobre ou dentro de vertebrados, facultativas

quando o tecido utilizado pelos dípteros estiver em decomposição em um indivíduo vivo, e pseudomiíase quando as larvas forem ingeridas com alimentos, sendo esta última mais comum em outros animais que não o homem. Em geral ocorrem com mais frequência no meio rural entre animais de criação como bovinos, suínos, ovinos etc. (Ribeiro et al. 2001).

Os dípteros muscoides da família Calliphoridae, popularmente conhecidos por moscas varejeiras podem ser considerados como pertencentes a uma das famílias de insetos mais comuns do mundo. Excetuando as espécies da subfamília Mesembrellinae, são moscas de coloração escura com reflexos metálicos azulados, esverdeados, violáceos ou cúpricos (Carvalho e Ribeiro 2000; Junqueira 2002). A ocorrência de suas espécies foi registrada em todas as regiões biogeográficas, sendo 80% restrita ao Velho Mundo, tendo a região Afrotropical a fauna mais rica de dípteros califorídeos (Junqueira 2002).

Na região neotropical, alguns gêneros dessa família como *Cochliomyia*, *Comptosiops*, *Lucilia*, *Calliphora* e *Chrysomya* são conhecidos causadores de miíases, e ao lado dos dípteros oestroides é uma das mais importantes famílias produtoras dessa enfermidade (Moretti e Thyssen 2006).

O gênero *Lucilia* é cosmopolita e possui 27 espécies com grande diversidade. Assim como os demais califorídeos, possui como características hábito sinantrópico, muitas espécies são saprófagas criando-se também em carcaças e organismos em decomposição, e alguns, especialmente machos, alimentam-se de néctar. Algumas de suas espécies naturais do Novo Mundo como *Lucilia eximia* (Wiedemman, 1819), sofreram um declínio populacional como resultado da invasão de outros califorídeos durante a década de 1970 (Moretti e Thyssen 2006; Gião e Godoy 2006).

A importância dos dípteros muscoides e sua afinidade com o homem e os animais domésticos são conhecidas desde a antiguidade, sendo de acordo com Greenberg (1973), Furlanetto et al. (1984), Schuller (2000) e Oliveira et al. (2002), capazes de carrear vários patógenos. Esses, assim como as moscas, encontram condições favoráveis para seu desenvolvimento em regiões de clima quente. Na região Neotropical é crescente o interesse pelo estudo dos dípteros causadores de miíases, devido à importância médica-sanitária dos ataques de larvas desses muscoides aos animais e ao homem.

O uso exclusivamente de praguicidas, torna difícil o controle de dípteros devido ao desenvolvimento de resistência aos inseticidas, além do provável impacto ao ambiente por

contaminar água, solo e ser tóxico a vertebrados, tornando-se viável o manejo integrado através da seleção e introdução de métodos de controle (Prado 2003).

O uso de patógenos e/ou seus metabólitos para o controle dos insetos, demonstra ser propício, pois além de apresentar poucos problemas com resistência, possui especificidade, e não é poluente e nem tóxico para animais, incluindo humanos. As toxinas das diferentes espécies de *Bacillus* podem variar consideravelmente em sua toxicidade, sendo sintetizadas durante a esporulação e quando ingeridas por insetos suscetíveis podem causar sérias lesões ou morte (Oliveira et al. 2006).

Algumas bactérias entomopatogênicas possuem grande potencial no controle biológico por poderem ser utilizadas como biopesticidas formulados. Foram casualmente descobertas no final do século XIX durante investigações de doenças em criações de abelhas da espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 e bicho-da-seda (*Bombyx mori* Linnaeus, 1758). Estudos têm sido feitos nos últimos anos para determinar os níveis de toxicidade dessas bactérias de forma que sejam aplicáveis ao controle de insetos praga (Costa et al. 2010, Alves et al. 2011, Melo et al. 2012).

A determinação da atividade biológica de estirpes de *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1915 e *Brevibacillus laterosporus* Laubach, 1916 contra algumas espécies de moscas tem sido investigada por diferentes autores. Cavados et al. 1998 mostraram que estirpes de *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis* são tóxicas para larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) somente em altas doses, enquanto outras se mostraram insignificantes. Por outro lado Ruiu et al. (2007) demonstraram que estirpes de *B. laterosporus* apresentam ação letal e subletal sobre *Musca domestica* Linnaeus, 1758.

### **1.1. Dípteros causadores de miíases**

A ordem Diptera é dividida em duas subordens: Brachycera (moscas, como a varejeira, moscas domésticas etc.) e Nematocera (mosquitos, flebotomíneos etc.) (Gullan e Cranston, 2007). Pertencem a esta Ordem insetos neópteros e holometábolos, e se diferenciam principalmente por apresentar apenas um par de asas membranosas, as mesotorácicas, enquanto o par metatorácico é modificado em um órgão de equilíbrio (balancins). O aparelho bucal pode ser picador ou lambedor (Oliveira-Costa et al. 2007). As larvas, ápodas, possuem aparelho bucal do tipo mastigador e muitas são predadoras ou se

alimentam de matéria orgânica vegetal em decomposição e de carcaças animais (Grimaldi e Engel, 2005). É a ordem de insetos que apresenta maior importância médica e veterinária, diretamente responsável pela transmissão da malária, dengue, febre amarela, filariose, leishmanioses, entre outras, e causadora de miíases. Moscas saprófagas e coprófagas são vetores mecânicos de várias doenças, além disso, podem infestar tecidos de animais ou do homem provocando miíases. Ainda há espécies que são pragas de plantas cultivadas e outras são benéficas apresentando papel polinizador (Oliveira-Costa et al. 2007).

Dentre as famílias consideradas como as mais importantes causadoras de miíases encontram-se Calliphoridae e Oestridae, apesar de serem poucos os membros que causam miíase obrigatória. As espécies da região Neotropical mais citadas como agentes de miíases são pertencentes à família Calliphoridae e aos gêneros *Cochliomyia*, *Comptosiops*, *Lucilia*, *Calliphora* e *Chrysomya*. Entretanto, ao considerar somente as espécies biontófagas causadoras de miíases em humanos as espécies limitam-se a *Dermatobia hominis* (família Oestridae), *Cochliomyia hominivorax*, (Macquart, 1842) (família Calliphoridae) (Moretti e Thyssen 2006; Batista-da-Silva et al. 2009; Sukontason et al. 2005).

## **1.2. Métodos de controle de insetos vetores**

Possuindo aproximadamente seis milhões de espécies conhecidas, os insetos constituem o grupo mais numeroso dentre os seres vivos da atualidade. Apesar de em sua maioria serem úteis para a manutenção do equilíbrio biológico, muitas vezes podem se tornar os principais responsáveis por prejuízos na manutenção deste equilíbrio e economicamente negativos para o Homem (Melo e Azevedo 1998).

Partindo deste princípio, diversas medidas podem ser utilizadas para o controle desses insetos, sendo colocadas, dentro do possível, da maneira mais racional visando minimizar os possíveis impactos que poderiam ser gerados pelos agentes de controle (Silva et al. 2001).

### **1.2.1. Controle mecânico**

O controle mecânico é realizado através de medidas simples e eficazes, possui custo elevado, mas com resultado permanente. É caracterizado por consistir de medidas físicas que removam ou reduzam a densidade populacional do inseto alvo, ou mesmo impedindo que este tenha meios para alcançar seus hospedeiros, podendo ser feito através de drenagem de



criadouros, coleta de lixo e correta destinação, colocação de telas, ensacamento de frutos e retirada de plantas que possam servir como atrativos (Silva et al. 2001; Moura et al. 2011).

### **1.2.2. Controle químico**

A partir da década de 1940, o controle de insetos tem sido feito através do uso de inseticidas químicos, os quais são indiscutivelmente eficazes em muitos casos. Porém, o uso indiscriminado desses agentes de controle pode acarretar no surgimento de resistência genética por parte dos insetos alvo, assim como a destruição de insetos polinizadores e os controladores naturais de pragas (Melo e Azevedo 1998).

Além disso, para que mantenha sua funcionalidade, os inseticidas químicos necessitam ter sua toxicidade aumentada tornando-se ainda mais perigosos para os envolvidos em sua aplicação. Do mesmo modo, para conseguir uma melhor eficácia na aplicação de inseticidas faz-se necessário conhecer a localização do alvo biológico a ser atingido (Melo e Azevedo 1998; Prado et al. 2010).

### **1.2.3. Controle biológico**

Além dos riscos com o uso de inseticidas químicos, outro incentivo para o uso de agentes de controle biológico é o retorno econômico que esses geram, cerca de cinco vezes mais (Melo e Azevedo 1998).

Existem em todo o mundo exemplos de programas que obtiveram sucesso no emprego do controle biológico, nestes o uso de agentes biológicos atua não somente em casos de problemas com pragas agrícolas, como também em problemas de saúde pública. No Brasil, métodos de controle a partir de nematoides vêm sendo estudados para o controle de dípteros, assim como a utilização de parasitoides valendo-se das relações entre estes e os insetos alvo (Melo e Azevedo 1998; Silva et al. 2010; Sá et al. 2012).

O controle biológico pode ser realizado através de inimigos naturais como outros animais que predam o inseto alvo, ou com a introdução de microrganismos (Silva et al. 2001).

Apesar dos microrganismos só terem sido descritos há quatro séculos, o controle microbiano vem sendo empregado desde a Antiguidade. Entretanto, o controle biológico

realizado com micro-organismos teve uma queda durante a década de 1940 com o surgimento dos compostos químicos no mercado, vindo a surgir novamente no final da década de 1950 tendo em vista os problemas gerados pelo uso de agroquímicos (Melo e Azevedo 1998).

O controle utilizando vírus é feito através da ingestão pelos insetos dos corpos de inclusão dos vírus. Sendo usados há mais de 50 anos, os principais vírus empregados no controle biológico de insetos são pertencentes à família Baculoviridae. Porém, o uso de vírus deve ser cauteloso, pois apesar de serem considerados seguros para o Homem e o ambiente, por tratar-se de agentes biológicos, alguns vírus podem afetar a população de predadores dos insetos alvo através da transmissão horizontal desses patógenos, apesar de em sua maioria os predadores não sofrerem efeitos dos patógenos ingeridos (Melo e Azevedo 1998; Lamas et al. 2000).

Os fungos são responsáveis por aproximadamente 80% das doenças que ocorrem nos insetos, sendo encontrados com frequência atacando os mesmos. Atualmente são conhecidas mais de 700 espécies de fungos que atacam insetos, porém espera-se que este número seja maior levando-se em consideração que os fungos estão entre um dos mais numerosos grupos existentes de seres vivos (Melo e Azevedo 1998).

Neste caso o processo de infecção dá-se pelo contato do inseto alvo com os esporos que aderem à cutícula e a partir de então germinam até que alcancem a hemolinfa. A utilização de fungos como agentes de controle pode ser empregada como um manejo integrado ao uso de inseticidas químicos, pois sua conservação é uma estratégia simples quando ligada a inseticidas seletivos (Melo e Azevedo 1998; Pires et al. 2010).

O controle biológico tem a possibilidade de ser usado isoladamente ou como parte de manejo integrado, pois além de apresentar especificidade não é poluente nem tóxico para humanos. As toxinas do gênero *Bacillus* são principalmente sintetizadas durante a esporulação e variam em sua toxicidade de acordo com a espécie alvo. Assim quando ingeridas por insetos suscetíveis podem causar sérias lesões ou ter do efeitos letais sobre o inseto alvo (Oliveira 2003; Oliveira et al. 2006).

Entretanto, o uso exclusivo e/ou intensivo de patógenos e seus produtos metabólicos para o controle de insetos pode resultar em resistência. Exemplos são vistos em algumas espécies de mosquitos, porém, ao mesmo tempo em que um inseto alvo torna-se resistente a um patógeno, este têm sua suscetibilidade aumentada a outro, como observado por Yuan et al. (2000) em *Lysinibacillus sphaericus* Meyer e Neide, anteriormente *Bacillus sphaericus*

Neide, 1904 e *Bacillus thuringiensis* variedade *israelensis* em campo e laboratório (Rao et al. 1995).

Entretanto, considerando os organismos entomopatogênicos, o primeiro microrganismo isolado que ataca um inseto praga não é necessariamente o melhor para ser utilizado, deve-se realizar uma busca dentre muitos outros, pois certamente será encontrado um mais apropriado, aproveitando a variabilidade natural pré-existente (Melo e Azevedo 1998).

Métodos alternativos de controle biológico têm sido estudados, e no que concerne à pesquisa básica, Cavados et al. (1998) e Carramaschi et al. (2009) observaram atividade de *Bacillus thuringiensis* sobre *C. megacephala* e *Brevibacillus laterosporus* sobre *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818), respectivamente. Floris et al. (2010) solicitaram patente sobre *B. laterosporus* demonstrando a possibilidade de utilização e a necessidade de aprofundamento de estudos a respeito desta bactéria em métodos de controle.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a bioatividade da bactéria *Brevibacillus laterosporus* sobre *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830), verificando a atividade de diferentes estirpes sobre a mortalidade dos indivíduos tratados, sobre o desenvolvimento dos dípteros (período larval, pupal e de larva a adulto), e verificar as alterações relacionadas à ultraestrutura dos insetos tratados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Família Calliphoridae**

Geralmente, os dípteros pertencentes a essa família possuem o tamanho do corpo variando de médio a grande, apresentando comumente sua coloração em tons metálicos dentre azul, violeta, verde ou cúprica, tem arista plumosa, os pelos são geralmente longos até o ápice. O pós-escutelo desses dípteros é inexistente ou é pouco desenvolvido. Mero e o anapímero com cerdas bem desenvolvidas, catepisterno com três cerdas, notopleura com duas cerdas e raramente como uma acessória; a cerda pós-umeral mais posterior situa-se de modo mais lateral que a pré-sutural; mesonoto com ou sem faixas pretas longitudinais; nervura M1+2 fortemente curvada para diante distalmente, estreitando desse modo a célula apical (R4+5); esquamas ou calípteros torácicos bem desenvolvidos; segmentos abdominais sem cerdas distais, ou estas pouco desenvolvidas; cerdas marginais de desenvolvimento variável (Serra-Freire e Mello 2006).

