

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Ana Carolina Medeiros Debelian
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Rua Frei Caneca, 94, Centro
Rio de Janeiro - RJ, Brazil
Phone: +55(21)996413141
E-mail: anacarolina.debelian@edu.unirio.br

Excreção/secreção de larvas de dípteros califorídeos como alternativa terapêutica

Ana Carolina Medeiros Debelian^{1,2}, Renato Geraldo da Silva Filho¹, Ana Cristina Silva Pinto²

1 Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, Brazil.

2 Escola de Enfermagem Alfredo Pinto, Departamento de Enfermagem Médico-Cirúrgico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – RJ, Brazil.

27 ABSTRACT

28 A Terapia Larval consiste na aplicação de larvas de moscas necrobiontófagas, em geral da
29 família Calliphoridae, para o biodesbridamento de feridas. As excreções/secreções (*natural*
30 *excretions and secretions* - NES) liberadas pelas larvas se tornou alvo de estudos como fonte
31 terapêutica alternativa para o enfrentamento dos microrganismos multidrogarresistentes.
32 Porém, a diversidade metodológica de seus estudos de atividade antimicrobiana gera
33 resultados contraditórios, culminando no entrave para sua aprovação pelas principais agências
34 reguladoras. O presente estudo objetivou analisar a produção científica acerca dos estudos
35 realizados com a NES, com foco nas principais questões apontadas como conflitantes na
36 avaliação de sua atividade antimicrobiana. Trata-se de uma revisão integrativa que teve como
37 pergunta norteadora “Qual a produção científica acerca das técnicas laboratoriais para
38 avaliação da atividade antimicrobiana da NES de larvas de dípteros califorídeos?”. Foram
39 consultadas as bases PubMed, Scopus, Web of Science e Scielo, utilizando os descritores
40 DeCS/MeSH *calliphoridae*, *larva*, *blowfly*, *antibacterial agent* e *microbial sensitivity tests*.
41 Foram analisadas a técnica de extração, pH, aquecimento e fracionamento molecular da NES.
42 Os resultados sugerem que o pH poderia ser um marcador de atividade antimicrobiana, já que
43 a alcalinidade poderia estar relacionada com maiores quantidades de compostos
44 antimicrobianos. Complementarmente, a análise da atividade proteolítica utilizado teste da
45 gelatinase ou de atividade lítica sobre *Micrococcus lysodeikticus* também seriam bons
46 parâmetro de avaliação da qualidade da NES. O jejum larval antes da extração, sua
47 concentração após a extração e o doseamento de proteínas seriam estratégias de
48 melhoramento da NES para melhor evidenciação de sua atividade antimicrobiana.

49 Keywords: calliphoridae; antimicrobial activity; excretions/secretions

50

Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: Journal of Medical Entomology

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

51 INTRODUCTION

52 A ordem dos dípteros é composta por insetos que, na forma adulta, possuem um par de
53 asas funcionais e um par de asas vestigiais - os alteres ou balancins, que possuem importância
54 taxonômica e conferem estabilidade aos insetos durante o voo. Possuem evolução do tipo
55 holometabólica, passando obrigatoriamente pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto. Ou seja,
56 sofrem metamorfose completa. É composta por mosquitos (Subordem Nematocera) e moscas
57 (Subordem Brachycera) (Neves 2005).

58 Dentro desta ordem, a família Calliphoridae, conhecida popularmente como mosca-
59 varejeira, chama atenção pelos seus hábitos necrófagos, que são de grande interesse para
60 entomologia forense, por auxiliar na estimativa do intervalo *post-mortem* (IPM). Possuem
61 também importância médico-sanitária, uma vez que são vetores de patógenos e são
62 causadoras de miíases cutânea, cavitária ou intestinal (Lima 2013).

63 Devido à capacidade das larvas de alguns dípteros califorídeos de seletivamente
64 consumirem tecido morto e preservar o tecido viável, essas larvas necrobiontófagas têm sido
65 empregadas para biodesbridamento de feridas crônicas. Seu uso remonta aos povos mais
66 primitivos. Civilizações antigas como tribos aborígenes da Austrália, habitantes do Norte de
67 Mianmar e os Maias na América Central já utilizavam os benefícios desta técnica
68 (Dallavecchia et al. 2011). A bioterapia, terapia larval moderna ou biocirurgia foi introduzida
69 em 1931 pelo médico estadunidense William Baer, cirurgião ortopédico e professor no
70 Hospital Johns Hopkins, em Maryland, e foi utilizada rotineiramente até meados da década de
71 40 em mais de 200 unidades hospitalares nos Estados Unidos. Ainda durante a década de
72 1930, diversas tentativas de buscar pelo “princípio ativo da larva” geraram trabalhos que
73 reportavam os benefícios do extrato larval para tratamento da infecção e desbridamento de

74 feridas (Simmons 1935a, 1935b, Pavillard and Wright 1957, Thomas et al. 1999, Sherman et
75 al. 2000).

76 Com o advento da antibioticoterapia, a Terapia Larval (TL) se tornou obsoleta, sendo
77 esta técnica reintroduzida no mundo na década de 1990, devido ao crescimento da resistência
78 bacteriana aos antimicrobianos. Desde então a TL é aplicada em mais de 30 países (a maior
79 parte em países europeus e nos Estados Unidos), onde passou a ser comercializada por
80 diversas empresas como larvas estéreis de forma livre ou ensacadas (“BioBag”) para
81 aplicação em feridas. Apesar de mundialmente utilizada, no Brasil a prática não é muito
82 difundida, e tem como referência o Hospital Universitário Onofre Lopes (Natal, Rio Grande
83 do Norte) (Silva et al. 2020). Por ser erroneamente confundida com mífase, muitos tem asco e
84 aversão à aplicação das larvas para tratamento de feridas, principalmente entre os
85 profissionais da saúde, mais do que entre os próprios pacientes (Dallavecchia et al. 2011).

86 Atualmente, estão em voga estudos sobre os peptídeos antimicrobianos (AMP),
87 substâncias presentes na excreção/secreção natural das larvas (*natural excretions and*
88 *secretions* – NES), que são responsáveis pela atividade antimicrobiana das larvas sobre
89 diversos patógenos. Além da ação sobre microrganismos, a NES é responsável pela
90 liquefação de tecidos necróticos no leito da ferida, possibilitando sua ingestão pelas larvas, e
91 consequentemente o desbridamento da ferida. Aparentemente, a NES é liberada pela larva
92 durante seu período de alimentação, com a finalidade de suprimir possíveis microrganismos
93 competidores, garantindo sua sobrevivência (Kruglikova and Chernysh 2011).

94 Diferentemente da TL, que tem sua eficácia comprovada (Sherman 2002, Steenvoorde
95 and Jukema 2004, Tantawi et al. 2007, Jaklič et al. 2008, Baer 2011) e seu uso aprovado por
96 órgãos reguladores, como o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos
97 (Medical Maggots; Monarch Labs, Irvine, CA), o uso da NES ou seus peptídeos ainda não

98 está consolidado (Ratcliffe et al. 2011). Isto por que há inconsistência nos resultados obtidos
99 entre os diferentes estudos quanto a real ação do(s) componente(s) presente(s) na NES, o que
100 poderia ser atribuído à falta de padronização de metodologias empregadas na avaliação da sua
101 atividade antimicrobiana.

