

Pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) crioconservadas em soluções de glicerol e dimetil sulfóxido como substrato de criação de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera, Pteromalidae)

Claudia Cristina Gúlias-Gomes<sup>1,2</sup>  
Cleber Oliveira Soares<sup>3</sup>  
Eliane Maria Vieira Milward-de-Azevedo<sup>1</sup>

**CHRYSOMYA MEGACEPHALA  
(FABRICIUS, 1794) PUPAE (DIPTERA,  
CALLIPHORIDAE) CRYOPRESERVED  
IN GLYCEROL AND DIMETHYL  
SULFOXIDE AS REARING SUBSTRACT  
OF NASONIA VITRIPENNIS  
(WALKER, 1836) (HYMENOPTERA,  
PTEROMALIDAE)**

**ABSTRACT:** Substances glycerol and dimethyl sulfoxide (DMSO) were evaluated as cryoprotective in the storage of the *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) pupae at low temperatures. It were investigated five concentrations (0.1, 1, 2, 3 and 4 mol.) at -20 °C (freezer) and -196 °C (fase liquid of the liquid nitrogen- LN). Control groups were constituted by non-frozen pupae (fresh) and

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia Animal/ IV, UFRRJ, CEP 23 890 000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. [emilward@terenet.com.br](mailto:emilward@terenet.com.br)

<sup>2</sup>Doutoranda em Medicina Veterinária - Parasitologia Veterinária, UFRRJ, [guliasgomes@yahoo.com.br](mailto:guliasgomes@yahoo.com.br) /Bolsista Capes

<sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Corte, Caixa postal 154, Campo Grande, 79002 970, Mato Grosso do Sul.

Pupas de  
*Chrysomya*  
*megacephala*  
(Fabricius, 1794)  
(Diptera,  
Calliphoridae)  
crioconservadas  
em soluções  
de glicerol  
e dimetil  
sulfóxido  
como  
substrato  
de criação  
de *Nasonia*  
*vitripennis*  
(Walker,  
1836)  
(Hymenoptera,  
Pteromalidae)

pupae freezing only with phosphate buffer saline (PBS). Information was obtained about the reproductive performance of *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) matrices reared on these pupae. These analyses revealed rates of parasitoidism efficiency lower than 3 % at glycerol NL (3 and 4 mol) and DMSO Freezer (0.1, 2, 3 and 4 mol). There were not emergence in the frozen pupae belong to DMSO NL and glycerol NL – PBS; 0.1, 1 and 2 mol. The freezing with glycerol at – 20°C showed better rates of parasitoidism efficiency than others groups. Methods used in this work with cryoprotectives glycerol and DMSO were ineffective in the cryopreservation of *C. megacephala* pupae when compared with others works. The influence of biotics and non-biotics facts were discussed.

**Key Words:** Cryopreservation; *Chrysomya megacephala*; *Nasonia vitripennis*; vector control, rearing methods.

## INTRODUÇÃO

A aplicação prática da teoria da criopreservação pode hoje ser acompanhada em diversas áreas da ciência como, por exemplo, na estocagem de células, tecidos e embriões humanos (HARDY, 1979, AHMA & CHAUDHRY, 1980, KASHIWAZAKI *et al.*, 1991, ARMIGER, 1993; POITRAS *et al.*, 1994; SAHA *et al.*, 1994). A constituição de bancos de larvas de endoparasitos permite atualmente a redução do número de animais hospedeiros utilizados na manutenção de isolados, objetivando estudos bioquímicos, epidemiológicos, imunológicos e genéticos (MANGOLD *et al.* 1990; VAN WYK *et al.* 1990; ARAÚJO *et al.* 1993; GILL & REDWIN 1995). Da mesma forma, a criopreservação de células tem facilitado o processo de passagens para a manutenção de colônias (BENCHIMOL *et al.* 1996). No entanto, nem sempre é necessário manter a vitalidade do material após degelo. É possível objetivar apenas a conservação das características morfológicas do material e das propriedades físicas e bioquímicas. O processo empregado é conhecido como crioconservação. A conservação de hospedeiros para a produção de vespas parasitóides visando sua inclusão em programas de controle biológico aplica-

do (CORRÊA-FERREIRA & OLIVEIRA, 1998), assunto alvo do presente estudo, é um exemplo prático.