Os membros desse grupo são os insetos mais antigos e mais abundantes de que se tem conhecimento atualmente, tendo referências sobre seus indivíduos em papiros do Antigo Egito de 1550 a.C.. Contém mais de 1000 espécies em 150 gêneros distribuídos pelo mundo (Rognes 1991).

### **2.2. Gênero *Lucilia***

O Gênero *Lucilia* pertence à família Calliphoridae, possui coloração azul ou verde metálica, podendo ter reflexos cúpricos e amarelados. Possui tamanho médio, cerca de 8 a 10 mm de comprimento. Cabeça castanho-escuro com a parafaciália coberta por uma pilinosidade prateada ou amarelo-ouro. Olhos vermelho-pardacentos. Aristas longas e densamente pilosas. Tórax sem faixas longitudinais no mesonoto. Asas com o remígio sem pelos, dorsal e ventralmente (Serra-Freire e Mello 2006).

Este gênero é relativamente pequeno, possuindo em torno de 27 espécies e contém uma série de características que tornam este grupo interessante no que diz respeito ao estudo

de ectoparasitismo. Suas espécies são muito semelhantes entre si e suas larvas da maioria das espécies são saprófagas. Entretanto, duas espécies atuam como principais ectoparasitas *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Lucilia cuprina* e mais ocasionalmente *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758) e *Lucilia illustris* Meigen, 1826 podem ser encontradas em miíases. Todas elas são mais comumente encontradas atuando em miíase cutânea de ovelhas, embora possam infestar outros animais e até mesmo o homem. Predominantemente distribuídas pela região Palearctica e Oriental, algumas espécies tem distribuição cosmopolita como é o caso de *L. cuprina* e *L. sericata* através do movimento de ovinos domésticos (Stevens e Wall 1997).

Os ovos depositados pelas fêmeas de todas as espécies são sempre brancos e depositados próximos ou sobre cadáveres de animais. As larvas eclodem no período de 6 a 12 horas, dependendo das condições do ambiente. A larva de terceiro ínstar apresenta a placa peritremal completa e as aberturas estigmáticas convergindo para o botão espiracular (Serra-Freire e Mello 2006).

### **2.3. *Lucilia cuprina***

De distribuição cosmopolita, *L. cuprina* é uma das espécies de maior importância medica-veterinária, pois tanto na África quanto na Austrália responde pela maioria dos relatos de casos de miíase em ovinos. Além disso, é responsável pela transmissão de microrganismos patogênicos e mantém um alto grau de sinantropia, podendo ser encontrada comumente em carcaças e lixões (Gomes e Von Zuben 2004; Paes et al. 2005).

Recentemente foi reconhecida como tendo importância forense, após ter sido encontrada em associação a cadáveres humanos no nordeste da Tailândia. É uma espécie dominante durante a fase de decomposição ativa, sendo responsável por parte da remoção de carcaças (Sukontason et al. 2007; Paes et al. 2005).

Além de sua importância forense como dito anteriormente, também é responsável por causar miíases em ovinos e no homem. No Brasil seu eussinatropismo a torna possível transmissora de enteropatógenos humanos pelo fato de estarem presentes em lixo urbano, substratos de carne em decomposição, frutos caídos, néctar de flores e fezes humanas (Gomes e Von Zuben 2004).

Hall e Wall (1995) relataram *L. cuprina* como causadora de miíase cutânea primária em animais selvagens, domésticos e até mesmo em humanos.

Ausente na maior parte da Europa e de provável origem oriental ou afrotropical, presumivelmente foi introduzida na Austrália em meados do século XIX. Atualmente é a espécie dominante dentre as causadoras de miíases em ovelhas estando presente em até 99% dos casos. No norte da Nova Zelândia está se tornando a principal causa de miíase também em ovinos, assim como no Sul da África onde até o início do século XX tinha poucos relatos registrados. Apesar disso, nos EUA aparentemente não possui a mesma importância. Seu primeiro relato na Eurásia em 2010 ocorreu em uma coruja da espécie *Bubo bubo* (Linnaeus, 1758) (Stevens e Wall 1997; Pirali-Kheirabadi et al. 2010).

Seu primeiro caso relatado na América do Sul ocorreu em 2012 na Costa Rica e no Brasil sabe-se que seu desenvolvimento é possível em ovinos lanados (Quesada-Lobo et al. 2012; Paes et al. 2001).

Recentemente foram relatados casos de miíase secundária humana provocados por *L. cuprina* no Rio de Janeiro, onde três pacientes que se encaminharam ao hospital para tratar de ferimentos tiveram larvas coletadas em áreas lesionadas (Figueiredo et al. 2012). Fernandes et al. (2009) relataram casos de miíase secundária humana em Goiás, também ocasionados por *L. cuprina*.

#### **2.4. *Brevibacillus laterosporus***

*Brevibacillus laterosporus* classificado anteriormente como *Bacillus laterosporus* é uma bactéria aeróbica esporulante que se caracteriza pela capacidade de produzir uma inclusão lamelar paraesporal em forma de canoa adjacente ao esporo. Algumas cepas produzem inclusões cristalinas de várias formas e tamanhos, que liberam esporos separadamente durante a lise do esporângio (Oliveira et al. 2004).

Primeiramente isolada da água no início do século XX (Laubach, 1916), desde então esta espécie foi encontrada em outros ambientes, como em isolados a partir de abelhas mortas sugerindo que esta bactéria poderia ser um patógeno de insetos (McCray, 1917), e também em uma amostra de solo na Islândia onde foi pesquisada devido a sua habilidade de inibir a

atividade bacteriana no solo, por possuir a capacidade de manter o pH do solo alcalino, em equivalência ao uso de cal (O'Donnell, 1997).

*Brevibacillus laterosporus* demonstra toxicidade a mais de um tipo de inseto, o que torna sua utilização viável, visto que alguns insetos como *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 vêm desenvolvendo resistência a bioinseticidas (Zahner et al. 1999, Rao 1995).

Vários estudos apontam sobre a potencialidade de *B. laterosporus*. Orlova et al. (1998), demonstraram que esporos e cristais livres de *B. laterosporus* tiveram eficácia similar aos cristais de *B. thuringiensis* variedade *israelensis* contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Anopheles stephensi* Liston, 1901. Algumas estirpes tiveram atividade contra *Simulium vittatum* Zetterstedt, 1838, e esporos inibiram a eclosão e/ou desenvolvimento larval do nematodo *Trichostrongylus colubriformis* (Giles, 1892), tendo sua toxicidade observada também contra *Lasioderma serricorne* (Fabricius, 1792), o nematodo *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 e ao molusco *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) (Ruiu et al. 2007; Favret e Yousten 1985; Orlova 1998; Oliveira et al. 2004). Em 2007, Ruiu et al. mostraram a toxicidade de *B. laterosporus* sobre *M. domestica* e Duarte et al. (2009) demonstraram a possibilidade do uso desta espécie no controle integrado de *M. domestica*.

Carramaschi et al. (2009) em estudo preliminar verificaram a ação de *B. laterosporus* sobre *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818), onde algumas estirpes liofilizadas foram capazes de matar cerca de 14% dos indivíduos testados, além de causar alterações morfológicas.

Diferentemente das estirpes de *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus sphaericus* que agem sobre o inseto alvo através da liberação de proteínas no intestino dos insetos, as quais irão ligar-se aos receptores das membranas intestinais, lisando-as e provocando a morte por septicemia, não se tem conhecimento sobre o modo de ação das estirpes de *B. laterosporus* sobre os insetos. É provável que sua especificidade quanto ao inseto alvo esteja relacionada aos receptores de membrana que podem modificar-se de acordo com a espécie alvo (Charles et al. 1996, Bravo 2007).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Estabelecimento da colônia de *Lucilia cuprina*

Para a captura dos adultos primeiramente foram buscados locais onde poderia haver dípteros de importância médico-sanitário. Após a identificação desses locais, um foi escolhido para a realização da captura dos indivíduos, uma caçamba de lixo (Figura 1A e 1B) localizada na comunidade do Amorim, próximo a uma das entradas da FIOCRUZ (latitude: -22.875707, longitude: -43.250606) (Figura 1C).

Os adultos foram capturados com o auxílio de uma rede entomológica (puçá), acondicionados em tubos Falcon para o transporte até o laboratório.



Figura 1 – Local da captura de adultos de *Lucilia cuprina* para formação de colônia em laboratório. (A) e (B) caçamba utilizada para deposição de lixo. (C) localização da caçamba na comunidade do Amorim – RJ.



A criação e a manutenção dos insetos tanto da colônia estoque quanto do bioensaio seguiu o descrito por Queiroz et al (1997).

Os adultos coletados foram levados para o laboratório, triados, transferidos para gaiolas de madeira, e acondicionados em estante ventilada com temperatura regulada em 27 °C, umidade controlada em 60 ±10% e 12h de fotofase. No interior da gaiola foram colocados açúcar granulado e água para manutenção dos adultos. Como substrato de oviposição foi oferecido carne bovina putrefata.

Após a oviposição, as massas de ovos foram transferidas com auxílio de pincéis finos para recipientes (50mL) que continham 50 mg de dieta que consistia de carne bovina putrefata. Este recipiente foi colocado dentro de outro recipiente plástico com capacidade para 500 mL, contendo vermiculita que serviu como substrato para pupação. Após o abandono da dieta as larvas maduras (L3) foram colocadas em tubos de ensaio contendo vermiculita até ¼ do seu volume e tampados com tecido de náilon tipo escaline. Após a emergência, os adultos foram sexados e transferidos para as gaiolas da colônia estoque (Figura 2).



Figura 2 – Gaiola para criação de adultos de *Lucilia cuprina* contendo água e açúcar para manutenção dos insetos (colônia estoque).

### 3.2. Preparo das suspensões

Foram utilizadas 12 estirpes de *Brevibacillus laterosporus* anteriormente descritas (Zahner et al. 1999; Oliveira 2003).

A escolha das estirpes foi feita com base no trabalho de Oliveira (2003). Foram testadas as estirpes NRS 590, NRS 661, NRS 1645, NRS 1646, NRS 1648, NRS 1111, ATCC 64, Shi 4, Shi 5, Shi 2, BL 16-92, ATCC 6457, por serem aquelas que demonstraram maior toxicidade para os diferentes animais testados naquele trabalho.

As estirpes bacterianas cresceram até a fase de esporo livre em ágar-nutriente, e tiveram a fase confirmada através de observação ao microscópio óptico. Foram feitas diluições em suspensão salina a partir de raspados do estágio de esporo livre. Três diferentes diluições (suspensões) foram oferecidas aos animais (sem diluição,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ ). Cada grupo teste recebeu 3mL de suspensão por repetição.

Os testes foram realizados com as 12 estirpes de *B. laterosporus* em neolarvas de *Lucilia cuprina*.

### **3.3. Obtenção das neolarvas**

Com a colônia de *L. cuprina* já estabelecida, ou seja, constituída de indivíduos provenientes da primeira geração criada em laboratório, novamente foi oferecida uma placa de Petri contendo carne bovina putrefata como estímulo para maturação dos ovários e substrato para oviposição. Após a oviposição, essas placas foram retiradas e reservadas até a eclosão das larvas. Após a eclosão as neolarvas foram separadas em grupos (N=50), sendo transferidas para potes contendo 50mg da mesma dieta (já misturadas com 3 mL da suspensão contendo a estirpe de *Brevibacillus* que seria testada), sendo posteriormente alocada em recipientes maiores com capacidade para 500 mL contendo vermiculita e cobertos com tecido de náilon (escaline) e presos por elásticos (Figura 3). Esses recipientes foram transferidos para câmaras climatizadas reguladas a 27 °C, umidade controlada em  $60 \pm 10\%$  e 12h de fotofase. Todos os recipientes estavam etiquetados contendo o número da repetição, data, nome da espécie e do responsável.



Figura 3– Recipientes utilizados para criação dos imaturos de *Lucilia cuprina*.

### 3.4. Bioensaio

Realizaram-se três repetições com 50 neolarvas para cada diluição para assegurar a precisão dos resultados. Em cada pote de 50mL foi colocada a quantidade de 1g de dieta por neolarva, como sugerido na literatura por Queiroz et al. (1997). A criação esteve monitorada diariamente, para observações e anotações dos dados sobre a biologia e o desenvolvimento dos imaturos como tempo de duração dos ínstaes larvares, intervalo de neolarva-adulto. As larvas maduras (L3) foram pesadas após o abandono da dieta (01 espécime por vez) e colocadas individualmente em tubos de ensaio contendo vermiculita até  $\frac{1}{4}$  do seu volume e tampados com escaline (Figura 4). Os tubos de ensaio foram separados de acordo com a repetição e transferidos para câmaras climatizadas reguladas a 27 °C, umidade controlada em  $60 \pm 10\%$  e 12h de fotofase.



Figura 4 – Tubo de ensaio contendo vermiculita para pupação da larva de *Lucilia cuprina*.

Os indivíduos foram acompanhados até a emergência para a observação dos seguintes parâmetros: peso das larvas maduras, duração do período larval, pupal e da fase de neolarva a adulto, a razão sexual, possíveis alterações teratogênicas e outras características que por ventura pudessem ocorrer.

Do mesmo modo procedeu-se com os grupos controle, em um não foi feita mistura de quaisquer substâncias no substrato para que as larvas fossem criadas da maneira mais natural possível, num segundo controle houve a mistura somente de solução salina, visto que esta foi utilizada para o preparo das suspensões que foram oferecidas aos indivíduos. Dessa forma foi possível equiparar os resultados dos grupos teste com os controles garantindo a coesão de todo o experimento.

Todas as fases foram observadas e controladas diariamente. Todos os experimentos foram realizados em condições de laboratório, em câmara climatizada regulada à temperatura de  $27^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 10\%$  URA e 12 horas de fotofase.