102 Desta forma, a realização do presente estudo justifica-se pela existência de uma grande
103 diversidade de metodologias empregadas nos estudos da extração e atividade antimicrobiana
104 da NES, o que implica, muitas vezes, em resultados contraditórios dos níveis de tal atividade
105 sobre os principais microrganismos utilizados, além de dificultar a comparação dos resultados
106 obtidos. Segundo Barnes, Dixon, et al. (2010), a redução da variação dos resultados nos
107 estudos da NES dependeria da padronização de fatores como a quantidade de larvas utilizadas
108 na extração da NES, o pH dos extratores empregados, o tamanho do inóculo bacteriano e os
109 meios de cultura dos testes de atividade antimicrobiana.

110 Este estudo teve como objeto as técnicas laboratoriais de estudo da atividade
111 antimicrobiana da NES, tendo como objetivo analisar a produção científica acerca dos estudos
112 realizados com a NES, com foco as principais questões apontadas como conflitantes na
113 avaliação de sua atividade antimicrobiana.

114

115 METODOLOGY

116 Trata-se de uma revisão integrativa da literatura, caracterizada por possuir ampla
117 abordagem metodológica, que permite completa compreensão do fenômeno em questão,
118 gerando um panorama consistente e compreensível do problema analisado (Souza et al. 2010).
119 Assim, a escolha da revisão integrativa para o presente estudo se justifica pela necessidade de
120 consolidar o universo de assuntos que contemplam o tema sobre ensaios laboratoriais com a
121 NES de larvas de dípteros califorídeos.

Indicação de Avaliador: Prof^a. Dr^a. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: Journal of Medical Entomology

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

122 Para elaboração da revisão, as etapas de Souza et al. (2010) foram adotadas como
123 referencial metodológico, a saber: i) elaboração da pergunta norteadora; ii) busca ou
124 amostragem na literatura; iii) coleta de dados; iv) análise crítica dos estudos incluídos; v)
125 discussão dos resultados e; vi) apresentação da revisão integrativa.

126 A estratégia PICO foi utilizada para formulação da pergunta de pesquisa (Butler et al.
127 2016), sendo “P”- População, “I”- Intervenção, “C”- Comparação/Controle e “O”-
128 Desfecho/Resultado. Assim, temos: P: “larvas de dípteros califórídeos”; I: “ensaios
129 laboratoriais”; C: “consolidação de metodologias de estudo de atividade antimicrobiana”; O:
130 “avaliação da atividade antimicrobiana”. Dessa forma, a revisão partiu da seguinte pergunta
131 norteadora: “Qual a produção científica acerca das técnicas laboratoriais para avaliação da
132 atividade antimicrobiana da NES de larvas de dípteros califórídeos?”.

133 A busca foi realizada nas bases de dados PubMed, Web of Science, Scopus e Scielo,
134 usando os seguintes descritores DeCS/MeSH e seus sinônimos: *calliphoridae*, *larva*, *blowfly*,
135 *antibacterial agent* e *microbial sensitivity tests*. Os termos serão combinados utilizando os
136 operadores booleanos *AND* e *OR*. Foram selecionados trabalhos de 1931 até 2021, tendo sido
137 o ano de 1931 selecionado por ser o ano do primeiro trabalho publicado sobre aplicação
138 moderna da Terapia Larval, por William Baer (Baer 2011). Além disso, os primeiros
139 trabalhos publicados sobre os testes com a exosecreção dessas larvas também foram
140 publicados a partir desta época (Simmons 1935a, 1935b).

141 Como critérios de inclusão foram estabelecidos artigos completos publicados em
142 português, inglês e espanhol que abordassem as propriedades físico-químicas da NES para os
143 testes de atividade antimicrobiana *in vitro*. Os critérios de exclusão adotados foram: artigos
144 duplicados; trabalhos de conclusão de curso; teses de mestrado e doutorado; trabalhos que

145 utilizassem moscas de outras famílias que não os califorídeos; trabalhos que utilizassem
146 extrato metílico das larvas ou hemolinfa.

147 O instrumento de coleta de dados utilizado foi o proposto e validado por Ursi and
148 Gavão (2006), modificado para melhor atender aos objetivos da presente revisão.
149 Confeccionado no programa Microsoft Excel®, o instrumento contou com os seguintes
150 campos: autores, título, resumo, revista, ano de publicação, objetivo, metodologia, resultados,
151 implicações, recomendação dos autores e identificação de limitação e vieses. O período de
152 coleta de dados se deu de setembro a novembro de 2021.

153 A seleção dos artigos e análise dos dados foi realizada pela leitura do título, resumo e
154 texto completo, sistematizada no instrumento de coleta de dados e pautada nos critérios de
155 inclusão e exclusão. Os achados foram apresentados e discutidos de forma descritiva e em
156 tabelas, quando necessário. Para melhor abordagem do assunto, adotaram-se quatro áreas de
157 discussão: extração da NES, pH da NES, aquecimento da NES e fracionamento molecular da
158 NES (Lourenço et al. 2012).

159 A estratégia de “reescavagem” foi utilizada a fim de ampliar a recuperação de estudos
160 sobre a temática. A reescavagem ocorreu a partir da verificação das referências de cada artigo,
161 buscando estudos que atendiam aos critérios de inclusão/exclusão e que não haviam sido
162 localizados durante a busca nas bases de dados (Souza and Alvarenga 2016).

163

164 RESULTS

165 Em um primeiro momento, foi realizada a busca nas bases de dados com os descritores
166 supracitados. Como a quantidade de artigos recuperada foi expressiva, contabilizando um
167 total de 1444 artigos, a primeira seleção se deu nas próprias bases de dados pela leitura do
168 título dos trabalhos, com base nos critérios de inclusão e exclusão adotados na metodologia,

169 de forma a totalizar 139 artigos recuperados. As estratégias de busca utilizadas nas bases de
170 dados e o total de artigos recuperados em cada base de dados estão representados na Tabela 1.

171 Em um segundo momento, foi realizado exclusão de 11 artigos duplicados. Os 128
172 artigos restantes foram analisados quanto aos resumos e selecionados com base nos critérios
173 de inclusão e exclusão. Dos 128 artigos, 110 foram excluídos. Quanto à elegibilidade, os 18
174 artigos foram lidos na íntegra e 2 excluídos por não correlacionarem a técnica de extração e as
175 propriedades físico-químicas da NES com sua atividade antimicrobiana. Durante esta leitura,
176 5 artigos foram recuperados por repescagem. O detalhamento do fluxo de seleção elaborado
177 com base no PRISMA (Principais Itens para Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises)
178 está ilustrado na Figura 1.