A eficiência do emprego de pteromalídeos no controle de muscóides vetores é periodicamente confirmada (MORGAN *et al.*, 1976; MORGAN, 1980; GEDEN *et al.*, 1992; GIBSON *et al.*, 2000). Entretanto, a criação em larga escala de microhimenópteros parasitóides exige o aperfeiçoamento de técnicas que viabilizem a sua produção contínua. A estocagem de alguns insetos hospedeiros em baixas temperaturas, como forma de provisão dietética, tem sido testada com êxito. KLUNKER (1982) relatou que a eficiência do parasitoidismo de *Muscidifurax raptor* Girault and Sanders, 1910 (Hymenoptera: Pteromalidae), em pupas de *Musca domestica* Linnaeus, 1758, foi mantida após o congelamento das pupas a  $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ , durante 53 semanas. Utilizando temperaturas entre  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , KLUNKER & FABRITIUS (1992) conseguiram resultados satisfatórios na manutenção de estoques de *M. raptor*, *Muscidifurax zaraptor* Kogan & Legner 1970 e *Urolepis maritima* Walker 1834 (Hymenoptera: Pteromalidae). No entanto, em alguns casos observa-se o comprometimento da taxa reprodutiva do microhimenóptero (KLUNKER, 1982; MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO, 1996). As alterações morfobioquímicas e físicas ocorridas no interior de pupários submetidos a baixas temperaturas estão relacionadas à alterações qualitativas e quantitativas do substrato utilizado como fonte de alimentação e, conseqüentemente, ao desempenho dos espécimens.

A exposição de células a temperaturas inferiores a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  acarreta o congelamento da água incluída em sua composição. A formação de cristais de gelo poderá causar injúrias mecânicas aos componentes celulares. Como resultado da indisponibilidade de moléculas de água ocorre concentração eletrolítica, seguida ou não de uma desidratação celular (LOVELOCK, 1954; MAZUR *et al.*, 1972; HARDY, 1979). Procurando identificar estratégias para minimizar os efeitos nocivos advindos do processo de congelamento, descobriu-se os chamados crioprotetores. Estes aditivos, além da propriedade de abaixar o ponto de congelamento da água, podem aumentar o ponto de superesfriamento da mesma e/ou remover núcleos de cristalização (HARDY, 1979; MUTETWA & JAMES, 1985; FRIEDLER *et al.*, 1988). Pode-se citar como principais crioprotetores: glicerol, dimetil sulfóxido

Pupas de  
*Chrysomya*  
*megacephala*  
(Fabricius, 1794)  
(Diptera,  
Calliphoridae)  
crioconservadas  
em soluções  
de glicerol  
e dimetil  
sulfóxido  
como  
substrato  
de criação  
de *Nasonia*  
*vitripennis*  
(Walker,  
1836)  
(Hymenoptera,  
Pteromalidae)

(DMSO), dextrana, etileno-glicol, etanol, polivinilpirrolidona e sacarose. O glicerol ( $C_3H_8O_3$ ; PM= 92,09) apresenta-se na forma viscosa incolor, com pouco ou nenhum odor, miscível em água e com ação desidratante. É encontrado naturalmente em algumas espécies de insetos habitantes de regiões de frio intenso, o que confirma sua propriedade protetora (SALT, 1958; LEATHER *et al.*, 1995; RIVERS *et al.*, 2000). Dimetil sulfóxido ( $C_2H_6OS$ ; PM= 78,13) é um produto natural do metabolismo lipídico de mamíferos (HARDY, 1979), solúvel em água, incolor, mas com odor ativo. POLGE *et al.* (1949) foram os primeiros pesquisadores a testarem a ação crioprotetora do glicerol. Já o dimetil sulfóxido foi testado dez anos mais tarde, por LOVELOCK & BISHOP (1989) ao congelarem eritrócitos e espermatozóides de bovinos. Desde então, estes são os crioprotetores mais utilizados em técnicas de congelamento.