De modo a garantir a reprodutibilidade do bioensaio, as estirpes que obtiveram melhores resultados foram novamente testadas e seu desempenho ratificado.

### **3.3. Microscopia**

Após o término dos bioensaios, e verificadas as alterações ocorridas nos indivíduos testados, dois tipos de microscopia foram empregadas para a análise das deformidades apresentadas.

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para possibilitar uma melhor visualização das alterações teratogênicas apresentadas pelos indivíduos que alcançaram o estágio adulto, assim como uma comparação com indivíduos normais do grupo controle e verificação da real extensão das deformidades observadas.

Através da microscopia óptica, foi possível observar interiormente os indivíduos do grupo teste, e compará-los com o grupo controle. O microscópio óptico utilizado foi o modelo Zeiss Axioskop 50 do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses / Setor de Entomologia Médica e Forense, do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ.

#### **3.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura**

O material destinado a essa técnica, teve seu preparo baseado na metodologia utilizada para análise morfológica de Mendonça et al. 2011. Neste caso não precisou de fixação, por isso seu preparo consistiu na colocação dos indivíduos que apresentaram deformidades e um indivíduo do grupo controle (para fins de comparação), em *stubs* com fita dupla face para fixação do material, na posição em que fosse possível obter uma melhor visualização da parte desejada (Figura 5). Após a fixação nos *stubs* e sua identificação e catalogação, o material foi levado para que fosse feita a metalização e assim fosse possível a observação ao microscópio.



Figura 5 - Insetos fixados nos *stubs* para visualização em microscópio de varredura.

### 3.3.2 Microscopia óptica

Para a visualização das larvas em microscopia óptica, os cortes histológicos foram feitos a partir de cortes semi-finos com espessura de aproximadamente  $1,5\mu\text{m}$  com os quais foram preparadas lâminas que foram observadas ao aumento de 400X.

### 3.4. Análise de dados

Os parâmetros analisados foram o peso das larvas maduras, a duração do período larval, pupal e da fase de neolarva a adulto e sua razão sexual ( $nF/nF+nM$ , onde  $nF$  representa o número de fêmeas e  $nM$  o número de machos, (Rodrigues 2004)), assim como a viabilidade dos estágios de desenvolvimento. Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA 1;  $P \leq 0,05$ )

Os testes estatísticos foram realizados com o programa de computador InStat (versão 3.05, 2000) e Microsoft Office Excel 2010.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo utilizaram-se larvas de Diptera Brachycera, da espécie *L. cuprina*, e as estirpes que mostraram melhor eficácia foram NRS 661 e NRS 1648. Oliveira et al. (2004) testaram 34 estirpes de *Brevibacillus laterosporus* em diferentes indivíduos das ordens Coleoptera, Lepdoptera e Diptera. No estudo as estirpes Shi 5 e NRS 590 foram as que se mostraram mais eficazes no controle desses indivíduos. Carramaschi et al. (2009) também utilizaram estirpes de *B. laterosporus* em testes realizados com dípteros, da espécie *Chrysomya putoria*, e a estirpe utilizada foi NRS 1111, que apresentou bons resultados sobre o grupo teste.

Ao comparar o peso das larvas que abandonaram a dieta para dar início ao processo de pupação, verificou-se que não houve alterações significativas dentre as larvas de quaisquer dos grupos testados em relação às dos grupos controles, tendo inclusive alguns indivíduos apresentado pesos superiores, demonstrando que a presença da bactéria na dieta não afetou nenhum dos parâmetros que pudesse acarretar em alterações relacionadas com o processo de alimentação desses dípteros (Tabela 1).

No que concerne aos indivíduos dos grupos teste não foram verificadas alterações discrepantes no peso, seja dentre as larvas testadas com a mesma estirpe nas diferentes diluições, ou dentre os diferentes grupos avaliados. Todos os indivíduos mantiveram uma média de peso aproximada estando inclusive na maioria dos casos com os valores incluídos dentro das possíveis variações de pesos que ocorreram (Tabela 1).

Tabela 1 - Peso (mg) de larvas maduras (L3) de *Lucilia cuprina* dos grupos controle e tratado com cepas de *Brevibacillus laterosporus* nas diferentes diluições, em laboratório.

Estirpes	Peso L3(mg)		
	Diluição		
	SD	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
	± DP (dias)	± DP (dias)	± DP (dias)
NRS 1646	32,2 ± 6,0ad	29,7 ± 9,1 abd	32,0 ± 7,9 acd
NRS 661	30,9 ± 4,5ad	32,7 ± 4,4 abcd	31,5 ± 4,1 abcd
Shi 4	29,8 ± 3,8ad	30,5 ± 3,4 abcd	32,4 ± 4,5abd
Shi 2	31,8 ± 4,3abd	31,0 ± 4,6 ad	28,4 ± 6,3 abcd
ATCC 6457	31,0 ± 4,1ad	36,1 ± 6,1 abd	35,0 ± 4,9 abcd
Shi 5	36,6 ± 4,1 abd	36,0 ± 2,7 acd	36,5 ± 3,3 ad
NRS 1111	26,4 ± 15,3 abc	27,0 ± 8,3 abcd	31,7 ± 5,0 abd
NRS 1645	29,1 ± 7,1 abd	29,8 ± 7,1 abd	32,2 ± 6,5 abd
NRS 1648	31,9 ± 4,5 abd	29,5 ± 5,5 abd	31,5 ± 5,7 abd
ATCC 64	37,8 ± 2,2 bd	36,2 ± 3,5 acd	37,7 ± 3,0 abd
NRS 590	34,1 ± 4,2 abcd	33,7 ± 4,0 abd	36,0 ± 3,9 ad
BL 16-92	33,4 ± 4,2 abcd	32,0 ± 6,5 ad	31,7 ± 3,8 acd
Ctrl P		31,3 ± 5,5 acd	
Ctrl NaCl		33,7 ± 4,3 acd	

SD = sem diluição; Ctrl P = controle puro; Ctrl NaCl = controle salina

Considerando as larvas testadas, também não existiram impossibilidades relevantes para o início do processo de pupação, visto que o peso das larvas testadas não inviabilizou que os indivíduos conseguissem atingir o estágio de pupa, mantendo os níveis dentro do esperado comparando-os com o grupo controle.



Entretanto, ao observar os valores de mortalidade das pupas (Figura 6), ou seja, aquelas que se tornaram inviáveis para terminar o processo de metamorfose e emergirem adultos, e relacionar estes valores com o peso larval (Tabela 1), verifica-se que pesos mais baixos, em especial os que ficaram no limiar de 27mg, tiveram influência no número de indivíduos que conseguiram atingir o estágio adulto, obtendo os maiores valores de mortalidade. Em contrapartida, os indivíduos que tiveram menor peso não tiveram problemas para completar seu ciclo, estando inclusive, aqueles com peso em torno de 36mg, com as menores mortalidades.

É provável que estes valores de peso larval estejam relacionados com o tempo em que os indivíduos permaneceram na dieta. Considerando apenas os indivíduos pertencentes ao grupo no qual a suspensão oferecida não possuía diluição, verificou-se que aqueles que foram mais vorazes durante a fase de larva, com exceção dos indivíduos testados com a estirpe Shi 2, permanecendo menos tempo na dieta (em torno de 4-9 dias) e atingindo os maiores valores de peso, obtiveram os menores valores para a mortalidade de pupas.

Similarmente a esses resultados, os indivíduos que se alimentaram com a dieta contendo suspensões diluídas a  $10^{-4}$ , também apresentaram melhores valores no peso larval por serem mais vorazes e ficarem menos tempo na dieta, excetuando-se os testados com a estirpe NRS 661 que apresentaram pesos maiores e permaneceram mais tempo na dieta ( $32,7 \pm 4,4$  mg; 4-13 dias).

Em contrapartida, os indivíduos testados com dieta contendo suspensões diluídas a  $10^{-5}$  obtiveram os pesos e conseqüentemente menor mortalidade de pupas quando permaneceram mais tempo na dieta, compensando com o tempo a menor voracidade, dentro deste grupo excetuaram-se aqueles pertencentes aos testados com a estirpe ATCC 6457 (4-6 dias;  $35,0 \pm 4,9$  mg).

Mukandiwa et al. (2012a) ao realizarem testes com extratos de quatro espécies de plantas para tratamento de *L. cuprina*, verificaram que o aumento na concentração dos extratos estava correlacionado com a perda de peso pela diminuição da ingestão da carne oferecida como alimento para as larvas, assim como influenciou a viabilidade dos adultos.

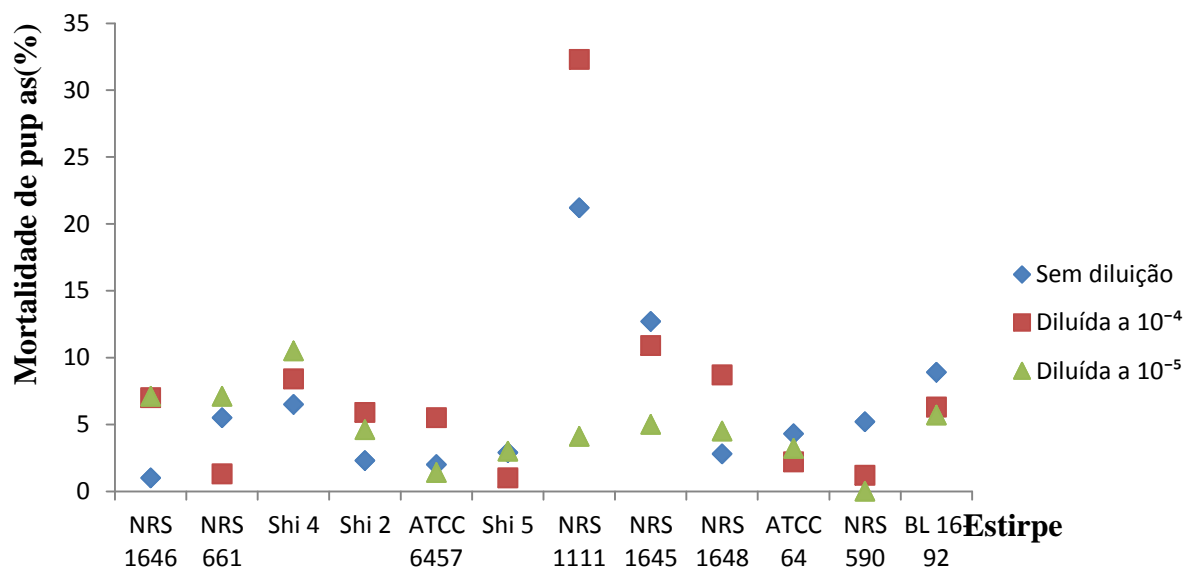


Figura 6 - Mortalidade de pupas de *Lucilia cuprina* de acordo com a suspensão de *Brevibacillus laterosporus* oferecida.

Outro fator que não sofreu alterações nos grupos analisados foi o tempo de desenvolvimento total dos insetos, que mesmo nas pequenas alterações apresentadas pelos grupos teste, estes se mantiveram nos limites possíveis dentro das variações das médias exibidas pelos grupos controle.

Dentre o grupo testado com soluções sem diluição, o menor período de duração do tempo de desenvolvimento de neolarva a adulto foi de 11 dias em média, e o maior foi de 12 dias em média (Figura 7).

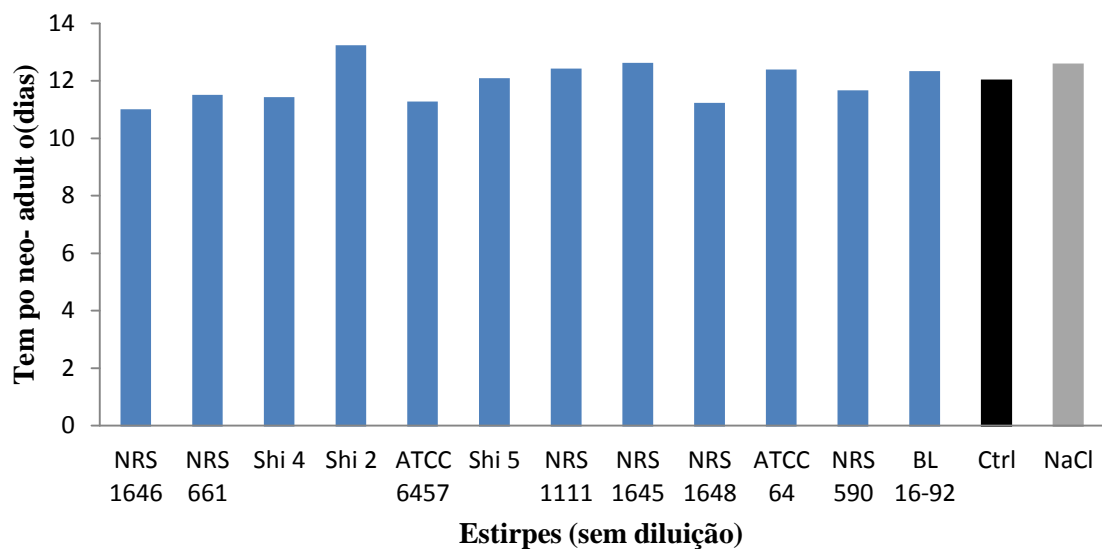


Figura 7 – Duração em média do período de neolarva a adulto (dias) de *Lucilia cuprina* tratado com suspensões não diluídas (ctrl = controle puro; NaCl = controle salina).

O grupo testado com diluição de  $10^{-4}$  foi o que esteve mais próximo dos valores mostrados nos grupos teste, tendo o seu valor mínimo de duração total de desenvolvimento com 11 dias em média e o maior valor de 13 dias em média (Figura 8).