179

180 DISCUSSION

181 *Extração da secreção/excreção larval*

182 Nos primeiros experimentos de extração da NES as larvas de *L. sericata* eram
183 removidas da sua dieta, empregada para postura e eclosão dos ovos, transferidas para uma
184 peneira e pulverizadas com água destilada por um período de 10 minutos a 4 horas. O líquido
185 drenado era coletado e esterilizado por aquecimento, sendo então empregado nos testes de
186 atividade antimicrobiana (Simmons 1935a, 1935b, Pavillard and Wright 1957).
187 Posteriormente, em um estudo realizado por Thomas et al. (1999), larvas estéreis foram
188 lavadas com 200 µL de água estéril sendo então o líquido de lavagem centrifugado para
189 remoção do material particulado e congelado até o uso nos testes.

190 O estudo realizado por Bexfield et al. (2004) introduziu importantes modificações e
191 padronizações na técnica de extração da NES, e que se mantêm como base das metodologias
192 da maioria dos estudos subsequentes. Nesse, larvas estéreis disponíveis comercialmente para

193 uso em terapia larval foram colocadas em um recipiente com água ultrapura estéril, na
194 proporção de 200 $\mu\text{L g}^{-1}$ de larvas. Após incubação por 1 hora a 30°C no escuro, o líquido foi
195 removido do recipiente, centrifugado e o sobrenadante empregado nos testes.

196 Em muitos estudos posteriores a metodologia empregada foi baseada na técnica de
197 extração de NES proposta por Bexfield et al. (2004), sendo essas consolidadas na Tabela 2.

198 Das metodologias apresentadas na tabela 2 podemos destacar a modificação proposta
199 por Ratcliffe et al. (2015) onde as larvas são submetidas um jejum de 18-24 h antes da
200 extração da NES. Segundo Kruglikova and Chernysh (2011), para se obter NES com
201 atividade antimicrobiana eficiente, em função da grande quantidade de impurezas e
202 pigmentos, é necessária a sua concentração, ou evitar sua diluição excessiva durante a
203 extração. Conseqüentemente, mesmo com a utilização de volumes mínimos de extrator (ou
204 seja, utilização de mínimo volume de extrator para determinado peso/quantidade de larvas), a
205 exosecreção contém uma pequena quantidade de componentes antimicrobianos. Assim, o
206 jejum larval diminui consideravelmente a presença conteúdo intestinal das larvas na NES,
207 reduzindo a presença desses dejetos quando da extração da sua extração. Possibilita, portanto,
208 a obtenção de um sobrenadante límpido após a centrifugação, sem a coloração marrom escura
209 decorrente dos dejetos das larvas. A obtenção de NES límpido e sem cor é importante quando
210 do emprego de métodos espectrofotométricos ou a dosagem de proteínas.

211

212 *pH da excreção/secreção larval*

213 O objetivo inicial desta seção era correlacionar o pH da NES com sua atividade
214 antimicrobiana. Contudo, a maior parte dos estudos que fazem citação ao pH da NES não
215 estabelecem esta correlação. Baer (2011), em um estudo republicado em 2011 sobre
216 tratamento da osteomielite crônica, observou que o pH dos fluídos da ferida se tornava

217 alcalino no segundo ou terceiro dia após o início da larval, acreditando que essa mudança
218 contribuiria para redução do crescimento bacteriano. Essa alcalinização decorre da produção
219 pelas larvas de amônia (Messer and McClellan 1935), e seus derivados, teria ação na
220 eliminação das bactérias e cicatrização da ferida. Posteriormente, foi observado que esse pH
221 alcalino era necessário para a atividade de enzimas proteolíticas, serina-proteases e
222 metaloproteinase, presentes na NES e importantes na degradação de fibrina, fibronectina,
223 laminina e outros componentes da matriz extracelular presentes nas feridas (Chambers et al.
224 2003).

225 Um dos primeiros estudos sobre a atividade antimicrobiana da NES que faz menção ao
226 seu pH foi de Thomas et al. (1999). Os autores trabalharam com larvas de *L. sericata* e a NES
227 produzida apresentava um valor de 8,0 a 8,5. Esse dado não foi correlacionado com a
228 atividade da NES, mas sim empregado no ajuste do pH do meio de cultivo das culturas
229 controle dos experimentos que objetivavam determinar sua atividade antimicrobiana.

230 Posteriormente, Bexfield et al. (2004) avaliaram um grande número de amostras
231 (n=91) de NES produzidos por larvas de *L. sericata* estéreis (Biosurgical Research Unit, UK),
232 cujo pH variou na faixa de 7,6 a 9,0 , sendo que sua maioria (42%) possuía um pH de 8,2 a
233 8,3 . O Índice de Sobrevivência de *Staphylococcus aureus* obtido em Teste Turbidimétrico foi
234 significativamente menor em amostras de NES com pH iguais ou superiores a 8,0. Contudo, o
235 ajuste do pH dessas amostras para valores de 6,0 a 7,0 não reduzia a atividade antimicrobiana.
236 Com isso, reconheceram os autores do estudo que não existia então a correlação do pH
237 alcalino da NES com a sua atividade antimicrobiana.

238 Cazander, van Veen, Bernards, et al. (2009) também empregaram o Teste
239 Turbidimétrico para avaliar a atividade antimicrobiana da NES de larvas estéreis de *L.*
240 *sericata* (BioMonde GmbH, Germany) sobre bactérias Gram positivas (*S. aureus*,

241 *Streptococcus pyogenes* e *Enterococcus faecalis*) e Gram negativas (*Pseudomonas*
242 *aeruginosa* e *Klebsiella oxytoca*). A NES obtida apresentava pH 8,0 , mas os resultados
243 obtidos não indicaram atividade antimicrobiana da NES. Cabe ressaltar que a leitura do teste
244 turbidimétrico foi feita somente com 24 h de incubação, o que poderia ter possibilitado o re-
245 crescimento das amostras após uma inibição inicial pela NES.

246 Barnes, Gennard, et al. (2010) obteve NES de larvas de diferentes insetos criados em
247 colônias próprias do laboratório. A determinação do pH da NES possibilitou separá-los em
248 alcalinos, de *L. sericata* (8,67 a 8,82) e *Calliphora vicina* (8,53 a 8,68), e ácidos, de
249 *Dermestes maculatus* (6,00 a 6,14) e *Tenebrio molitor* (5,14 a 5,28). A atividade
250 antimicrobiana dessas amostras de NES foram testadas frente a espécies bacterianas Gram
251 positivas (*S. aureus*, *Bacillus cereus*) e negativas (*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus*
252 *mirabilis*). O ensaio de contagem de viáveis mostrou que não existia correlação
253 estatisticamente significativa entre o pH da NES e o seu nível de atividade antimicrobiana para
254 as espécies bacterianas testadas.

255 Com base nesses estudos fica claro que o pH da NES produzida por espécies de mosca
256 como *L. sericata* e *C. vicina* são alcalinos, variando de 7,6 a 9,0, mas que este fato não
257 influencia diretamente na atividade antimicrobiana da NES, podendo, contudo interferir no
258 desenvolvimento de bactérias, cuja faixa de pH para crescimento seja próxima da
259 neutralidade. No estudo de Bexfield et al. (2004) foi demonstrado que amostras de NES com
260 um pH mais elevado apresentavam maior atividade antimicrobiana que amostras com um pH
261 menos alcalino, mas sua acidificação da NES não influenciava na atividade antimicrobiana. O
262 estudo de Messer and McClellan (1935) indicou que a produção de amônia (e seus derivados)
263 seria responsável pela alcalinidade da NES. Este dado pode sugerir que amostras de NES com
264 maior concentração de componentes excretados pelas larvas teriam um pH mais elevado que

265 amostras de NES onde ocorreu uma maior diluição e, conseqüentemente, uma redução do pH
266 das secreções das larvas pelo extrator utilizado.