De acordo com CALLOW & FARRANT (1973) e FRIDLER *et al.* (1988), além da velocidade de congelamento, constituem-se pontos críticos no processo de congelamento a concentração e tempo de equilíbrio utilizados para o crioprotetor (quando utilizados), estabilidade da temperatura de armazenagem, velocidade de descongelamento e diluição ou remoção do aditivo protetor. Desta forma, os protocolos de congelamento têm sido determinados por meio de testes sucessivos e a descoberta do parâmetro ideal de cada fase resultará no sucesso do objetivo final. Trabalhos mais recentes têm investigado a cinética da formação de cristais de gelo em soluções aquosas na presença destes crioprotetores (HEY & Mac FARLANE, 1998; MURTHEY, 1998).

O sucesso da criopreservação de protozoários, larvas de helmintos, embriões e outras formas celulares, utilizando-se o glicerol e dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotetores, estimulou a inclusão destas substâncias no estudo que monitora processos de congelamento de pupas muscóides. Utilizou-se, como modelo experimental, a espécie necrobiontófaga *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), objetivando a otimização futura de criações em média e larga escala de *Nasonia vitripennis* Walker, 1836 (Hymenoptera: Pteromalidae), em pupas muscóides inviabilizadas. Pteromalídeo gregário e de fácil criação em cativeiro, apresenta-se como agente de controle alternativo e complementar de muscóides vetores.

## MATERIAL E MÉTODOS

Claudia  
Cristina  
Gullias-Gomes  
Cleber Oliveira  
Soares  
Eliane Maria  
Vieira  
Milward-  
de-Azevedo

Os estoques de *C. megacephala* e de *N. vitripennis* foram estabelecidos e mantidos de acordo com metodologia proposta por CARDOSO & MILWARD-DE-AZEVEDO (1996). A carne eqüina que caracterizava a dieta das larvas muscóides era, entretanto, descongelada no dia da preparação das etapas experimentais. Realizou-se o registro da massa corporal das pupas de *C. megacephala*, de segunda e terceira geração e com idade aproximada de 24 horas, antes de submetê-las ao congelamento. Procedeu-se da mesma forma com as pupas frescas, com a mesma idade, momentos antes de sua exposição às fêmeas de *N. vitripennis* (geração: 27<sup>a</sup> - 30<sup>a</sup>). O registro foi feito em lotes constituídos por cinco pupas.

Os crioprotetores glicerol (Vetec®, cód. 123) e dimetil sulfóxido (Vetec®, cód. 347), disponibilizados em diferentes concentrações, foram empregados nas temperaturas de armazenamento de - 20 °C (freezer) e - 196 °C (fase líquida do nitrogênio líquido). Os aditivos foram diluídos em tampão salino fosfatado (PBS), pH 7,4 nas concentrações finais de 0,1; 1; 2; 3 e 4 molar.

Os ensaios foram realizados em etapas sucessivas: (1) congelamento de pupas em NL, com soluções de glicerol (grupo glicerol - NL); (2) congelamento em NL, com soluções de DMSO (grupo DMSO-NL); (3) congelamento em freezer, com soluções de glicerol (grupo glicerol-freezer) e (4) congelamento em freezer, com soluções de DMSO (grupo DMSO-freezer). Pupas congeladas em solução diluente (sem crioprotetor) e pupas não submetidas ao congelamento (pupas frescas) formaram os grupos controle de cada etapa. Cada tratamento constou de três repetições; utilizaram-se 30 pupas de *C. megacephala* por repetição.

As pupas muscóides foram acondicionadas em frascos plásticos, com capacidade de 5 ml (*Criogenic vials*®), em grupos de 30. Os recipientes foram preenchidos até a borda com a solução correspondente ao tratamento e vedados com tampa de rosca e parafilme. As amostras permaneceram a temperatura ambiente cerca de 15 minutos antes da alocação na respectiva temperatura de estocagem. Sete dias após o armazenamento, o material foi recolhido e mantido em temperatura ambiente até obter-

Rev. bras.  
Zooiciências  
Juiz de Fora  
V. 5 N° 1  
Jul/2003  
p. 101-120

se o degelo total (em média, 30 minutos). Os pupários foram submetidos a quatro banhos em água destilada e deionizada, secos em papel toalha e mantidos a temperatura de 30 °C durante 30 minutos, antes da exposição às matrizes parasitóides.