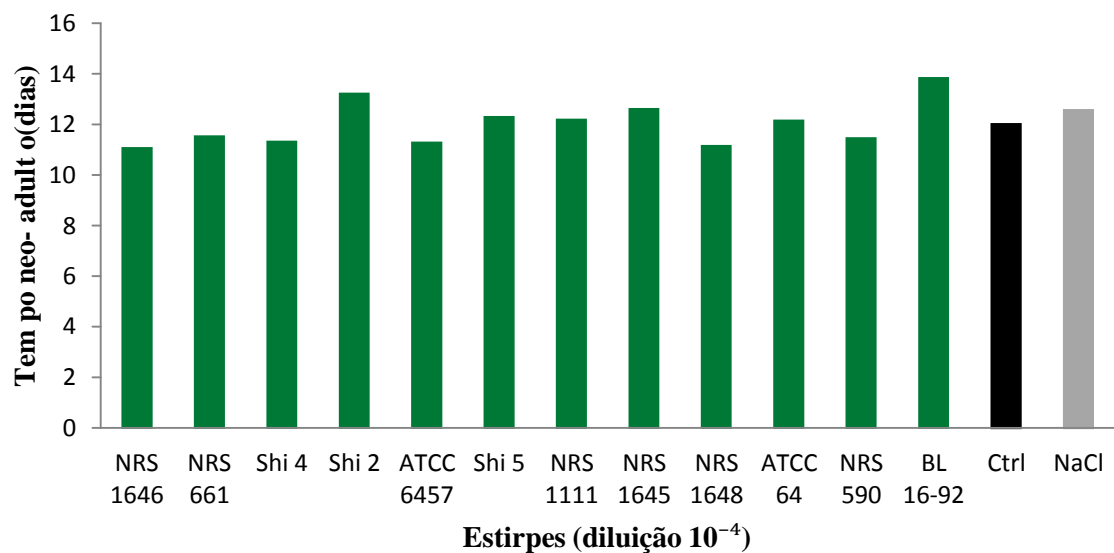


Figura 8 – Duração em média do período de neolarva a adulto (dias) de *Lucilia cuprina* tratado com suspensões diluídas a  $10^{-4}$  (ctrl = controle puro; NaCl = controle salina).

O grupo testado com diluição de  $10^{-5}$  foi o que apresentou em alguns grupos valores com maior diferença dos grupos controle, tendo o seu valor mínimo de duração total de desenvolvimento com 11 dias em média e o maior valor de 14 dias em média (Figura 9).

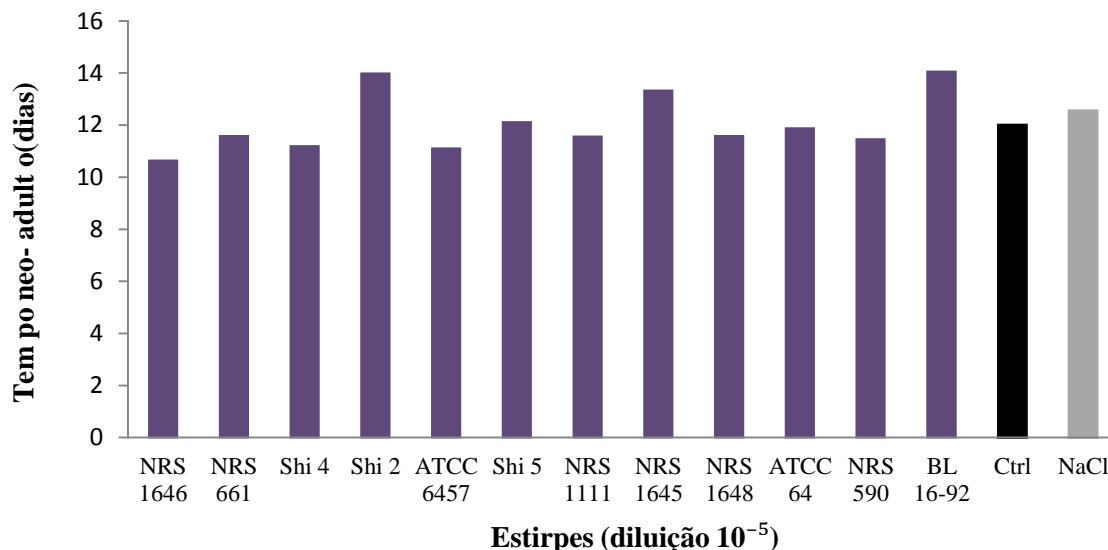


Figura 9 – Duração em média do período de neolarva a adulto (dias) de *Lucilia cuprina* tratado com suspensões diluídas a  $10^{-5}$  (ctrl = controle puro; NaCl = controle salina).

Apesar de alguns fatores não demonstrarem alterações significativas, a viabilidade dos indivíduos testados foi afetada pela aplicação das diluições na dieta. Oliveira et al. (2006) realizaram testes similares com indivíduos da espécie *Chrysomya putoria*, e encontraram resultados promissores com a cepa LFB-Fiocruz 907 de *Bacillus thuringiensis*, onde ao aplicar 326mg da bactéria na dieta obtiveram maior eficácia na mortalidade em adultos e larvas, entretanto, outros fatores podem ter influenciado na viabilidade dos indivíduos, visto que foram colocados 50 indivíduos para 25g de carne, o que pode ter afetado a alimentação, pois em geral espécies da família Calliphoridae tem sua criação feita com a proporção de um grama de carne por larva, como no estudo feito por Queiroz et al. (1997) na criação de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e por Deleito e Moya-Borja (2008) com outras espécies desta família.

Em todas as diluições testadas, resultados satisfatórios foram obtidos por pelo menos três das estirpes utilizadas.

Considerando-se somente o período larval, pode-se verificar que na maioria dos casos os valores referentes à mortalidade dos indivíduos testados foram inversamente proporcionais ao quantitativo bacteriano presente nas soluções, ou seja, os indivíduos testados com

diluições a  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  apresentaram valores maiores para a mortalidade do que os indivíduos testados com as estirpes sem diluição (Tabela 2).

Tabela 2 – Mortalidade larval dos grupos teste em relação à UFC/mL da suspensão inicial

Estirpe	UFC/mL	Mortalidade Larval (%)		
		SD	$10^{-4}$	$10^{-5}$
NRS 1646	$2,08 \times 10^6$	33,4	42,7	34
NRS 661	$3,33 \times 10^6$	50,7	46,7	52,7
Shi 4	$4,75 \times 10^6$	38	44	36
Shi 2	$7,68 \times 10^6$	42	42,7	56
ATCC 6457	$3,13 \times 10^6$	33,4	51,4	50
Shi 5	$6,36 \times 10^6$	29,4	32,7	33,4
NRS 1111	$1,09 \times 10^6$	44	36	35
NRS 1645	$1,31 \times 10^6$	32	38	32
NRS 1648	$1,29 \times 10^7$	50,7	46	70
ATCC 64	$1,3 \times 10^4$	53,4	38,7	36,7
NRS 590	$2,71 \times 10^6$	48	42	34
BL 16-92	$1,60 \times 10^6$	32	36	29,4

SD = sem diluição

Tendo em vista os adultos emergidos dos grupos tratados, não houve em geral diferenças significativas em relação à mortalidade, excetuando-se aqueles que foram testados com as estirpes NRS 1111 (sem diluição) e Shi 5 com diluição a  $10^{-4}$ . Os demais mantiveram seus valores dentro do esperado em comparação aos controles.

#### 4.1. Grupo testado com suspensões não diluídas

Observando a Tabela 3 referente ao grupo testado com estirpes não diluídas, nota-se resultados positivos referentes à mortalidade das larvas. Dentro deste grupo há quatro estirpes em destaque, pois estas alcançaram 50% de mortalidade ou estiveram bastante próximas a este valor.

A estirpe NRS 661 ( $3,33 \times 10^6$ ) apesar de não ter gerado alterações na mortalidade de pupas muito discrepante do observado nos controles, em se tratando das larvas e do período de neolarva a adulto, gerou mortalidade de 50,7% e 60,7 dos indivíduos, respectivamente. Este resultado foi idêntico ao encontrado com a estirpe NRS 1648 ( $1,29 \times 10^7$ ) que assim como a NRS 661 não mostrou grandes diferenças na mortalidade dos indivíduos no estágio de pupa. No trabalho realizado por Oliveira et al. (2004), a estirpe NRS 661 mostrou-se mais eficaz sobre coleópteros, demonstrando que o espectro de ação desta estirpe abrange mais de uma ordem.

A estirpe NRS 590 ( $2,71 \times 10^6$ ) matou 48% de indivíduos no estágio larval. Entretanto, no estágio de pupa a mortalidade dos indivíduos esteve acima do observado nos controles, obtendo 5,2% de mortalidade. No período de larva a adulto não ocorreram grandes discrepâncias. Diferentemente, Oliveira et al.(2004) em bioensaio com lagartas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 obtiveram mortalidade de 90%, 21% com larvas de *Culex quinquefasciatus*, 26% com larvas de *A. aegypti* com a estirpe NRS 590. Em *L. cuprina* foi observada mortalidade apenas quando foram oferecidas soluções não diluídas.

Dentre as quatro estirpes com melhores resultados no período larval, a estirpe ATCC 64 ( $1,3 \times 10^4$ ) apresentou 53,4% de mortalidade. Nos demais estágios, assim como as anteriormente citadas, não houve grandes diferenças na mortalidade dos indivíduos no estágio de pupa, havendo mortalidade significativa dentre os adultos. Por outro lado, Oliveira et al. (2004) mostraram que esta estirpe teve efeito sobre as ordens testadas (Diptera, Lepidoptera e Coleoptera) com pouca ou média toxicidade de acordo com o critério de avaliação usado pelos autores.

O índice de mortalidade advindo do uso da estirpe NRS 1111 ( $1,09 \times 10^6$ ) no estágio larval foi de 44%, e no pupal 21,2%. Como citado anteriormente destacou-se dentre os demais grupos teste com 62% de mortalidade no período de neolarva a adulto. Desse modo esta estirpe pode ser considerada como uma das mais eficazes neste grupo.

As demais estirpes testadas não diferiram significativamente dos valores apresentados pelos controles, assim como não houve valores diferenciados para os demais dados analisados, como média de dias e intervalo de variação em quaisquer dos estágios.

Tabela 1 - Duração (dias) e mortalidade (%) larval, pupal e de neolarva a adulto de *Lucilia cuprina* do grupo tratado com cepas de *Brevibacillus laterosporus* sem diluição em laboratório.

Estirpes	Estágio								
	Período Larval			Período Pupal			Período de Neolarva a Adulto		
	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)
NRS 1646	4,5±0,9cfg	4 – 9	33,4	6,5 ± 0,6bd	5 – 8	1	10,9 ± 0,6d	10 – 14	44
NRS 661	5,4±1,4ad	4 - 12	50,7	6,4 ± 0,7bejl	6 – 10	5,5	11,4 ± 1,0ad	10 – 16	60,7
Shi 4	5,1±1,2he	4 - 10	38	6,7 ± 0,5adefjl	6 – 8	6,5	11,3 ± 0,6dg	11 – 14	56
Shi 2	4,4±1,0cfg	3 - 8	42	8,7 ± 0,6c	7 – 10	2,3	13,2 ± 0,7e	12 – 15	46,7
ATCC 6457	4,4±0,6cg	4 – 6	33,4	6,8 ± 0,4dfg	6 – 8	2	11,2 ± 0,5dg	11 – 14	42
Shi 5	4,2±0,8c	4 - 10	29,4	8,0 ± 0,6h	7 – 9	2,9	12,0 ± 0,6fi	11 – 13	42
NRS 1111	5,6±0,8ae	4 - 9	44	6,8 ± 0,6adefg	6 – 8	21,2	12,3 ± 0,7bf	12 – 16	62
NRS 1645	5,6±1,5ae	4 - 13	32	7,4±0,7i	6 - 12	12,7	12,5±1,0 b	11 - 18	48
NRS 1648	4,6±0,5ch	4 - 6	50,7	6,5 ± 0,5bjl	6 – 8	2,8	11,1 ± 0,5dg	10 – 13	56
ATCC 64	5,0±0,9afh	4 - 8	53,4	7,2 ± 0,6gi	5 – 8	4,3	12,3 ± 1,0bf	10 – 15	56,7
NRS 590	4,9±1,2dgh	4 - 10	48	6,8 ± 0,5adj	6 – 9	5,2	11,6 ± 1,1agi	10 – 15	54
BL 16-92	6,0±1,1eb	5 - 11	32	6,3 ± 0,8bl	2 – 8	8,9	12,3 ± 1,0bf	11 – 18	41,4
Ctrl P	5,6±1,7aeh	4 - 13	16	6,9 ± 0,9ag	5 – 10	4,8	12,0 ± 1,5af	10 – 16	35,4
Ctrl NaCl	6,3±1,1b	5 - 12	38,7	6,3 ± 0,5b	6 – 8	2,2	12,5 ± 1,2b	11 – 18	41,4

± DP= Média e Desvio Padrão; Ctrl P = controle puro; Ctrl NaCl = controle salina

## 4.2. Grupo testado com suspensões diluídas a $10^{-4}$

A Tabela 4 apresenta os valores obtidos pelas estirpes diluídas a  $10^{-4}$ . Dentre essas novamente destacaram-se as estirpes NRS 661  $3,33 \times 10^6$  e NRS 1648  $1,29 \times 10^7$ , além da ATCC 64573,  $13 \times 10^6$  quando considerado o período larval. Novamente os valores da mortalidade estiveram próximos aos 50%, sendo 46,7, 46,0 e 51,4% respectivamente.

A estirpe NRS 661 em semelhança ao ocorrido quando no tratamento sem diluição, apesar de ter alcançado valores positivos para a mortalidade das larvas e dos adultos, quando se observa os dados referentes ao estágio de pupa não se nota diferenças significativas dos controles, tendo esta estirpe apresentado uma mortalidade de apenas 1,3% no estágio pupal dos indivíduos e 54% no período de neolarva a adulto.

Apesar de a mortalidade das larvas testadas com a estirpe NRS 1648 ter sido um pouco menor que a anterior, no estágio pupal a mortalidade foi de 8,7% e no período de larva a adulto a mortalidade foi de 60%. Dessa maneira os valores ficaram acima do encontrado nos controles.