267 Além da mensuração do pH, uma das formas que podem ser utilizadas para avaliar
268 uma NES de boa qualidade, ou seja com alta concentração de agentes antimicrobianos, seria
269 verificar a ação das proteases naturalmente presentes na NES. A alcalinidade da NES é
270 atribuída à produção de amônia e seus derivados (Messer and McClellan 1935), sendo esta
271 condição importante para a ação das proteases. Com base nessas observações, Pickles and
272 Pritchard (2017) propuseram como controle de qualidade da NES a avaliação prévia da
273 atividade proteolítica em ágar gelatina.

274

275 *Aquecimento da excreção/secreção larval*

276 Os primeiros estudos a realizarem o aquecimento da NES tinham por objetivo
277 esterilizar essas secreções por meio da autoclavação, uma vez que os estudos para sua
278 obtenção não empregavam larvas estéreis. Simmons (1935a, 1935b) notou que a NES de
279 larvas de *L. sericata* submetida a 110°C por 20 minutos, manteve sua atividade bactericida
280 contra *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. faecalis*, *Clostridium welchii* e *Proteus vulgari*.
281 Do mesmo modo, NES de larvas de *Phormia terranova* submetido a 121°C por 30 minutos,
282 mantinha sua atividade contra estreptococos do grupo A, pneumococos do tipo 1,
283 estreptococos do grupo B e *Streptococcus viridans* (Pavillard and Wright 1957).

284 Thomas et al. (1999) relataram que a atividade antimicrobiana da NES contra
285 *Streptococcus A e B* e *S. aureus* era mantida após aquecimento, sugerindo que a atividade
286 antimicrobiana detectada não era de natureza enzimática. Essa hipótese foi reforçada por
287 Bexfield et al. (2004), que demonstraram que a atividade lítica da NES no método da placa de
288 orifício com *Micrococcus lysodeikticus* foi abolida após 5 minutos de incubação a 100°C, mas

289 a atividade antibacteriana da NES foi notavelmente estável ao calor, suportando uma
290 incubação a 100 ° C por 60 min sem perda da sua atividade. Os autores concluíram que as
291 o(s) componente(s) responsável(is) por essa ação lítica são proteases existentes na NES,
292 enquanto que componentes de natureza não enzimática seriam responsáveis por sua atividade
293 antimicrobiana.

294 Kerridge et al. (2005) relataram que não detectaram atividade antimicrobiana contra *S.*
295 *aureus* resistente a meticilina (MRSA) da NES de larvas de *L. sericata* após o aquecimento.
296 Contudo, os próprios autores reconhecem que isso poderia ter sido por conta do uso do teste
297 de difusão em placa de ágar, que possui baixa sensibilidade na detecção da atividade
298 antimicrobiana quando comparado com os ensaios turbidimétricos empregado nos estudos
299 anteriores.

300 Evans et al. (2015) relataram um aumento da atividade antifúngica da NES de larvas
301 de *L. sericata* após aquecimento a 100°C por 60 min, empregando o ensaio turbidimétrico.
302 Propuserem os autores que a NES se tornava mais ativa após a exposição a temperaturas mais
303 altas por longos períodos de tempo, característica esta também relatada por Bexfield et al.
304 (2004). Ratcliffe et al. (2015) relataram que o aquecimento por 1 h a 100°C da NES de larvas
305 de *Chrysomya megacephala* não alterou sua atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*.

306 Biofilmes nascentes e pré-formados também foram empregados no estudo da atividade
307 da NES após aquecimento. van der Plas, Jukema, et al. (2007) observaram que a NES
308 aquecida de larvas de *L. sericata* não inibiu a formação de biofilme e a desagregação de
309 biofilmes pré-formados de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A ação da NES de larvas de *L. sericata*
310 aquecido (100°C por 5 a 60 minutos) em biofilmes nascentes e pré-formados nas amostras de
311 *Staphylococcus. epidermidis* 1457 e 5179-R1 foi avaliada por Harris et al. (2009). Biofilmes
312 nascentes dessa espécie bacteriana tiveram a sua formação diminuída com o aumento do

313 tratamento térmico da NES, mas a formação não foi completamente abolida mesmo após 60
314 min de tratamento térmico da NES. A atividade de desagregação da NES aquecida sobre
315 biofilmes pré-formados das amostras estudadas foi reduzida em 35% e 53% para NES
316 aquecido por 5 minutos, respectivamente, e foi abolida após aquecimento por 10 minutos em
317 ambas as amostras.

318 Bohova et al. (2014). evidenciaram a perda da atividade proteolítica da NES após
319 tratamento térmico no ensaio de atividade de proteases em placas de ágar leite. A NES
320 liofilizada e ressuspensa apresentou alta atividade proteolítica nas concentrações de 5 a 500
321 mg/mL, enquanto nenhuma atividade foi evidenciada com a NES aquecida na concentração
322 de 500 mg/mL.

323 O comportamento distinto apresentado pela NES, sem e com tratamento térmico,
324 sobre bactérias livres e em biofilmes indica a existência de componentes com diferentes
325 ações. Os responsáveis pela atividade antimicrobiana possivelmente seriam peptídeos de
326 baixo peso molecular, que carecem de uma estrutura complexa, possibilitando que sua ação
327 persista mesmo após o tratamento térmico da NES. Já a atividade antibiofilme possivelmente
328 estaria associada à presença de proteases na NES. Como essas possuem alto peso molecular e
329 estrutura complexa, são degradadas quando do aquecimento da NES, perdendo sua ação.

330

331 *Fracionamento molecular da excreção/secreção larval*

332 ***Métodos simples de fracionamento molecular***

333 Um dos primeiros estudos sobre a ação antimicrobiana de frações moleculares da NES
334 de larvas de moscas foi o de Bexfield et al. (2004). Foram empregados em sequência filtros
335 Amicon (Millipore) com massa molar de corte (MWCO) de 10 kDa e 500 Da. No ensaio
336 turbidimétrico, o retentado com massa molecular > 10 kDa não apresentava ação

337 antimicrobiana sobre amostras de *S. aureus* tendo, contudo, atividade lítica sobre células de
338 *M. lysodeikticus* (*Micrococcus luteus*). Como essa atividade era perdida em função do
339 tratamento térmico foi correlacionada a presença de proteases na NES. As frações de massa
340 molecular < 10 kDa e < 500 Da apresentavam ação antimicrobiana, sendo essa resistente ao
341 aquecimento e ao tratamento com tripsina e pronase E. A fração com massa molecular entre
342 10 kDa e 500 Da apresentava ação antimicrobiana sobre *S. aureus*, mas não sobre MRSA. Já a
343 fração < 500 Da apresentava ação sobre amostras de *S. aureus* e MRSA. Os autores
344 concluíram que em função da baixa massa molecular a ação observada na fração < 500 Da
345 não seria decorrente de peptídeos antimicrobianos de insetos conhecidos, como as
346 magaininas, apidecinas ou defensinas, que possuem massa molecular de 2 a 4 kDa.
347 Possivelmente essa ação estaria ligada a presença de dipeptídeos antimicrobianos descritos em
348 larvas dos dípteros como β -alanyl-tyrosine (252 Da) de *Neobellieria bullata* e N- β -alanyl-5-S-
349 glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine (573 Da) de *Sarcophaga peregrina*. A β -alanyl-
350 tyrosina é resistente ao tratamento térmico (120°C por 20 min) e sendo um dipeptídeo
351 provavelmente é resistente à proteases, devido à presença de uma única ligação peptídica.