Fêmeas de *N. vitripennis*, com aproximadamente 24 horas de idade, previamente alimentadas com mel e água destilada, *ad libitum*, foram transferidas para frascos de vidro transparentes (9 cm de diâmetro x 16 cm de altura). A exposição ao parasitoidismo foi realizada durante o intervalo de 72 horas, sob condições de laboratório. As fêmeas matrizes foram subseqüentemente descartadas. Estabeleceu-se a relação de duas pupas muscóides:fêmea parasitóide.

A temperatura e a umidade relativa foram monitoradas no laboratório através de um termohigrógrafo. Não houve controle de fotoperíodo. Os índices de nebulosidade local foram obtidos no Posto da Estação Experimental de Seropédica – PESAGRO – RJ.

Após a exposição, as pupas hospedeiras foram individualizadas em tubos de ensaio e mantidas em câmara climatizada regulada a 27 °C de temperatura, 65 ± 10 % de UR e 14 horas de fotofase. Aguardou-se a morte de todos os microhimenópteros que emergiram para proceder-se o inventário. Os pupários muscóides foram monitorados até 21 dias após início de emergência dos parasitóides; em seguida, foram dissecados visando o registro de pteromalídeos tardios.

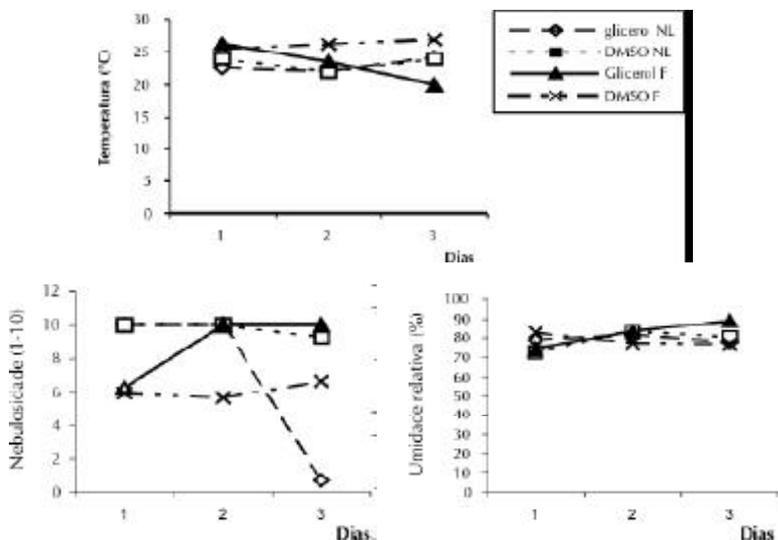
Procedeu-se a análise descritiva gráfica e interpretativa dos resultados obtidos. A Análise de Variância seguida do teste de significância Tukey-Kramer foi utilizada visando a comparação entre as médias das massas corporais das pupas jovens de *C. megacephala* incluídas nas parcelas de cada grupo experimental. Procedeu-se a correlação de Pearson com o objetivo de especular sobre a possível influência do tamanho dos pupários de *C. megacephala* sobre a atividade reprodutiva de *N. vitripennis*.

Entendeu-se como sucesso do parasitoidismo e taxa de pupários eficientes o número ou percentual de pupas muscóides frescas ou crioconservadas que permitiram a emergência de adultos parasitóides.

# RESULTADOS

Claudia  
Cristina  
Gulias-Gomes  
Cleber Oliveira  
Soares  
Eliane Maria  
Vieira  
Milward-  
de-Azevedo

A Figura 1 apresenta a variação de temperatura, umidade relativa e luminosidade registrados durante o período de exposição ao parasitoidismo. A emergência de adultos de *N. vitripennis*, criados em pupas frescas de *C. megacephala*, nos diferentes grupos experimentais, ocorreu entre o 12<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia após o início da exposição. O término da emergência limitou-se entre o 16<sup>o</sup> e 19<sup>o</sup> dia. Os picos de emergência concentraram-se no 14<sup>o</sup> e 15<sup>o</sup> dia. Os parasitóides criados em pupários previamente submetidos ao congelamento iniciaram a emergência entre o 14<sup>o</sup> e 17<sup>o</sup> dia após o início da exposição, finalizando-a entre o 16<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia. Os picos de emergência variaram entre os diferentes grupos experimentais (Amplitude: 14<sup>o</sup> - 16<sup>o</sup> dia).