A terceira estirpe a destacar-se pelos resultados do período larval foi a ATCC 6457, a qual apresentou a melhor mortalidade neste estágio dentre as demais estirpes testadas. Além dos 51,4% de mortalidade no período larval, nos outros estágios a mortalidade esteve acima da mortalidade dos controles, tendo 5,5% de mortes no estágio pupal e 63,4% no período de larva a adulto. Oliveira et al. (2004) ao testarem a toxicidade desta estirpe tiveram resultados sobre *Aedes aegypti* com baixa toxicidade, *A. gemmatilis* com alta toxicidade, *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 com média toxicidade, além de surtir efeito sobre a mortalidade de *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 nos primeiros dias de vida.

Mais uma vez, apesar de não ter mostrado valor expressivo na mortalidade das larvas, a estirpe NRS 1111 destacou-se pelos dados obtidos nos estágios pupal e neolarva a adulto. No estágio pupal os indivíduos testados com esta estirpe tiveram 32,3% de mortalidade, estando muito acima dos controles, cerca de 14 vezes maior que o controle com suspensão salina, e quase 7 vezes maior que o controle puro. No período de neolarva a adulto apresentou a melhor mortalidade dentre todos os outros testes realizados, tendo 68,7% de mortalidade. Carramaschi et al (2009) testaram esta estirpe sobre larvas de *Chrysomya putoria* alcançando somente 13,4% de mortalidade com a estirpe liofilizada, cerca da metade da mortalidade alcançada neste bioensaio. Oliveira et al (2004) utilizando biomassa desta estirpe confirmaram o efeito sobre *B. glabrata* verificando a mortalidade de indivíduos em duas épocas pós eclosão. Portanto a eficácia desta estirpe pode estar relacionada



ao modo como foi oferecida aos indivíduos testados, visto que, quando a estirpe foi oferecida em soluções ou biomassa a mortalidade apresentou melhores resultados em relação à liofilizada.

As demais estirpes testadas apesar de não apresentarem valores de mortalidade abaixo de 30% no estágio larval, não diferiram significativamente dos controles, visto que o controle com suspensão salina teve 38,7% de mortos neste estágio.

No estágio pupal dos indivíduos testados, algumas estirpes tiveram mortalidade em torno de 10%, estando bem acima dos valores dos controles. Entretanto no período de larva a adulto não houve grandes diferenças entre os testes e os controles.

Assim como no grupo teste com soluções não diluídas, os valores da duração dos estágios dos indivíduos não foram distintos do ocorrido nos controles.

Tabela 2 - Duração (dias) e mortalidade (%) larval, pupal e de neolarva a adulto de *Lucilia cuprina* do grupo tratado com cepas de *Brevibacillus laterosporus* com diluição de  $10^{-4}$ , em laboratório.

Estirpes	Estágio								
	Período Larval			Período Pupal			Período de Neolarva a Adulto		
	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)
NRS 1646	4,6 ± 1,1ce	4 - 9	42,7	6,5 ± 0,5ab	6 - 8	7	11 ± 0,9cf	10 - 16	54,7
NRS 661	5,5 ± 1,7 a	4 - 13	46,7	6,4 ± 0,5be	5 - 8	1,3	11,5 ± 0,9ac	10 - 15	54
Shi 4	4,9 ± 1,3ac	4 - 10	44	6,6 ± 0,5abf	6 - 8	8,4	11,3 ± 0,6cf	11 - 14	56,7
Shi 2	4,3 ± 1,0c	3 - 8	42,7	8,7 ± 0,8c	6 - 10	5,9	13,2 ± 0,7d	12 - 15	46
ATCC 6457	4,4 ± 0,6cf	4 - 8	51,4	6,9 ± 0,4h	6 - 9	5,5	11,2 ± 0,5cf	11 - 14	63,4
Shi 5	4,2 ± 0,7c	4 - 7	32,7	7,9 ± 0,7g	7 - 10	1	12,2 ± 0,8be	11 - 14	38,7
NRS 1111	5,5 ± 0,8agj	5 - 9	36	7,0 ± 1,0fhi	6 - 12	32,3	12,1 ± 0,7ab	11 - 16	68,7
NRS 1645	5,7 ± 2,4ba	4 - 17	38	8,6 ± 0,9c	7 - 11	10,9	12,5 ± 0,7b	12 - 15	52
NRS 1648	5,2 ± 1,1aef	4 - 13	46	6,3 ± 0,6b	5 - 8	8,7	11,1 ± 1,4cf	10 - 13	60
ATCC 64	5,0 ± 0,9ae	4 - 9	38,7	7,1 ± 0,5hj	6 - 9	2,2	12,1 ± 1,1be	10 - 16	41,4
NRS 590	4,7 ± 0,8eij	4 - 9	42	6,8 ± 0,5aeij	6 - 8	1,2	11,4 ± 0,8f	10 - 14	48
BL 16-92	6,6±2,3i	4 - 15	36	7,8±0,8g	6 - 12	6,3	13,7±1,8g	12 - 20	45,4
Ctrl P	5,6±1,7 a	4 - 13	16	6,9 ± 0,9adh	5 - 10	4,8	12,0 ± 1,5ae	10 - 16	35,4
Ctrl NaCl	6,3± 1,1bi	5 - 12	38,7	6,3 ± 0,5b	6 - 8	2,2	12,5 ± 1,2b	11 - 18	41,4

± DP= Média e Desvio Padrão; Ctrl P = controle puro; Ctrl NaCl = controle salina

### 4.3. Grupo testado com suspensões diluídas a $10^{-5}$

A Tabela 5, referente ao grupo dos indivíduos testados com soluções diluídas a  $10^{-5}$  também apresentou bons resultados na mortalidade dos indivíduos, inclusive tendo o melhor valor dentre todos os outros testes e mais uma vez as estirpes NRS 661 e NRS 1648 estão entre as mais eficazes.

A estirpe NRS 661 obteve o melhor valor para a mortalidade dos indivíduos no estágio larval dentre as soluções demonstradas até então, com 52,7% de larvas mortas. Porém assim como ocorreu com as outras soluções, o valor da mortalidade no estágio pupal não foi muito diferente dos controles, apesar de ter sido superior aos das outras diluições, sendo 7,1% e no período de neolarva a adulto mais uma vez apresentou diferença significativa dos controles com 62,7% de mortalidade.

Assim como a estirpe anterior, a estirpe Shi 2 teve melhor mortalidade larval com a suspensão mais diluída. Neste estágio a mortalidade larval foi de 56%, no estágio pupal dos indivíduos testados a mortalidade esteve dentro dos limites vistos nos controles, e no período de neolarva a adulto com 67,4% de mortalidade ficou um pouco acima dos controles. Oliveira et al. (2004) utilizando esta estirpe verificaram que a mesma possui toxicidade sobre *C. quinquefasciatus*, *A. gemmatalis*, *A. grandis* e *B. glabrata*.

Pela segunda vez a estirpe ATCC 6457 esteve dentre as que tiveram melhores resultados na mortalidade larval com 50% dos indivíduos mortos. Nos demais estágios, assim como nas soluções anteriores, o valor da mortalidade para pupas não diferiu do apresentado pelos controles, sendo 1,4% e os adultos apresentaram 56% de mortalidade, estando novamente com valores significativamente acima dos controles.

Já a estirpe NRS 1648 nesta diluição ( $10^{-5}$ ) apresentou o melhor valor para a mortalidade larval (70%). Sendo a mais eficaz das estirpes testadas, e assim como as estirpes NRS 661 e Shi 2 teve a maior mortalidade com a suspensão mais diluída. No estágio pupal a mortalidade dos indivíduos não diferiu dos controles tendo 4,5% de mortalidade, e no período de neolarva a adulto ficou muito acima com 77,4% de indivíduos mortos, reflexo da alta mortalidade larval.

As demais estirpes testadas não mostraram valores acima de 40% na mortalidade larval. No estágio pupal apenas a estirpe Shi 4 atingiu 10% de mortalidade e outras quatro estirpes tiveram menos indivíduos viáveis que os controles, com valores entre 5 (estirpe NRS 1645) e 7,1% (estirpes NRS 1646 e NRS 661). No período de neolarva a apenas duas estirpes não ficaram com valores acima dos controles, variando de 39,4% (estirpe BL 16-92) a 77,4% (estirpe NRS 1648).

A estirpe Shi 4 no estudo de Oliveira et al. (2004) apresentou alta toxicidade sobre *A. grandis*, já a toxicidade da estirpe NRS 1645 em todas as ordens testadas atingiu no máximo níveis

médios também sobre *A. grandis*. Destas, somente a estirpe NRS 1646 teve toxicidade alta dentre os indivíduos testados e novamente sobre *A. grandis*.

Diferentemente do que aconteceu nas outras diluições, houve algumas alterações na duração dos estágios. No período larval apesar de o mínimo estar dentro do que foi visto nos controles, o máximo de dias que durou este estágio esteve até 3 dias acima do mostrado nos controles.

No estágio pupal a média da duração deste período esteve em torno de um dia acima do visto nos controles para a estirpe Shi 5 e o valor mínimo de duração apresentou até 2 dias acima dos valores mínimos dos controles.

No período total do desenvolvimento, três estirpes apresentaram médias da duração em dias acima dos controles, tendo até 2 dias em média acima na estirpe BL 16-92. Nesta mesma estirpe houve indivíduos com até 22 dias de valor máximo de duração do período, quatro dias acima do alcançado pelo controle com suspensão salina.

Deleito e Moya-Borja (2008) utilizando diferentes concentrações de óleo de Nim, encontraram valores para a mortalidade de pupas superiores a 30% em *L. cuprina*. Resultados semelhantes foram corroborados por Mognato (2000), onde o prolongamento do período pupal e mesmo a supressão da capacidade de emergência são influenciados pelos componentes desta planta. Do mesmo modo como ocorreu neste trabalho onde ao oferecer *B. laterosporus* para *L. cuprina* vários indivíduos não foram capazes de sair da pupa e completar seu desenvolvimento.

Tabela 3 - Duração (dias) e mortalidade (%) larval, pupal e de neolarva a adulto de *Lucilia cuprina* do grupo tratado com cepas de *Brevibacillus laterosporus* com diluição de  $10^{-5}$ , em laboratório.

Estirpes	Estágio								
	Período Larval			Período Pupal			Período de Neolarva a Adulto		
	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)	Duração ± DP (dias)	Intervalo de Variação (dias)	Mortalidade (%)
NRS 1646	4,7 ± 1,5bei	4 - 11	34	6,3 ± 0,6b	5 - 8	7,1	10,6 ± 0,5b	10 - 12	52
NRS 661	5,9 ± 2,3cd	5 - 16	52,7	6,3 ± 0,6b	5 - 8	7,1	11,5 ± 1,0cdf	10 - 16	62,7
Shi 4	5,0 ± 1,2ce	4 - 10	36	6,5 ± 0,6bd	5 - 8	10,5	11,1 ± 1,3dgh	11 - 14	50
Shi 2	6,9 ± 2,1fh	5 - 15	56	7,7 ± 0,7c	7 - 11	4,6	13,9 ± 0,7el	13 - 18	67,4
ATCC 6457	4,3 ± 0,5e	4 - 6	50	6,8 ± 0,3ade	6 - 7	1,4	11,1 ± 0,3bdi	11 - 13	56
Shi 5	4,5 ± 1,4ej	4 - 12	33,4	8,0 ± 0,7c	7 - 10	3	12,1 ± 0,9afj	11 - 16	46
NRS 1111	5,0 ± 0,7gel	4 - 9	35	6,5 ± 0,6bef	6 - 8	4,1	11,5 ± 0,9cgij	11 - 17	42,7
NRS 1645	5,7 ± 1,5clm	4 - 15	32	7,7 ± 0,7 c	7 - 10	5	13,3 ± 1,6e	11 - 19	40,7
NRS 1648	5,6 ± 1,6 cdiln	5 - 13	70	6,2 ± 0,6 b	5 - 8	4,5	11,7 ± 1,0chij	10 - 15	77,4
ATCC 64	4,8 ± 0,9eno	4 - 9	36,7	7,0 ± 0,6 <sup>a</sup>	6 - 9	3,2	11,8 ± 1,2chj	10 - 16	41,4
NRS 590	5,2 ± 1,9cijlo	4 - 13	34	6,8 ± 0,6adf	6 - 10	0	11,4 ± 1,0chi	10 - 14	42,7
BL 16-92	6,5±1,9dh	5 - 16	29,4	7,7±0,7c	6 - 10	5,7	14,0±1,7i	12 - 22	39,4
Ctrl P	5,6±1,7acg	4 - 13	16	6,9 ± 0,9 a	5 - 10	4,8	12,0 ± 1,5ac	10 - 16	35,4
Ctrl NaCl	6,3± 1,1adfm	5 - 12	38,7	6,3 ± 0,5b	6 - 8	2,2	12,5 ± 1,2 a	11 - 18	41,4

± DP= Média e Desvio Padrão; Ctrl P = controle puro; Ctrl NaCl = controle salina

Como dito anteriormente, os valores para a mortalidade larval aumentaram conforme a quantidade de bactérias presentes nas soluções diminuiu (estirpes NRS 661, Shi 2, ATCC 6457, Shi 5, NRS 1648). Em alguns casos, até mesmo a mortalidade dos adultos teve essa relação (NRS 1646, Shi 2, NRS 590). Estirpes que aparentemente não possuíam ação sobre os indivíduos testados mostraram-se eficazes em maiores diluições. Pires et al. (2007) em testes com comunidades bacterianas observaram que ocorrem mudanças significativas na estrutura da comunidade com o aumento da densidade, e que os maiores valores são encontrados em comunidades diluídas  $10^5$  vezes, pois as diluições intermediárias relaxam a competição e potencializam o crescimento bacteriano pela maior eficiência na absorção de recursos. Este fato pode ser a razão pela qual a suspensão mais diluída apresentou os melhores resultados.