352 Kerridge et al. (2005) estudaram a atividade antimicrobiana sobre MRSA de frações
353 moleculares da NES produzida por larvas de *L. sericata* obtidas por filtração sequencial em
354 filtros Amicon Centricons (MWCO 50, 30, 10, 5 e 3 kDa). Todos os filtrados obtidos
355 apresentaram atividade sobre MRSA, assim como os retentados dos filtros de 10 e 5 kDa,
356 indicando a presença de pelo menos um agente antibacteriano com maior massa molecular. A
357 eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio usando géis de alta densidade,
358 apropriados para a separação de peptídeos, mostrou numerosas bandas de baixo peso
359 molecular sugerindo a presença de peptídeos antibacterianos, como os já descritos em outras
360 espécies de insetos. O primeiro peptídeo antibacteriano de inseto foi identificado na hemolinfa

361 de pupas da mariposa da cecropia (Steiner et al. 1981). Esse peptídeo com 37 aminoácidos
362 possui ação antimicrobiana contra várias bactérias Gram-negativas, incluindo *E. coli* e *P.*
363 *aeruginosa*. Posteriormente a essa descoberta, um grande número de peptídeos pertencentes
364 ao grupo da defensinas foi descrito. Com uma massa molecular inferior a 5 kDa, esses
365 peptídeos possuem uma maior atividade contra bactérias Gram-positivas e limitada ação
366 contra Gram-negativas. Essas características são muito parecidas aos peptídeos presentes na
367 fração de baixo peso molecular obtido a partir da NES de *L. sericata* nesse estudo.

368 O fracionamento molecular sequencial da NES de *L. sericata* foi novamente
369 empregado por Bexfield et al. (2008), seguindo a mesma metodologia descrita pelos autores
370 no estudo de 2004. A fração de NES < 500 Da apresentou ação antimicrobiana sobre bactérias
371 Gram positivas e negativas, sendo que *Bacillus subtilis* e *Klebsiella pneumoniae* apresentaram
372 a maior susceptibilidade, enquanto *P. mirabilis* e *S. epidermidis* apresentaram uma maior
373 resistência. A NES < 500 Da também inibiu de forma eficaz dez de doze amostras de MRSA
374 testadas sendo, entretanto, as duas amostras não inibidas por essa fração susceptíveis a NES
375 sem fracionamento.

376 ***Métodos complexos de fracionamento molecular***

377 Em um estudo realizado por Kruglikova and Chernysh (2011), foram obtidos
378 inicialmente os compostos hidrofóbicos da NES produzida por larvas de *L. sericata*. O
379 emprego desses compostos teve como base um estudo prévio dos mesmos autores, que
380 caracterizou os peptídeos antimicrobianos de insetos identificados como hidrofóbicos. Após
381 sua extração com cartuchos Waters Sep-Pak Vac 20 cc com solvente C18, foi realizado o
382 fracionamento com uso de cromatografia líquida de alto desempenho de fase reversa,
383 selecionada por sua alta eficiência em separar peptídeos. As frações cromatográficas foram
384 secas a vácuo, dissolvidas em água e testadas pelo método da placa de ágar com orifício. A

385 fração correspondente a 30-31% de acetonitrila apresentava ação em *M. luteus* e a 32-34% em
386 *E. coli*. Essas frações foram submetidas à espectrometria de massa com ionização por
387 “eletrospray” (ESI) e ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a
388 espectrometria de massa de tempo de voo (MALDI-TOF). A fração que atuava em *M. luteus*
389 possuía compostos com baixa massa molecular (129 a 700 Da) e dois peptídeos (6466 e 6633
390 Da). A fração com ação sobre *E. coli* possuía compostos com baixa massa molecular (174 a
391 904 Da) e peptídeos com massas moleculares de 1014, 1128, 1269, 5772, 8631, 8882, e 9025
392 Da. Em estudos anteriores com a hemolinfa de *C. vicina*, Chernysh et al. (2000) também já
393 haviam identificado, respectivamente, defensinas na fração de 30 a 31% de acetonitrila e
394 dipterocinas na fração 30-35% de acetonitrila (massa molecular de 8886,2 e 9029,1 Da) sendo
395 observada, nesta última, uma grande similaridade com as massas descritas em *L. sericata*
396 (8882 e 9025 Da).

397 CONCLUSION

398 Os resultados encontrados sugerem que o pH da NES poderia ser utilizado como um
399 marcador de atividade antimicrobiana, uma vez que o pH alcalino poderia ser um indicador da
400 presença de maiores quantidades de compostos antimicrobianos na NES. Complementarmente
401 a esse marcador, a análise da atividade proteolítica da NES utilizando teste da gelatinase ou de
402 atividade lítica sobre *M. lysodeikticus* também poderiam ser bons parâmetros para avaliação
403 da NES. Por fim, o jejum larval antes da extração, a concentração da NES após a extração e o
404 doseamento de proteínas seriam estratégias para aprimorar os estudos da sua atividade
405 antimicrobiana.

406 O estudo contribui para a enfermagem na medida em que a Organização Mundial de
407 Saúde considerou urgente o desenvolvimento de novas drogas capazes de combater infecções
408 causadas por bactérias multirresistentes, uma causa importante de mortes e enorme impacto

409 econômico para os sistemas de saúde. Nesse sentido, a NES e seus produtos, como os AMP
410 usados de forma conjunta (complexo de AMP) têm sido apontados como substâncias
411 promissoras para esse enfrentamento, pela baixa probabilidade da ocorrência de resistência
412 bacteriana ao complexo de peptídeos antimicrobianos.

413

414 REFERENCES

- 415 **Alnaimat, S. M., M. Wainwright, and S. H. Aladaileh. 2013.** An Initial in Vitro
416 Investigation into the Potential Therapeutic Use of *Lucilia Sericata* Maggot to Control
417 Superficial Fungal Infections. *Jordan J. Biol. Sci.* 6: 137–142.
- 418 **Andersen, A. S., D. Sandvang, K. M. Schnorr, T. Kruse, S. Neve, B. Joergensen, T.**
419 **Karlsmark, and K. A. Krogfelt. 2010.** A novel approach to the antimicrobial activity of
420 maggot debridement therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 1646–1654.
- 421 **Baer, W. S. 2011.** The Classic: The Treatment of Chronic Osteomyelitis With the Maggot
422 (Larva of the Blow Fly). *Clin. Orthop. Relat. Res.* 469: 920–944.
- 423 **Barnes, K. M., R. A. Dixon, and D. E. Gennard. 2010.** The antibacterial potency of the
424 medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): Variation in laboratory evaluation. *J. Microbiol.*
425 *Methods.* 82: 234–237.
- 426 **Barnes, K. M., D. E. Gennard, and R. A. Dixon. 2010.** An assessment of the antibacterial
427 activity in larval excretion/secretion of four species of insects recorded in association with
428 corpses, using *Lucilia sericata* Meigen as the marker species. *Bull. Entomol. Res.* 100: 635–
429 640.
- 430 **Bexfield, A., Y. Nigam, S. Thomas, and N. A. Ratcliffe. 2004.** Detection and partial
431 characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal
432 maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

433 (MRSA). *Microbes Infect.* 6: 1297–1304.