**FIGURA 1.** Índices médios de temperatura (°C), UR (%), registrados em laboratório, e nebulosidade (1-10), durante o período de exposição das pupas de *Chrysomya megacephala*, frescas e previamente submetidas a criopreservação, ao parasitóide *Nasonia vitripennis*. EPPWONEitz - UFRRJ, Seropédica, RJ.

Pupas muscoides previamente expostas ao DMSO e ao controle PBS e submetidas ao nitrogênio líquido não serviram como substrato de criação do microhimenóptero. A taxa de eficiência dos pupários, nos lotes 3 e 4 molar do grupo glicerol NL, foi inferior a 4%. Em média, 80% das pupas frescas que contrastaram as respostas obtidas nas amostras expostas ao nitrogênio líquido permitiram o desenvolvimento de parasitóides (Tabela 1).

**Tabela 1.** Desempenho de pupas de *Chrysomya megacephala*<sup>1</sup> previamente tratadas com glicerol e dimetil sulfoxido, submetidas a -196 °C (Glicerol NL e DMSO NL) e a -20 °C (Glicerol Freezer e DMSO Freezer), como substrato de criação de *Nasonia vitripennis*, após exposição ao parasitoidismo, por 72 horas, em meio ambiente e manutenção subsequente sob condições controladas (Temperatura: 27 °C; UR: 65 ± 10% e 14 h de fotofase). Pupas frescas (24 horas de idade) e pupas tratadas com PBS caracterizaram os lotes testemunhas.

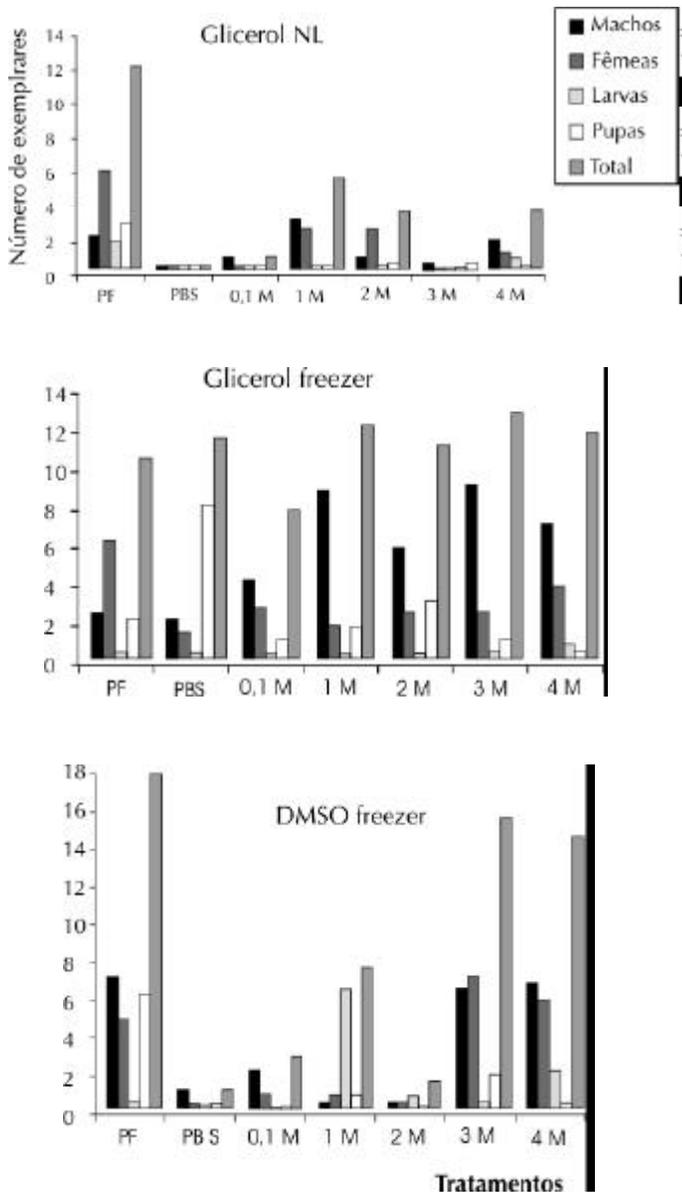
Lotes	Número médio de parasitóides/ nº de pupários eficientes Média ± DP Amplitude superior		Eficiência (%)	Razão sexual
Glicerol NL <sup>2</sup>				
Pupa fresca	28,41 ± 0,47	52	80,00	0,51
DMSO NL				
Pupa fresca	24,60 ± 1,27	48	80,00	0,39
Glicerol Freezer				
0,1 molar	15,88 ± 7,04	33	16,67	0,47
1	13,32 ± 4,36	36	26,67	0,56
2	14,21 ± 6,60	35	18,90	0,55
3	10,33 ± 1,45	28	21,10	0,54
4	15,08 ± 5,00	27	19,00	0,77
controle PBS	15,08 ± 2,20	33	31,10	0,62
Pupa fresca	28,66 ± 1,81	53	72,23	0,47
DMSO Freezer <sup>2</sup>				
1 molar	16,10 ± 0,12 <sup>3</sup>	29	14,43	0,65
Pupa fresca	25,55 ± 3,01	49	58,90	0,48