As estirpes que se mostraram mais eficazes foram a NRS 661  $3,33 \times 10^6$  e a NRS 1648, pois foram as únicas que obtiveram efeito sobre os indivíduos testados em todas as suspensões oferecidas. A estirpe NRS 1648 ocasionou mortalidade larval de 70% quando em sua menor densidade bacteriana na diluição  $10^{-5}$ , corroborando com os resultados de Pires et al. (2007) no que diz respeito a competição intraespecífica ter menor influência em menores densidades ou em diluições intermediárias. Em relação à estirpe NRS 1648 uma das razões de sua alta mortalidade poderia ser a sua maior concentração celular inicial ( $1,29 \times 10^7$  UFC/ml), entretanto a estirpe NRS 661 que também teve alta mortalidade apresenta somente  $3,33 \times 10^6$  UFC/ml. A concentração inicial da estirpe ATCC64 era de somente  $1,3 \times 10^4$  e a mortalidade de larvas encontrada foi de 38,7%. Presume-se que em concentrações celulares iniciais mais altas, valores de mortalidade larval poderiam ser também mais altos. Estudos futuros deverão ser realizados a fim de se esclarecer esses achados.

Oliveira et al. (2004), tiveram resultados positivos com a NRS661 sobre as ordens Diptera (Sub-Ordem Nematocera), Lepidoptera e Coleoptera, sendo os resultados menos eficazes sobre dípteros, e com a NRS 1648 só tiveram resultados positivos com duas das três ordens testadas, sendo esta uma das estirpes menos eficazes dentre as utilizadas.

Leemon e Jonsson (2012) em bioensaio para avaliar o potencial de *Metarhizium anisopliae* Sorokin, 1883 como biopesticida sobre *L. cuprina*, apresentaram altas taxas de mortalidade ao aplicarem preparações conidiais topicamente em adultos e ao misturarem essas preparações ao açúcar oferecido aos indivíduos. Deste modo obtiveram uma sobrevida de 4 dias para os indivíduos que receberam as aplicações tópicas e uma morte rápida após um curto período (menos de 10 dias) independentemente da dose aplicada, dentre os indivíduos que alimentaram-se dos conídios misturados ao açúcar. Begum et al. (2012) também tiveram alta mortalidade ao oferecerem uma suspensão para os adultos contendo glutamato

monossódico, além de observarem alterações nos túbulos de Malpighi dos indivíduos testados.

#### 4.4. Efeitos subletais

Outro fator que pode ser observado neste bioensaio foi a razão sexual dos indivíduos testados. Segundo Brito (2009), quando populações são analisadas com o objetivo de verificar a possibilidade de sobrevivência dos indivíduos seja envolvendo questões de manejo voltadas para recuperação e evitando a extinção, ou como é o caso deste estudo onde se busca a possibilidade de conter o avanço de determinada espécie e controlar seus limites populacionais, um dos fatores que devem ser observados é a razão sexual.

Espera-se que os indivíduos de determinada espécie mantenham a proporção de machos e fêmeas em torno de 1:1 de modo que não haja diferenças significativas, podendo ocasionar um desequilíbrio futuro como exemplificado no princípio de Fisher para espécies evolutivamente estáveis (Fisher, 1930). Alguns grupos testes deste estudo tiveram muito provavelmente consequências relacionadas à ingestão das estirpes de *B. laterosporus* sobre a razão sexual dos indivíduos, e o que provavelmente deveria ficar em torno de 0,5 como ocorreu nos grupos controle, que apresentou variações de 0,3 a 0,6 em sua razão sexual (Tabela 6), o que segundo Brito (2009), tais desvios que poderiam causar a extinção em populações pequenas, possivelmente ao interagir como outros fatores levariam a uma depressão no crescimento populacional em se tratando de grandes populações.

No caso de o grupo testado apresentar uma razão sexual inferior a 0,5, há uma indicação de que o número de machos é superior ao número de fêmeas. Assim, quando o número de machos for inferior ao número de fêmeas a razão sexual terá valor acima de 0,5. Essas alterações possuem implicações distintas, pois quando o número de fêmeas for maior que o de machos, apesar da possibilidade de haver uma maior prole nas gerações futuras, acarretará em um maior desgaste energético sobre os machos e existem as possibilidades de que nem todas as fêmeas sejam fecundadas, além de diminuir a variabilidade genética no futuro. Inversamente a este fato, quando a quantidade de machos for maior do que a de fêmeas nem todos os machos conseguirão fecundar uma fêmea, e provavelmente devido ao baixo número destas, o quantitativo da prole nas gerações futuras será menor.

Ao observar a Tabela 6, verifica-se que na maioria dos casos a variação na razão sexual apresentou valores abaixo de 0,5, tendo somente três dos grupos testados com diluições a  $10^{-4}$  mostrado a razão sexual com valores equivalentes de machos e fêmeas.

Dentre as estirpes testadas a NRS 661 apresentou em todos os testes a razão sexual inferior ao controle. Khater et al. (2011) em testes para controle de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), ao aplicarem óleos de *Lactuca sativa* Linnaeus, 1753, *Matricaria chamomilla* Linnaeus, 1753, *Pimpinella anisum* Linnaeus 1753 e *Rosmarinus officinalis* Linnaeus, 1753 sobre larvas de terceiro ínstar, obtiveram como resultado subletal uma mudança na razão sexual do grupo teste, e assim como nestes bioensaios houve predominância de machos sobre fêmeas atingindo a proporção de 4:1, além de interferirem na viabilidade dos adultos e determinarem a formação de algumas anomalias.

Dentre todos os grupos testados as estirpes NRS 1646, NRS 1111 e ATCC 64 foram as que se destacaram ao apresentarem em todas as diluições valores diferentes aos apresentados pelos grupos controle que estabeleceram valores normais para a razão sexual.

Tabela 4 – Razão sexual dos indivíduos de *Lucilia cuprina* testados com diluições de *Brevibacillus laterosporus* e sua comparação aos grupos controle, em laboratório.

Estirpes	Razão Sexual		
	Diluição		
	SD	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
NRS 1646	0,4	0,4	0,5
NRS 661	0,3	0,4	0,3
Shi 4	0,4	0,3	0,5
Shi 2	0,5	0,5	0,4
ATCC 6457	0,5	0,5	0,4
Shi 5	0,5	0,5	0,6
NRS 1111	0,6	0,4	0,5
NRS 1645	0,3	0,4	0,5
NRS 1648	0,4	0,3	0,6
ATCC 64	0,6	0,3	0,3
NRS 590	0,4	0,4	0,5
BL 16-92	0,4	0,5	0,4
Ctrl P		0,5	
Ctrl NaCl		0,5	

SD = sem diluição; Ctrl P = controle puro; Ctrl NaCl = controle salina



Tendo em vista o desenvolvimento completo dos indivíduos, foram observados efeitos teratogênicos, deformidades ou empecilhos que impossibilitaram algumas moscas de terminarem sua formação (Tabela 7). Alguns não foram considerados como tendo alcançado a fase de adulto por não terem conseguido sair totalmente do pupário (Figura 10A e 10B). Esta foi a “deformidade” mais abundante tendo ocorrido até mesmo no controle puro, porém em menor quantidade. Nenhuma outra deformidade foi encontrada em quaisquer dos controles. Mukandiwa et al. (2012b) também encontraram deformidades em indivíduos da espécie *L. cuprina* e *Chrysomya marginalis* (Wiedemann, 1830) ao oferecerem carne tratada com extratos de plantas para as larvas, acarretando em má formações nas pupas, algumas paralisias e redução da emergência dos adultos, sugerindo que os componentes dos extratos poderiam ter interferência nos mecanismos de controle neuroendócrino desses dípteros.

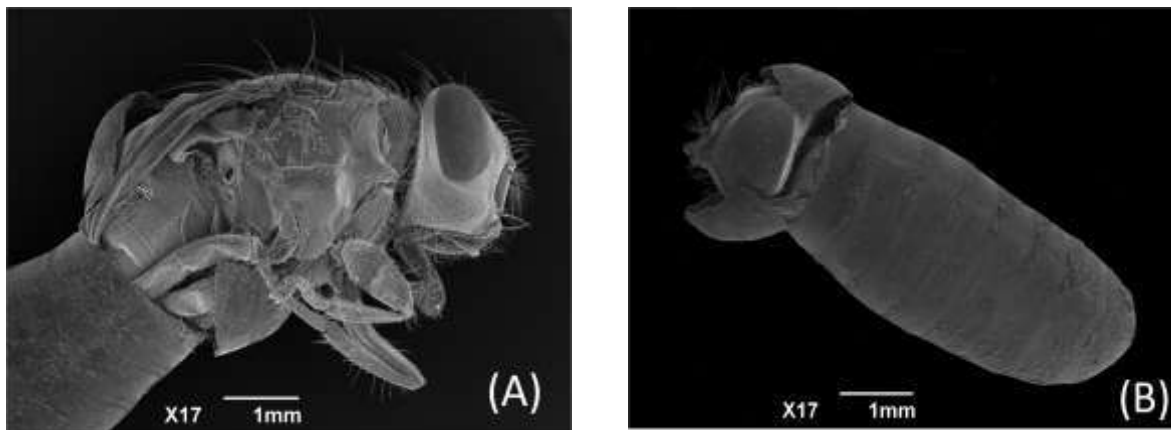


Figura 10– Micrografia mostrando indivíduos tratados com *Brevibacillus laterosporus* incapazes de sair do pupário. (A) adulto de *Lucilia cuprina* com parte do corpo exteriorizado do pupário. (B) indivíduo incapaz de ir além da abertura da pupa.

Com exceção da estirpe BL16-92 todas as outras estirpes testadas tiveram indivíduos que apresentaram algum tipo de deformidade, do mesmo modo todas possuíram indivíduos que não conseguiram sair do pupário (Tabela 7).

Com exceção das estirpes Shi 2, NRS 1111 e NRS 1645 foram encontrados indivíduos no grupo teste que, apesar de apresentarem o corpo com a morfologia inalterada, não foram capazes de inflar suas asas (Figura 11). Entretanto, Carramaschi et al. (2009) com a estirpe NRS 1111 liofilizada obteve indivíduos com deformidades nas asas.

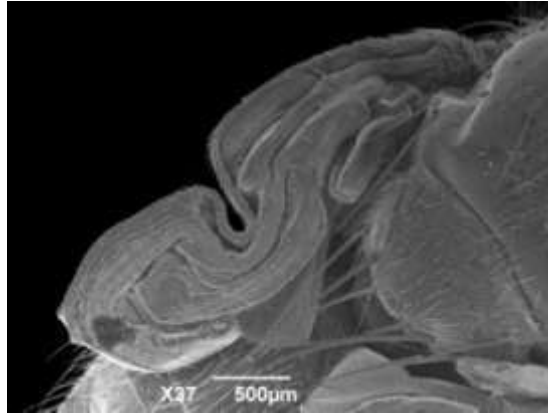


Figura 11– Asa deformada de *Lucilia cuprina* tratada com *Brevibacillus laterosporus*.

É possível que a ingestão das bactérias pelas larvas e a presença destes microrganismos no interior do intestino dos insetos tenha dificultado a absorção de alguns nutrientes, acarretando na impossibilidade destes quando adultos terminarem por completo seu desenvolvimento e inflarem suas asas. Sendo assim, esses indivíduos seriam incapazes de alçar voo e, por conseguinte, encontrar um parceiro para a reprodução.

Giolo et al. (2006) ao testarem dietas para criação de insetos perceberam que os indivíduos que tinham uma dieta deficiente – em geral com falta de ácidos graxos em seu período larval – poderiam originar adultos com asas deformadas. Cardoso et al. (2011) observando o mesentero de insetos tratados com Nim, verificaram que aqueles indivíduos que apresentaram alterações no intestino e não conseguiram absorver os nutrientes necessários, tiveram deformidades quando adultos, além de dificuldade no processo de muda gerado pela redução na atividade alimentar. É possível que as estirpes de *B. laterosporus* testadas tenham causado lesões no intestino dos insetos, acarretando em disfunções deste órgão e provocando a redução na absorção dos nutrientes, do mesmo modo como ocorre com dípteros que sofrem a ação das toxinas de *B. sphaericus* e *B. thuringiensis* que lesionam o intestino médio dos insetos alvo (Drobniewski 1994, Poopathi et al. 2008, Poopathi e Tyag 2005)

Observando a ocorrência de indivíduos que se mostraram impossibilitados de inflar o seu corpo como um todo, vê-se que foi uma deformidade frequente entre os grupos teste (Tabela 7).

Excetuando-se os insetos testados com as estirpes NRS 1646, ATCC 6457, NRS1645 e NRS 590, todos os outros testados apresentaram em algumas de suas diluições, indivíduos com o corpo totalmente disforme (Figura 12). Deleito e Moya-Borja (2008) ao aplicar óleo de Nim sobre pupas de *L. cuprina* também encontraram indivíduos com o corpo disforme, além de não conseguirem expandir suas asas, efeito subletal atribuído ao efeito dos compostos do

óleo sobre o *corpus cardiacus* do inseto, responsável pela secreção de hormônios que podem influenciar em uma metamorfose bem sucedida.



Figura 12 – Micrografia de adulto de *Lucilia cuprina* tratado com estirpes de *Brevibacillus laterosporus* com corpo deformado achatado dorso-ventralmente e não inflado.

Apesar da pouca ocorrência, outra deformidade foi observada: alguns indivíduos tratados com a estirpe NRS 661 e ATCC 6457 não foram capazes de retrainir o saco ptilineal após saírem do pupário ficando esta estrutura sobre parte das antenas do inseto (Figura 13).