434 **Bexfield, A., A. E. Bond, E. C. Roberts, E. Dudley, Y. Nigam, S. Thomas, R. P. Newton,**
435 **and N. A. Ratcliffe. 2008.** The antibacterial activity against MRSA strains and other bacteria
436 of a <500Da fraction from maggot excretions/secretions of *Lucilia sericata* (Diptera:
437 Calliphoridae). *Microbes Infect.* 10: 325–333.

438 **Bohova, J., J. Majtan, V. Majtan, and P. Takac. 2014.** Selective Antibiofilm Effects of
439 *Lucilia sericata* Larvae Secretions/Excretions against Wound Pathogens. Evidence-Based
440 Complement. *Altern. Med.* 2014: 1–9.

441 **Butler, A., H. Hall, and B. Copnell. 2016.** A Guide to Writing a Qualitative Systematic
442 Review Protocol to Enhance Evidence-Based Practice in Nursing and Health Care.
443 *Worldviews Evidence-Based Nurs.* 13: 241–249.

444 **Cazander, G., K. E. B. van Veen, A. T. Bernards, and G. N. Jukema. 2009.** Do maggots
445 have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different
446 bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *J. Tissue*
447 *Viability.* 18: 80–87.

448 **Cazander, G., K. E. B. van Veen, L. H. Bouwman, A. T. Bernards, and G. N. Jukema.**
449 **2009.** The Influence of Maggot Excretions on PAO1 Biofilm Formation on Different
450 Biomaterials. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467: 536–545.

451 **Chaiwong, T., T. Srivoramas, P. Sebsumran, M. Panya, S. Wanram, and P. Panomket.**
452 **2016.** Antibacterial Activity of Excretions-Secretions from *Chrysomya megacephala* Against
453 *Escherichia coli*. *J. Med. Assoc. Thai.* 99 Suppl 1: S7-11.

454 **Chambers, L., S. Woodrow, A. P. Brown, P. D. Harris, D. Phillips, M. Hall, J. C. T.**
455 **Church, and D. I. Pritchard. 2003.** Degradation of extracellular matrix components by
456 defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical

457 debridement of non-healing wounds. Br. J. Dermatol. 148: 14–23.

458 **Chernysh, S. I., N. A. Gordja, and N. P. Simonenko. 2000.** Diapause and Immune
459 Response: Induction of Antimicrobial Peptides Synthesis in the Blowfly, *Calliphora vicina*
460 R.-D. (Diptera: Calliphoridae). Entomological Sci. 3: 139–144.

461 **Dallavecchia, D. L., B. N. Proença, and V. M. A. Coelho. 2011.** BIOTERAPIA: UMA
462 ALTERNATIVA EFICIENTE PARA O TRATAMENTO DE LESÕES CUTÂNEAS. Rev.
463 Pesqui. Cuid. é Fundam. Online. 3: 2071–2079.

464 **Díaz-Roa, A., M. A. Gaona, N. A. Segura, D. Suárez, M. A. Patarroyo, and F. J. Bello.**
465 **2014.** *Sarconesiopsis magellanica* (Diptera: Calliphoridae) excretions and secretions have
466 potent antibacterial activity. Acta Trop. 136: 37–43.

467 **Elmorsy, R., A. Bream, and M. Abdel-Samad. 2020.** Antibacterial Activities of *Chrysomya*
468 *albiceps* Maggots' Extracts (Diptera: Calliphoridae). Egypt. Acad. J. Biol. Sci. A, Entomol.
469 13: 99–104.

470 **Evans, R., E. Dudley, and Y. Nigam. 2015.** Detection and partial characterization of
471 antifungal bioactivity from the secretions of the medicinal maggot, *Lucilia sericata*. Wound
472 Repair Regen.

473 **Fonseca-Muñoz, A., R. Pérez-Pacheco, B. O. Ortega-Morales, M. Reyes-Estebanez, A.**
474 **Vásquez-López, M. Chan-Bacab, J. Ruiz-Vega, and C. A. Granados-Echegoyen. 2019.**
475 Bactericidal Activity of *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera:
476 Calliphoridae) Larval Excretions–Secretions Against *Staphylococcus aureus* (Bacillales:
477 Staphylococcaceae). J. Med. Entomol. 56: 1598–1604.

478 **Ghada, M. E. B., and G. S. J. John. 2016.** In vitro antimicrobial activity of maggot
479 excretions/secretions of *Sarcophaga* (*Liopygia*) *argyrostoma* (Robineau-Desvoidy). African J.
480 Microbiol. Res. 10: 1036–1043.

Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: Journal of Medical Entomology

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

481 **Harris, L. G., A. Bexfield, Y. Nigam, H. Rohde, N. A. Ratcliffe, and D. Mack. 2009.**
482 Disruption of Staphylococcus Epidermidis Biofilms by Medicinal Maggot Lucilia Sericata
483 Excretions/Secretions. *Int. J. Artif. Organs.* 32: 555–564.

484 **Jaklič, D., A. Lapanje, K. Zupančič, D. Smrke, and N. Gunde-Cimerman. 2008.** Selective
485 antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J. Med. Microbiol.* 57: 617–
486 625.

487 **Jiang, K., X. Sun, W. Wang, L. Liu, Y. Cai, Y. Chen, N. Luo, J. Yu, D. Cai, and A.**
488 **Wang. 2012.** Excretions/Secretions from Bacteria-Pretreated Maggot Are More Effective
489 against Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *PLoS One.* 7: e49815.

490 **Kerridge, A., H. Lappin-Scott, and J. R. Stevens. 2005.** Antibacterial properties of larval
491 secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med. Vet. Entomol.* 19: 333–337.

492 **Kruglikova, A. A., and S. I. Chernysh. 2011.** Antimicrobial compounds from the excretions
493 of surgical maggots, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera, Calliphoridae). *Entomol. Rev.* 91:
494 813–819.

495 **Lima, T. L. D. 2013.** Caracterização molecular de duas populações de *Chrysomya*
496 *megacephala* (Diptera: Calliphoridae) do Estado de Pernambuco, Brasil.

497 **Lourenço, T. M., M. H. Lenardt, D. F. Kletemberg, M. D. Seima, A. E. C. Tallmann, and**
498 **D. K. M. Neu. 2012.** Capacidade funcional no idoso longevo: uma revisão integrativa. *Rev.*
499 *Gaúcha Enferm.* 33: 176–185.