A taxa de eficiência, ao empregar-se pupários previamente tratados com glicerol e submetidos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura (glicerol freezer), oscilou entre 16 (0,1 molar) e 27% (1 molar). O controle PBS apresentou cerca de 30% de eficiência. O sucesso do parasitoidismo em pupas frescas foi próximo a 70%. A relação número médio de parasitóides: número de pupários eficientes, nas amostras congeladas, foi acentuadamente inferior ( $>10$ ;  $<16$ ) à obtida em pupas frescas (28,7) (Tabela 1).

Emergiram, em média, 16,1 adultos de *N. vitripennis* por pupário muscóide previamente exposto a DMSO 1 molar, em apenas duas entre as três repetições anteriormente processadas em freezer. A taxa de eficiência, neste tratamento, foi de 14,5% (Tabela 1), cerca de três vezes superior ao desempenho apresentado pelos espécimens incluídos no controle PBS (5,57%). Neste lote, ocorreu a emergência em apenas duas repetições, caracterizando uma variação amostral excessivamente alta. O desempenho apresentado pelos outros lotes foi irrelevante ( $<3\%$ ). O sucesso do parasitoidismo apresentou-se expressivamente reduzido no lote de pupas frescas (59%).

A presença de imaturos e adultos faratos de *N. vitripennis*, provenientes de pupários dissecados 20 dias após o início da emergência do parasitóide, está ilustrada na Figura 2. O procedimento de dissecação dos pupários muscóides revelou amostras inexpressivas de parasitóides. Como foi mencionado anteriormente, os pupários submetidos ao congelamento no grupo experimental DMSO-NL e glicerol-NL – tratamento PBS não foram utilizados pelas fêmeas de microhimenópteros. No entanto, encontrou-se, durante a dissecação, alguns adultos faratos e/ou imaturos nos lotes 0,1; 1 e 2 molar do grupo glicerol-NL, onde não havia, anteriormente, ocorrido emergência. Nos demais grupos experimentais, os indivíduos eram, em sua maioria, adultos faratos. Pupas muscóides frescas pertencentes ao grupo DMSO-NL continham 9,67; 4,67; 1,67 e 3,33 machos, fêmeas, larvas e pupas, em média, respectivamente. Quase todas as larvas encontradas no interior dos pupários dissecados estavam vivas. Alguns espécimens foram alocados, em recipientes de criação, sob as condições experimentais estabelecidas durante o processo de desenvolvimento das progênies. Dez dias após, as larvas encontravam-se vivas, sem alterações morfológicas aparentes.