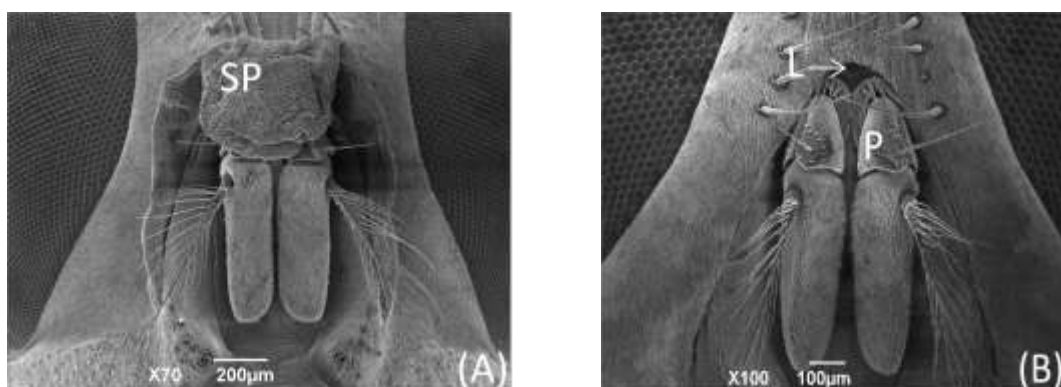


Figura 13 – Micrografia evidenciando a região da inserção das antenas em indivíduos da espécie *Lucilia cuprina* tratados com estirpes de *Brevibacillus laterosporus*. (A) tratado - saco ptilineal não retraído cobrindo a lúnula e o pedicelo, (B) não tratado - região em estado normal, SP – saco ptilineal, L – lúnula, P - pedicelo.

Dentre as estirpes testadas, a NRS 661 e a NRS 1648 tiveram maior destaque dentre as que ocasionaram deformidades. A primeira apesar de não ter obtido muita frequência foi a única estirpe a apresentar todos os tipos de deformidades encontradas. A segunda destacou-se por ter em praticamente todas as diluições oferecidas, com exceção apenas da diluição  $10^{-4}$ , apresentado no mínimo dois tipos de deformidades, fato repetido somente pelos indivíduos tratados com a estirpe Shi 4, porém com menor intensidade.

Tabela 5 - Deformidades apresentadas por *Lucilia cuprina* nos grupos teste e controle de acordo com a diluição oferecida contendo estirpes de *Brevibacillus laterosporus*.

Estirpes	Dose	Deformidade			
		Asa	Não inflado	Preso na pupa	Ptilíneo não retraído
NRS 1646	SD	X		X	
	10 <sup>-4</sup>	X		X	
	10 <sup>-5</sup>				
NRS 661	SD	X		X	X
	10 <sup>-4</sup>		X		
	10 <sup>-5</sup>				
Shi 4	SD	X	X	X	
	10 <sup>-4</sup>	X		X	
	10 <sup>-5</sup>	X		X	
Shi 2	SD		X		
	10 <sup>-4</sup>		X	X	
	10 <sup>-5</sup>			X	
ATCC 6457	SD	X		X	
	10 <sup>-4</sup>	X		X	X
	10 <sup>-5</sup>	X		X	
Shi 5	SD		X	X	
	10 <sup>-4</sup>				
	10 <sup>-5</sup>	X		X	
NRS 1111	SD				
	10 <sup>-4</sup>		X	X	
	10 <sup>-5</sup>		X	X	
NRS 1645	SD				
	10 <sup>-4</sup>			X	
	10 <sup>-5</sup>			X	
NRS 1648	SD	X	X	X	
	10 <sup>-4</sup>		X	X	
	10 <sup>-5</sup>	X	X	X	
ATCC 64	SD		X	X	
	10 <sup>-4</sup>			X	
	10 <sup>-5</sup>			X	
NRS 590	SD	X		X	
	10 <sup>-4</sup>			X	
	10 <sup>-5</sup>				
BL 16-92	SD				
	10 <sup>-4</sup>				
	10 <sup>-5</sup>				
Ctrl P				X	
Ctrl NaCl					

SD = sem diluição; Ctrl P = controle puro; Ctrl NaCl = controle salina

É possível que além das alterações teratogênicas externas acometidas pelos indivíduos testados, interiormente esses possam ter sofrido alterações geradas pela ingestão das estirpes bacterianas. Na figura 14A, pode-se observar o corpo gorduroso de uma larva de terceiro ínstar do grupo controle em comparação a uma pertencente ao grupo testado com a estirpe NRS 661 (Figura 14B), onde se percebe que enquanto no grupo controle puro o corpo gorduroso mantém sua estrutura normal, no indivíduo testado o corpo gorduroso apresenta suas células disformes.

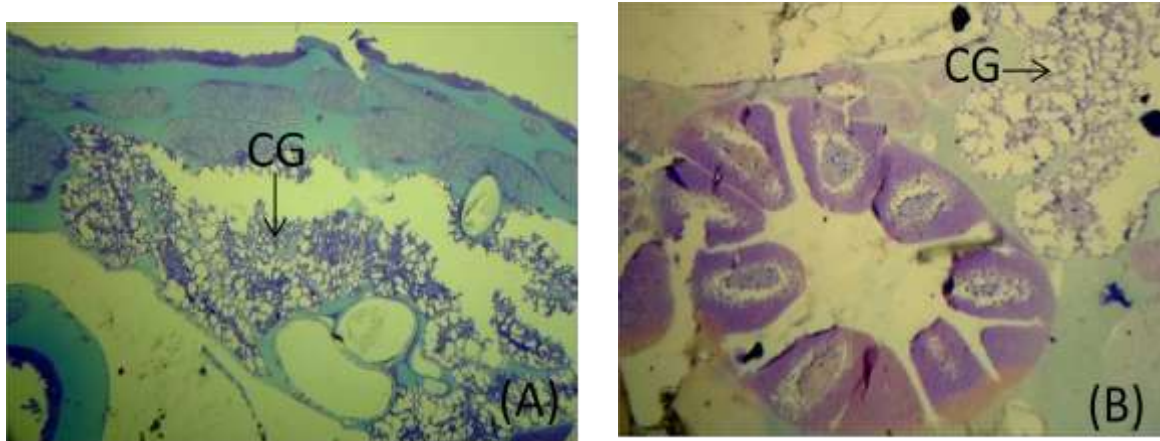


Figura 14 – Corte histológico evidenciando o corpo gorduroso em uma seção do segmento abdominal de larvas de terceiro ínstar de *Lucilia cuprina*. (A) controle, (B) tratado com *Brevibacillus laterosporus*, CG – corpo gorduroso.

Não somente o corpo gorduroso das larvas tratadas pode ter sido afetado pela ação das bactérias, também a epicutícula pode ter sofrido alterações. Ao comparar esta estrutura em larvas de terceiro ínstar pertencentes ao grupo controle puro com as larvas do grupo teste, nota-se que enquanto a epicutícula do indivíduo do grupo controle não aparenta ter alterações, a do grupo teste mostra-se descontínua (Figura 15).

Turnbull et al. (1980) testando os efeitos da DOPA decarboxilase e Binnington (1985) os efeitos dos compostos inseticidas Polioxina D, Diflubenzuron-a Ciromazina, Aminopterina, sobre larvas de *L. cuprina* também encontraram alterações na formação da cutícula ocasionando sua descontinuidade, tornando-a mais fina e distorcida em algumas camadas, além da presença de partes necrosadas.

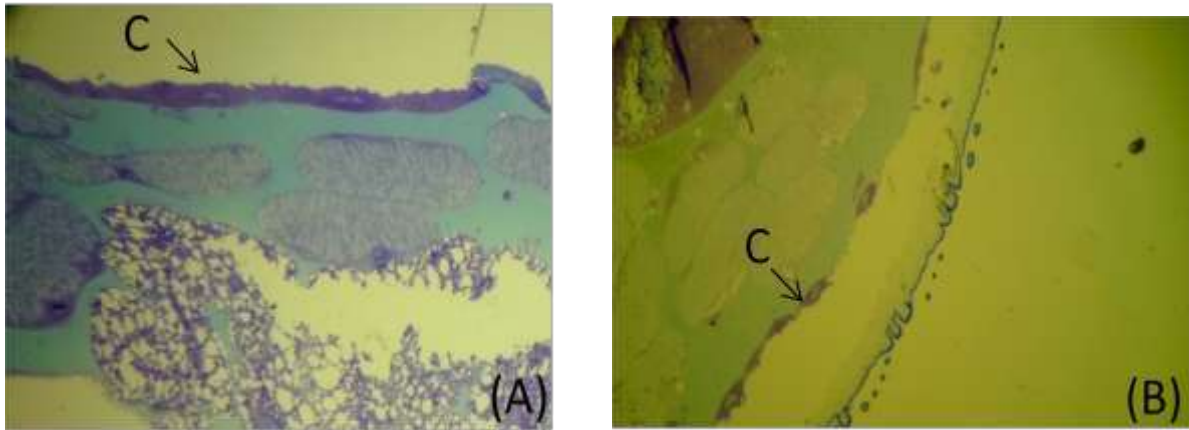


Figura 15 – Corte histológico evidenciando uma das camadas da cutícula em uma seção do segmento abdominal de larvas de terceiro ínstar de *Lucilia cuprina*. (A) controle, (B) tratado com *Brevibacillus laterosporus*, C - cutícula.

## 5. CONCLUSÕES

- A bactéria *Brevibacillus laterosporus* apresentou potencial para utilização como agente de controle biológico sobre a espécie *Lucilia cuprina* pelos resultados obtidos sobre a mortalidade dos indivíduos, os desvios na razão sexual e a ocorrência de deformidades tanto externas quanto ao nível histológico e celular.
- As estirpes NRS 661 e NRS 1648 são promissoras para utilização em trabalhos de controle biológico, uma vez que geraram resultados bastante satisfatórios em todas as diluições oferecidas para os insetos em relação tanto a mortalidade quanto aos efeitos subletais, tendo a estirpe NRS 1648 em sua suspensão mais diluída ocasionado a morte de 70% das larvas de *Lucilia cuprina*.
- A estirpe NRS 1111 destacou-se por apresentar bons resultados sobre a mortalidade dos insetos em soluções não diluídas e com diluição a  $10^{-4}$ , uma vez que afetou a viabilidade em todas as fases do desenvolvimento dos indivíduos. Sendo também uma opção como agente de controle biológico.
- A estirpe ATCC 64, parece ser promissora pois gerou mortalidade alta para a concentração de UFC/ml menor que as demais (100 a 1000 vezes menos concentrada).
- Densidades menores acarretaram em maiores mortalidades, pois as estirpes que continham concentrações de  $10^4$ , já nas soluções não diluídas mataram mais de 50% das larvas (ATCC 64), e aquelas que tinham soluções mais densas, tiveram a mortalidade aumentada conforme foram mais diluídas (NRS 661, Shi 2, NRS 1648).

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, MDC, Rossi, JR, Rodrigues, MGF, Alves, ECDC, Ferraudó, AS, Lemos, MVF, Desidério, JA, Fernandes, OA. 2011. Identification and characterization of coleóptera-specific vip and cry genes in *Bacillus thuringiensis* isolates. **Pesq Agropec Bras.** 46(9), 1053-1060.

Batista-da-Silva, JA, Abádio, HC, Queiroz, MMC. 2009. Miíase humana por *Dermatobia hominis* (Linneaus Jr.) (Diptera, Cuterebridae) e *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera, Calliphoridae) em Sucessão Parasitária. **Entomo Brasilis.** 2 (2): 61-63.

Begum, M, Kabir, MA, Khan, HR, Rahman, MF. 2012. Efficacy of monosodium glutamate in the australian blowfly, *Lucilia cuprina* Wiedmann (Diptera: Calliphoridae). **Bangladesh J Zool.** 40(1):69-75.

Binnington, KC. 1985. Ultrastructural changes in the cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia*, induced by certain insecticides and biological inhibitors. **Tissue & Cell.** 17 (1) 131-140.

Bravo, A, Gill, SS, Soberón, M. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon.** 49(4), 423-435.

Brito, D. 2009. Análise de viabilidade de populações: uma ferramenta para a conservação da biodiversidade no Brasil. **Oecol Bras.** 13(3):452-469.

Cardoso, A, Conte, H, Nanya, S. 2011. Estudo morfológico do mesentero em larvas de *Dione juno juno* Cramer, 1779 (Lepidoptera: Nymphalidae) submetidas a tratamentos com Nim (Azadirachta indica, Meliaceae) em condições de laboratório. **VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar.**

Carramaschi, IN, Queiroz, MMC, Barbosa, M, Zahner, V. 2009. Avaliação da possibilidade de bioprospecção com *Breviabaillus laterosporus* em artrópodes de importância na saúde pública, Pôster de Iniciação Científica.



Carvalho, CJB, Ribeiro, PB. 2000. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil, **Ver. Bras. Parasitol. Vet.**, 9, 2, 169-173.

Charles, JF, Nielson-LeRoux, C, Delecluse, A. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. **Ann. Rev. Entomol.** 41(1), 451-472.

Costa, ELN, Lucho, APR, Fritz, LL, Fiuza, LM. 2010. Artrópodes e bactérias entomopatogênicos **Biotec. Ciên. Desenvol.** - nº 38

Deleito, CSR, Moya-Borja, GE. 2008. Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. **Pesq. Vet. Bras.** 28(6):293-298.

Duarte, JP, Cárcamo, MC, Zimmer, CR, Ribeiro, PB, Leite, FPL. 2009. Patogenia de *Bacillus thuringiensis* e *Brevibacillus laterosporus* em larvas de *Musca domestica* (Diptera, Muscidae), em laboratório. **XVIII CIC, XI ENPOS, I Mostra científica.**

Drobniewski, FA. 1994. The safety of *Bacillus* species as insect vector control agents. **J. Appl. Microbiol.** 76(2), 101-109.

Favret, ME, Yousten, AA. 1985. Insecticidal Activity of *Bacillus laterosporus* **J. Invertebr. Pathol.** 45:195–203.

Fernandes, FM, Lapola, DM, Neregato, R, Carvalho, MH, Von Zuben, CJ. 2003. Curva de sobrevivência e estimativa de entropia em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae). **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, 93(3):319-324.

Fernandes, LF, Pimenta, FC, Fernandes, FF. 2009. First report of human myiasis in Goiás state, Brazil: frequency of different types of myiasis, their various etiological agents, and associated factors. **Journal of Parasitology.** 95(1), 32-38.