500 **Masiero, F. S., M. F. K. Aquino, M. P. Nassu, D. I. B. Pereira, D. S. Leite, and P. J.**
501 **Thyssen. 2017.** First Record of Larval Secretions of *Cochliomyia macellaria* (Fabricius,
502 1775) (Diptera: Calliphoridae) Inhibiting the Growth of *Staphylococcus aureus* and
503 *Pseudomonas aeruginosa*. *Neotrop. Entomol.* 46: 125–129.

504 **Messer, F. C., and R. H. McClellan. 1935.** Surgical maggots. A study of their functions in

Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: Journal of Medical Entomology

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

505 wound healing. *J. Lab. Clin. Med.* 20: 1219–1226.

506 **Neves, D. P. 2005.** *Parasitologia Humana*, 11th ed. Atheneu, São Paulo.

507 **Pavillard, E. R., and E. A. Wright. 1957.** An Antibiotic from Maggots. *Nature*. 180: 916–

508 917.

509 **Pickles, S. F., and D. I. Pritchard. 2017.** Quality control of a medicinal larval (*Lucilia*

510 *sericata*) debridement device based on released gelatinase activity. *Med. Vet. Entomol.* 31:

511 200–206.

512 **van der Plas, M. J. A., A. M. van der Does, M. Baldry, H. C. M. Dogterom-Ballering, C.**

513 **van Gulpen, J. T. van Dissel, P. H. Nibbering, and G. N. Jukema. 2007.** Maggot

514 excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes*

515 *Infect.* 9: 507–14.

516 **van der Plas, M. J. A., G. N. Jukema, S.-W. Wai, H. C. M. Dogterom-Ballering, E. L.**

517 **Legendijk, C. van Gulpen, J. T. van Dissel, G. V. Bloemberg, and P. H. Nibbering. 2007.**

518 Maggot excretions/secretions are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus*

519 *aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 61: 117–122.

520 **Ratcliffe, N. A., C. B. Mello, E. S. Garcia, T. M. Butt, and P. Azambuja. 2011.** Insect

521 natural products and processes: New treatments for human disease. *Insect Biochem. Mol.*

522 *Biol.* 41: 747–769.

523 **Ratcliffe, N. A., C. S. Vieira, P. M. Mendonça, R. L. Caetano, M. M. de C. Queiroz, E. S.**

524 **Garcia, C. B. Mello, and P. Azambuja. 2015.** Detection and preliminary physico-chemical

525 properties of antimicrobial components in the native excretions/secretions of three species of

526 *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. *Acta Trop.* 147: 6–11.

527 **Sherman, R. A., M. J. R. Hall, and S. Thomas. 2000.** Medicinal Maggots: An Ancient

528 Remedy for Some Contemporary Afflictions. *Annu. Rev. Entomol.* 45: 55–81.

Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: *Journal of Medical Entomology*

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

- 529 **Sherman, R. A. 2002.** Maggot versus conservative debridement therapy for the treatment of
530 pressure ulcers. *Wound Repair Regen.* 10: 208–214.
- 531 **Silva, S. M. da, R. M. Millions, R. de C. Almeida, and J. E. da Costa. 2020.** Terapia larval
532 sob a ótica do paciente. *ESTIMA, Brazilian J. Enteros. Ther.*
- 533 **Simmons, S. W. 1935a.** The bactericidal Properties of Excretions of the Maggot of *Lucilia*
534 *sericata*. *Bull. Entomol. Res.* 26: 559–563.
- 535 **Simmons, S. W. 1935b.** A Bactericidal Principle in Excretions of Surgical Maggots which
536 Destroys Important Etiological Agents of Pyogenic Infections. *J. Bacteriol.* 30: 253–267.
- 537 **Souza, A. C. de, and M. dos S. Alvarenga. 2016.** Insatisfação com a imagem corporal em
538 estudantes universitários – Uma revisão integrativa. *J. Bras. Psiquiatr.* 65: 286–299.
- 539 **Souza, M. T. de, M. D. da Silva, and R. de Carvalho. 2010.** Integrative review: what is it?
540 How to do it? *Einstein (São Paulo).* 8: 102–106.
- 541 **Steen Voorde, P., and G. N. Jukema. 2004.** The antimicrobial activity of maggots: in-vivo
542 results. *J. Tissue Viability.* 14: 97–101.
- 543 **Steiner, H., D. Hultmark, Å. Engström, H. Bennich, and H. G. Boman. 1981.** Sequence
544 and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature.* 292: 246–
545 248.
- 546 **Tantawi, T. ., Y. . Gohar, M. . Kotb, F. . Beshara, and M. . El-Naggar. 2007.** Clinical and
547 microbiological efficacy of MDT in the treatment of diabetic foot ulcers. *J. Wound Care.* 16:
548 379–383.
- 549 **Thomas, S., A. M. Andrews, N. P. Hay, and S. Bourgoise. 1999.** The anti-microbial activity
550 of maggot secretions: results of a preliminary study. *J. Tissue Viability.* 9: 127–132.
- 551 **Ursi, E. S., and C. M. Gavão. 2006.** Prevenção de lesões de pele no perioperatório: revisão
552 integrativa da literatura. *Rev. Lat. Am. Enfermagem.* 14: 124–131.

Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: *Journal of Medical Entomology*

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

553 Tabela 1. Número de artigos recuperados e selecionados pelo título a partir das estratégias de
 554 buscas dos descritores combinados com os operadores booleanos nas bases de dados

Base de Dados	Estratégia de Busca	Total (n)	Selecionados pelo Título (n)
PubMed	((calliphoridae) OR (larva*) OR (blow-fl*)) AND ((anti-bacterial agent*) OR (microbial sensitivity test*)) Filters: Full text, English, Portuguese, Spanish, from 1931/1/1 - 2021/11/13	1234	86
Scielo	((calliphoridae) AND ((larva*) OR (blow-fl*)) AND ((anti-bacterial agent*) OR (microbial sensitivity test*)) Filters: Full text, English, Portuguese, Spanish, from 1931/1/1 - 2021/11/13	0	0
Web of Science	((ALL=calliphoridae) OR (ALL=larva) OR (ALL=blow-fly)) AND ((ALL=anti-bacterial agent) OR (ALL=microbial sensitivity test))	9	0

555

556

557

558

559

560

561

Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: Journal of Medical Entomology

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

Base de Dados	Estratégia de Busca	Total (n)	Selecionados pelo Título (n)
Scopus	(((calliphoridae) OR (blow-fl*)) AND (larva*) AND ((anti-bacterial AND agent*) OR (microbial sensitivity test*))) AND (LIMIT-TO (PUBSTAGE , "final")) AND (LIMIT-TO (LANGUAGE , "English") OR LIMIT-TO (LANGUAGE , "Spanish") OR LIMIT-TO (LANGUAGE , "Portuguese"))	201	53
Total		1444	139

562

Fonte: autores (2021)

563 Tabela 2. Estudos empregando metodologia de extração da excreção/secreção das larvas
564 baseada na técnica de Bexfield et al. (2004)