Pupas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera, Calliphoridae) criopreservadas em soluções de glicerol e dimetil sulfoxido como substrato de criação de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera, Pteromalidae)



**Figura 2.** Imaturos e adultos faratos de *Nasonia vitripennis* (em média) evidenciados através de dissecações das pupas de *Chrysomya megacephala* frescas e congeladas em solução diluente, com e sem crioprotetor (glicerol e dimetil sulfoxido ou DMSO), nas temperaturas de armazenamento de  $-20^{\circ}\text{C}$  (freezer) e  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrogênio líquido- NL), após 22 dias do início da emergência dos parasitóides.

Não houve correlação entre a massa corporal média (Tabela 2) dos espécimens que constituíram os lotes de pupas frescas e o número médio de parasitóides emergidos dos pupários eficientes ( $r = -0,16$ ;  $P = 0,8375$ ). A massa corporal média dos pupários congelados, incluídos no grupo glicerol-freezer, não apresentou correlação com o número médio de parasitóides emergidos dos pupários eficientes ( $r = -0,56$ ;  $P = 0,2447$ ) ou com a taxa de eficiência ( $r = -0,77$ ;  $P = 0,0717$ ). Os resultados, portanto, sugeriram que a massa corporal das pupas que constituíram as diferentes amostras não influenciou o desempenho final dos parasitóides. Nos lotes constituídos por pupas frescas, não ocorreu emergência de espécimens de *C. megacephala*.

**Tabela 2.** Massa corporal (mg)\* de pupas frescas de *Chrysomya megacephala*, com 24 horas de idade, oriundas de larvas criadas em carne eqüina, mantidas em condições experimentais (Temperatura: 27 °C; UR: 65 ± 10%; 14 horas de fotofase)\*\*

Lotes/ tratamento	Glicerol NL X ± sx	DMSO NL X ± sx	Glicerol Freezer X ± sx	DMSO Freezer X ± sx
0,1 molar	56,01 ± 1,12 a	63,11 ± 0,32 a	62,50 ± 0,34 ab	62,08 ± 0,49 a
1 molar	56,55 ± 0,96 a	63,19 ± 0,37 a	62,27 ± 0,33 ab	62,08 ± 0,39 a
2 molar	58,21 ± 0,32 b	63,04 ± 0,28 a	62,51 ± 0,33 ab	62,64 ± 0,35 a
3 molar	56,67 ± 0,70 a	63,31 ± 0,34 a	62,75 ± 0,35 a	62,96 ± 0,55 a
4 molar	58,09 ± 0,47 ab	63,28 ± 0,35 a	62,36 ± 0,40 ab	62,74 ± 0,46 a
Controle PBS	58,22 ± 0,45 ab	63,16 ± 0,41 a	61,95 ± 0,35 ab	62,62 ± 0,38 a
Pupas frescas	59,96 ± 0,30 b	60,03 ± 0,18 b	61,23 ± 0,19 b	62,75 ± 0,41 a

\*Massa corporal obtida através de registro em lotes (5 larvas x 6 lotes)

\*\*Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey-Kramer ao nível de 5% de significância, dentro de cada tratamento

## DISCUSSÃO

Parasitóides criados em pupas previamente congeladas foram mais tardios. O tempo investido pelos pteromalídeos na procura de um substrato de melhor qualidade nutricional e/ou reprodutivo pode retardar o momento da oviposição, de acordo com RIVERS (1996). O acréscimo do grau de dificuldade em perfurar o pupário e/ou o "estranhamento" provocado por envoltório cuticular artificialmente processado, também pode ter condicionado as tendências temporais observadas durante a emergência, nos lotes tratados.

GULIAS-GOMES e colaboradores (dados não publicados) ao exporem pupas de *C. megacephala* ao congelamento direto em NL, sem qualquer aditivo protetor, assinalaram relações de parasitoidismo de, aproximadamente, 15 parasitóides: pupário eficiente. Reinterpretando MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO (1996), que congelaram pupas de *C. megacephala* a  $-12^{\circ}\text{C}$ , durante 1 mês, pode-se assumir a média de 13,5 parasitóides/total de pupários eficientes. O sucesso do parasitoidismo então assinalado foi de 70%. Estas técnicas contrastadas às testadas no bioensaio atual, portanto, favoreceram o desempenho reprodutivo e, principalmente, representam maior simplicidade metodológica, caracterizando uma relação custo: benefício operacional mais reduzida.