Figueiredo, AL, Felipe, TG, Vinhas, FA, Carvalho, RP, Azevedo, WTA, Lessa, CSS, Aguiar, VM. 2012. *Lucilia cuprina* (Weid, 1830) (Diptera: Calliphoridae) associada à miíase

humana em pacientes atendido no Hospital Federal do Andaraí no Rio de Janeiro, RJ. **CBE 2012.**

Fisher, RA. 1930. **The genetical theory of natural selection.** Oxford, Clarendon Press 230 p.

Floris, I, Ruiu, L, Satta, A, Delrio, G, Rubino, S, Paglietti, B, Ellar, DJ, Pantaleoni, RA, 2010. *Brevibacillus Laterosporus* Strain Compositions Containing the Same and Method for the Biological Control of Dipters. **United States Patent Application Publication, US2010/0003227 A1**

Furlanetto, SMP, Campos, MLC, Harsi, CM, Buralli, GM, Ishiiata, GK. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Rev. Microbiol.**, 15(3):170-174.

Gião, JZ, Godoy, WAC. 2006. Seasonal Population Dynamics in *Lucilia eximia* Wiedemann) (Diptera:Calliphoridae). **Neotrop. Entomol.** 35(6):753-756

Giolo, FP, Busato, GR, Garcia, MS, Manzoni, CG, Bernardi, O, Zart, M. 2006. Biologia de *Helicoverpa zea* (Baddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. **R. Bras. Agrociência.** Pelotas, v12, n2, p. 167-171.

Gomes, L, Von Zuben, CJ. 2004. Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. **Iheringia.** Série Zoologia, 94(2), 135-138.

Greenberg, B. 1973. Flies and Disease. Vol II: Biology and disease transmission. Princeton **Univ. Press., Princeton, NJ, 447pp.**

Grimaldi, D, Engel, M.S. 2005. **Evolution of the Insects.** New York: Cambridge University Press. 755p.

Gullan, PJ, Cranston, PS. 2007. **Os Insetos: um resumo de entomologia.** Ed. Roca, São Paulo, 3ª ed. 440p.

Hall, M, Wall, R. 1995. Myiasis of humans and domestic animals. **Adv. Parasitol.** V.35, p 257-334.

Homero. 2011. **A Ilíada**. 1ed. São Paulo: Saraiva de bolso.

Hope, FW. 1840. On insects and their larvae occasionally found in the human body. **Trans R Entomol Soc London.** 2:256-271.

Junqueira, ACM. 2002. **Utilização do aDNA para estudos genético-evolutivos relacionados a introdução e dispersão de *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas.

Khater, HF, Hanafy, A, Abdel-Mageed, AD, Ramadan, MY, El-Madawy, RS. 2011. Control of the myiasis-producing fly, *Lucilia sericata*, with Egyptian essential oils. **Int J Dermatol.** v50(2), 187-194.

Lamas, C, Batista Filho, A, Leite, LG, Machado, LA, Almeida, JEM, Alves, LEA. 2000. Efeito do vírus da poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis* AGVPN sobre Chrysoptera externa (Neuroptera: Chrysopidae) e *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Bioikos.** 14(1).

Leemon, DM, Jonsson, NN. 2012. Comparison of bioassay responses to the potential fungal biopesticide *Metarhizium anisopliae* in *Rhipicephalus (Boophilus) micropilus* and *Lucilia cuprina*. **Vet Parasitol.** v185, 236-247.

McCray, AH. 1917. Spore-forming bacteria of the apiary. **J. Agric. Res.** 8, 399-420.

Melo, ALA, Sanchuki, CE, Woiciechowsk, AL, Thomaz-Soccol, V, Soccol, CR. 2012. Utilização da cama de frango em meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. israelensis Berlinor para o controle de *Aedes aegypti* Linnaeus. **J. Biotechnol. Biodivers.** 2(4).

Melo, IS, Azevedo, JL. 1998. **Controle Biológico.** v 1. Jaguariúna, SP. EMBRAPA. 264p.

Mendonça, PM; Santos-Mallet, JR; Queiroz, MMC. 2011. Ultrastructure of Immature Stages of the Blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann 1818) (Diptera: Calliphoridae). **Microsc Res Tech**, v. 07, p. 1-6.

Mognato, CM. 2000. **Avaliação do potencial inseticida das folhas de *A. indica*, *M. azedarach* e *E. robusta* sobre o controle dos dípteors *L. cuprina* e *C. megacephala*, em condições de laboratório**. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Seropédica, Rj. 86p.

Moretti, TC, Thyssen, PJ. 2006. Miíase primária em coelho doméstico causada por *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.1, p.28-30.

Moura, EDS, Azevedo, FR, Santos, C. 2011. Controle de pragas da goiabeira (*Psidium guajava*) com ensacamento de frutos. **Cadernos de Agroecologia** – ISSN, 6(2), 1.

Mukandiwa, L, McGaw, LJ, Eloff, JN, Naidoo, V. 2012a. Extracts of four species used traditionally to treat myiasis influence pupation rate, pupal mass and adult blowfly emergence of *Lucilia cuprina* and *Chrysomya marginalis* (Diptera: Calliphoridae). **J Ethnopharmacol.** v143, 812-818.

Mukandiwa, L, Eloff, JN, Naidoo, V. 2012b. Evaluation of plant species used traditionally to treat myiasis for activity on the survival and development of *Lucilia cuprina* and *Chrysomya marginalis* (Diptera: Calliphoridae). **Vet Parasitol.** v190, 566-572.

O'Donnell B. 1997. Treatment of soil and plants with a composition containing *Bacillus laterosporus*. **USPTO**, US 5702701.

Oliveira-Costa, J, Mello-Patiu, CA, Carvalho, LM, Thyssen, PJ, Gomes, L, Queiroz, MMC, Milano, S, Fontes, LR, Celino, TB, Dias, GS, Pessanha, RR, Santana, DO. 2007. **Entomologia Forense - Quando os insetos são vestígios**. 2 ed. Campinas, SP: Millenium. 420p.

Oliveira, EJ 2003. *Brevibacillus laterosporus*: caracterização, estudo da diversidade genética e sensibilidade de alguns insetos e molusco Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz.

Oliveira, EJ, Rabinovitch, L, Monnerat, RG, Passos, LKJ, Zahner, V. 2004. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potential Use in Biological Control, **Appl. Env. Microb.**, Nov. 2004, p. 6657–6664.

Oliveira, MS, Nascimento, MA, Cavados, CFG, Chaves, JQ, Rabinovitch, L, Lima, MM, Queiroz, MMC. 2006. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* Strains against Larvae of the Blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), **Neotrop. Entomol.** 35(6): 849-852.

Oliveira, VC, Mello, RP, D’Almeida, JM. 2002. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico, Brasil. **Rev. Saúde Públ.** 36 (5): 614 - 620.

Orlova, MV, Smirnova, TA, Ganushkina LA, Yacubovich, VY, Azizbekyan, RR. 1998. Inseticidal activity of *Bacillus laterosporus*. **Appl. Env. Microb.**, p. 2723-2725.

Paes, MJ, Brito, LG, Moya-Borja, GE, Daemon, E. 2001. Determinação das exigências térmicas para o desenvolvimento pós-embrionário de *Lucilia cuprina* (Wied., 1830) (Diptera: Calliphoridae). **Parasitol. Dia.** v.25 n.3-4.

Paes, MJ, Brito, LG, Moya-Borja, GE, Daemon, E. 2005. Comportamento reprodutivo e longevidade de casais isolados e agrupados de *Lucilia cuprina*, sob condições controladas. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 14, 1, 21-25.

Perez, JM, Granados, JE, Ruiz-Martines, I. 1997. Etiologia y biologia [Miasis]. **Ovis.** Espanha.v.49 p. 13-31.

Pirali-Kheirabadi, K, Cheraghchi-Bashi, M, Navidpour, S. 2010. Infestation of an owl (*Bubo bubo*) with *Lucilia* spp. **Comp Clin Pathol.** 19:221–224.

Pires, AFP, Caliman, A, Laque, T, Esteves, F, Bozelli, R, Farjalla, V. 2007. Efeitos da predação e diversidade na composição e estrutura da comunidade bacteriana. **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**. Caxambu – MG.

Pires, LM, Marques, EJ, Oliveira, JU, Alves, SB. 2010. Seleção de isolados de fungos entomopatogênicos para o controle de *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) e sua compatibilidade com alguns inseticidas usados na cultura do tomateiro. **Neotrop Entomol.** 39(6), 977-984.

Poopathi, S, Philip Samuel, P, Sundaravadivelu, K, Ramesh, N, Tyagi, BK. 2008. Ultrastructural changes in the lysosomes of the midgut epithelial cells of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) following infection with *Bacillus sphaericus* IAB59 toxin. **Int. J. Trop. Insect Sci.** 28(04), 185-190.

Poopathi, S, Tyagi, BK. 2005. Mosquitocidal toxins of spore forming bacteria: recent advancement. **Afr. J. Biotechnol.** 3(12), 643-650.

Prado, AP. 2003. Controle das principais espécies de moscas em áreas urbanas. **Biol.**, São Paulo, v.65, n.1/2, p.95-97.

Prado, EP, Raetano, CG, Aguiar-Júnior, HO, Christiovam, RDS. 2010. Velocidade do fluxo de ar em barra de pulverização no controle químico de *Anticarsia gemmatalis*, Hübner e percevejos na cultura da soja. **Bragantia.** 69(4), 995-1004.

Quesada-Lobo, L, Troyo, A, Calderón-Aguedas, O. 2012. Primer reporte de miasis hospitalaria por *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) en Costa Rica. **Biomédica.** v32: 485 - 9.

Queiroz, MMC, Mello, RP, Lima, MM. 1997. Morphological aspects of the larval instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) reared in the laboratory. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 92: 187-196.

- Rao DR, Mani TR, Rajendran, R, Joseph, AS, Gajanana, A, Reuben, R. 1995. Development of a high level of resistance to *Bacillus sphaericus* in a Field population of *Culex quinquefasciatus* from Kochi, India. **J Am Mosq Control Assoc**, 11(1):1-5.
- Ribeiro, FAQ, Pereira, CSB, Alves, A, Marcon, MA. 2001. Tratamento da miíase humana cavitária com ivermectina oral. **Rev Bras Otorrinolaringol**. V.67, n.6, 755-6.
- Rodrigues, WC. 2004. Utilização da informática na entomologia. **Info Insetos**. V.1, p 1-10.
- Rognes, K. 1991. **Blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark**. Países Baixos, E. J. Brill. V.24, 272p.
- Ruiu, L, Floris, I, Satta, A, Ellar, DJ. 2007. Toxicity of a *Brevibacillus laterosporus* strain lacking parasporal crystals against *Musca domestica* and *Aedes aegypti*. **Biol. Control**, 43:136-143.
- Sá, RED, Castellani, MA, Nascimento, ASD, Ribeiro, AEL, Moreira, AA. 2012. Natural parasitismo in fruit-flies in the fruticulture área of Anagé, semi-arid of southwestern Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Frutic**. 34(4), 1266-1269.
- Schuller, L. 2000. As moscas domésticas e sua importância na transmissão de intoxicações e infecções alimentares. **Hig. Aliment**. 14(73): 28-38.
- Serra-Freire, NM, Mello, RP. 2006. **Entomologia e acarologia na medicina veterinária**. Rio de Janeiro, RJ. L. F. Livros. 200p
- Silva, AC, Batista, A, Leite, LG, Tavares, FM, Raga, A, Schmidt, FS. 2010. Efeito de nematoides entomopatogênicos na mortalidade da mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata*, e dogorgulh-da-goíaba, *Conotrachelus psidii*. **Nematol. Bras**. 34(1), 31-40.
- Silva, PC, Guimarães, FL, Ferreira, FNC. 2001. **Controle de vetores – Procedimento de segurança**. 1 ed. Brasília. Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde. 208p.

Stevens, J, Wall, R. 1997. The Evolution of Ectoparasitism in the Genus *Lucilia* (Diptera: Calliphoridae). **Int. J. Parasitology**. Vol. 27. No. 1. pp 51 -59.

Sukontason, KL, Narongchai, P, Sripakdee, D, Boonchu, N, Chaiwong, T, Ngern-Klun, R, Piangjai, S, Sukontason, K. 2005. First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in forensic entomology. **J. Med. Entomol.** 42(4), 702-704.

Sukontason, K, Narongchai, P, Kanchai, C, Vichairat, K, Sribanditmongkol, P, Bhoopat, T, Hiromu, K, Chockjamsai, M, Piangjai, S, Bunchu, N, Vongvivach, S, Samai, W, Chaiwong, T, Methanitikorn, R, Ngern-Klun, R, Sripakdee, D, Boonsriwong, W, Siriwattananurongsee, S, Srimuangwong, C, Hanterdsith, B, Chaiwan, K, Srisuwan, C, Upakut, S, Moopayak, K, Vogtsberger RC, Olson, JK, Sukontason, KL. 2007. Forensic entomology cases in Thailand: a review of cases from 2000 to 2006. **Parasitol. Res.** 101(5), 1417-1423.

Turnbull, IF, Pyliotis, NA, Howells, AJ. 1980. The effects of DOPA decarboxylase inhibitors on the permeability and ultrastructure of the larval cuticle of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **J. Insect Physiol.** Vol. 26, pp. 525 to 532.

Yuan, Z, Zhang, Y, Cai, Q, Liu, E. 2000. High-Level Resistance to *Bacillus sphaericus* C3-41 in *Cluex quinquefasciatus* from Southern China. **Bio. Sci. and Technol.**, 10, 41-49.

Zahner, V, Rabinovitch, L, Suffys, P, Momen, H. 1999. Genotypic Diversity among *Brevibacillus laterosporus* Strains. **Appl. Env. Microb.** Nov. 1999, p. 5182–5185.

Zumpt, F. 1965. **Myiasis in man and animals in the Old World**. Butterworths, London, 267 p.