Autores	Estado	Extrator	Proporção Larvas (unit ou g) / Extrator	Condições de Extração
Bexfield et al. (2004)	Estétil	Mili-Q UW	1 g / 200 µL	1 h a 30°C no escuro
Kerridge et al. (2005)	Descontaminação com etanol 70%	ddH2O	100 / 10 mL	Durante a noite a 25°C
van der Plas, Jukema, et al. (2007), van der Plas, van der Does, et al. (2007)	Estétil	Mili-Q UW	50 / 200 µl	1 h a temperatura ambiente no escuro

565

Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: Journal of Medical Entomology

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

Autores	Estado	Extrator	Proporção Larvas (unit ou g) / Extrator	Condições de Extração
Cazander, van Veen, Bernards, et al. (2009), Cazander, van Veen, Bouwman, et al. (2009)	Estéril	<i>Saline</i>	400 L1 para 100 µL 200 L3 para 100 µl	1 h a 35°C no escuro
Andersen et al. (2010)	Estéril	Mili-Q UW	300 L1 para 200 µL 400 L2 para 200 µL	1 h a 30°C no escuro
Barnes, Dixon, et al. (2010)	Não estéril	ddH2O	1 a 4 g / 1 ml	1 h a 30°C
Kruglikova and Chernysh (2011)	Não estéril	dH2O	150-200 g / 50 mL	30 min
Jiang et al. (2012)	Estéril	<i>Saline</i>	Não cita	1 h a 37°C no escuro
Alnaimat et al. (2013)	n.c.	Mili-Q UW	10 g / 4 mL	Durante a noite a 25°C
Díaz-Roa et al. (2014)	Descontaminação com formaldeído e hipoclorito	PBS	200 / 2 mL	1 h a 25°C
Ratcliffe et al. (2015)	Jejum de 18-24 h	Mili-Q UW	1 g / 100 µL	1 h a 37°C
Evans et al. (2015)	Estéreis	Mili-Q UW	1 g / 200 µL	1 h a 30°C no escuro
Ghada and John (2016)	Descontaminação com formaldeído e álcool	PBS 7.2	200 / 2 mL	1 h a 27°C no escuro

Autores	Estado	Extrator	Proporção Larvas (unit ou g) / Extrator	Condições de Extração
Chaiwong et al. (2016)	Descontaminação com álcool	ddH ₂ O	100 / 200 µL	1 h a 30°C
Masiero et al. (2017)	Descontaminação com álcool	dH ₂ O	25 / 800 µL	1 h a 37°C no escuro
Fonseca-Muñoz et al. (2019)	Descontaminação com formaldeído e hipoclorito	<i>Saline</i>	≈1500 / 6 mL	1 h a 37°C no escuro
Elmorsy et al. (2020)	Descontaminação com álcool	PBS	100 / 200 µL	6 h a 25°C no escuro

567 Legenda: Mili-Q UW: Milli-Q *ultrapure water*; dH₂O: água destilada; ddH₂O: água deionizada; *saline*: solução
568 de cloretode sódio a 0.9%.; PBS: tampão fosfato-salino; n.c.: não citado.

569 Fonte: autores (2021)

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

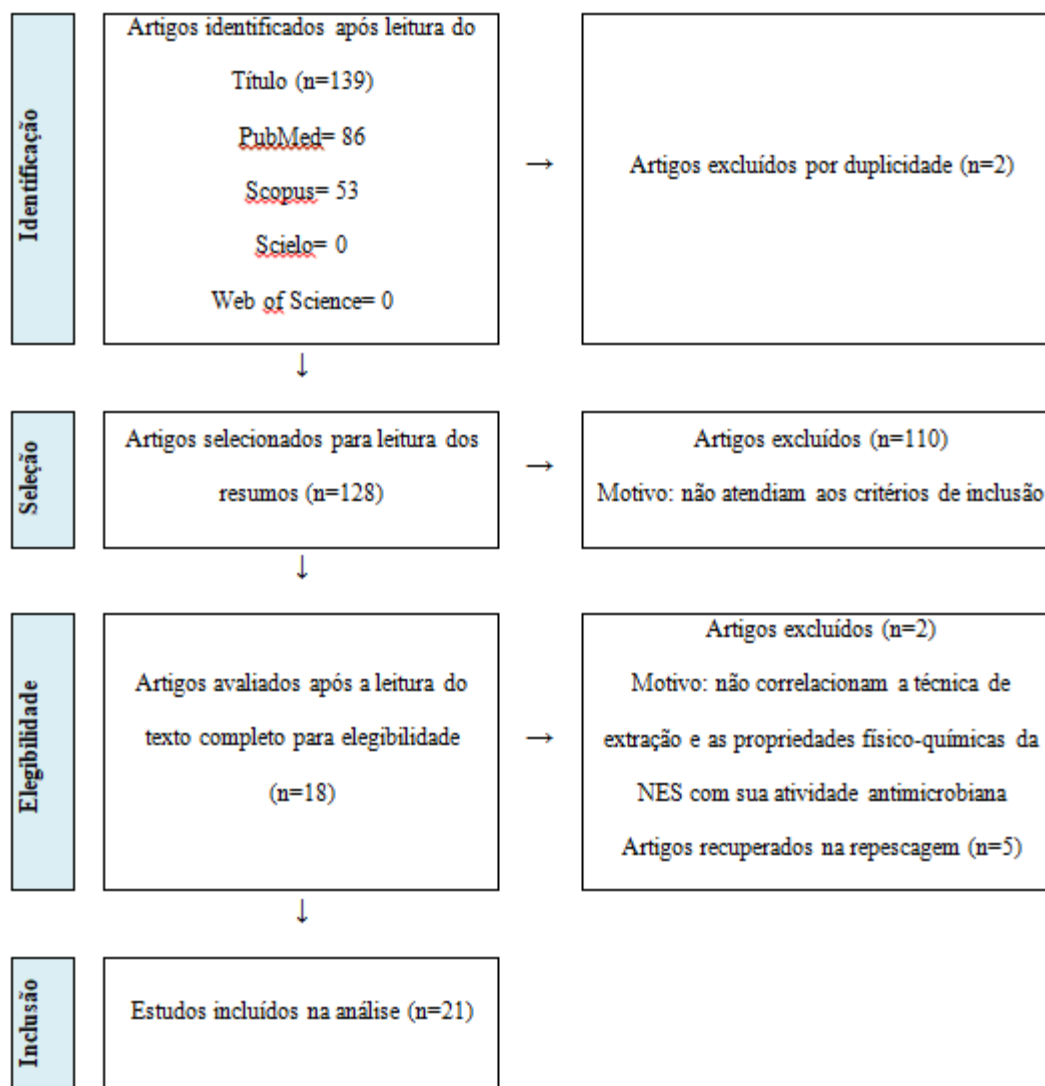
Indicação de Avaliador: Profª. Drª. Valéria Magalhães Aguiar (DMP/IB/UNIRIO)

Contato: valeria@unirio.br

Revista: Journal of Medical Entomology

Normas para submissão: https://academic.oup.com/jme/pages/Manuscript_Preparation#Article%20Types

582 Figura 1. Fluxograma de seleção de artigos baseado no PRISMA (Principais Itens para
 583 Relatar Revisões Sistemáticas e Meta-análises)



584

585

Fonte: autores (2021)