Contrastando-se o sucesso do parasitoidismo dos lotes constituídos por pupas frescas com trabalhos prévios, observam-se valores inferiores, principalmente na parcela pertencente ao grupo DMSO-freezer. A participação de fatores não monitorados ou quantificados que contribuíram para a queda da taxa de parasitoidismo, não deve ser descartada. Temperaturas médias inferiores a  $25^{\circ}\text{C}$  e os níveis de nebulosidade (de intermediários a altos) podem ter influenciado, também de forma deletéria, a taxa de sucesso do parasitoidismo. No bioensaio onde, após 48 horas de exposição e assumindo a mesma relação pupa: parasitóide, obteve-se 93 % de pupários parasitoidados com sucesso (CARDOSO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1995), a temperatura média diária variou entre  $26$  a  $30^{\circ}\text{C}$ , durante o período experimental. WYLIE (1958) comentou sobre a maior atividade locomotora de fêmeas de *N. vitripennis* quando expostas a tem-

peraturas e luminosidade mais elevadas, corroborando a afirmativa de MERWE (1943) que relacionou estes mesmos fatores à maior atividade reprodutiva da espécie. A manutenção rotineira de estoques do pteromalídeo, em laboratório, tem confirmado estas observações. Possivelmente, condições ambientais mais favoráveis potencializariam resultados mais expressivos, inclusive nas amostras constituídas por pupas congeladas.

Não ocorreu emergência de *C. megagephala* nos lotes de pupas frescas. Alguns argumentos podem ser responsabilizados: o "veneno" injetado por fêmeas de *N. vitripennis*, antes da oviposição, provocando a morte de hospedeiros jovens (RIVERS & DELINGER, 1994); a ação exploratória dos pupários e/ou a incidência de mortalidade natural (que implicaria fatores independentes da ação do parasitóide), potencializada durante o manuseio mecânico dos espécimens (CARDOSO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1996 e MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO, 1996).

A similaridade observada entre os resultados apresentados pelos lotes constituídos por pupas congeladas somente com o diluente (PBS) e pelos lotes que receberam os crioprotetores, deve ser evidenciada. A taxa de eficiência dos pupários amostrados no lote controle PBS, incluído no grupo experimental glicerol-freezer (Tabela 1), apresentou-se mais expressiva; entretanto, os espécimens inviabilizados não distinguiram, em média, uma maior produção de parasitóides. Estes resultados poderiam ser interpretados como a ausência do efeito crioprotetor dos aditivos testados? Não existem relatos, na literatura, sobre a capacidade de penetração dessas substâncias em pupários de dípteros. É possível que o tempo de equilíbrio, utilizado neste trabalho, tenha sido insuficiente para promover a ação interna dessas substâncias ou que o pupário intercepte sua penetração. Entretanto, isolada, esta suposição não justifica as taxas inexpressivas de eficiência encontradas. Assim, o fator ou fatores comuns aos lotes expostos ao congelamento, que determinou a subutilização dos pupários hospedeiros, não ficou esclarecido. No entanto, algumas hipóteses podem ser delineadas. Recorrendo a autores, como EDWARDS (1954), que citaram a rejeição de fêmeas parasitóides a pupários submetidos a extremos de umidade, sugere-se a alocação dos pupários em meio líquido como uma das causas de maior relevância. MERWE (1943) interpretou a morte de adultos faratos no interior de

Pupas de  
*Chrysomya*  
*megacephala*  
(Fabricius, 1794)  
(Diptera,  
Calliphoridae)  
crioconservadas  
em soluções  
de glicerol  
e dimetil  
sulfóxido  
como  
substrato  
de criação  
de *Nasonia*  
*vittipennis*  
(Walker,  
1836)  
(Hymenoptera,  
Pteromalidae)

pupários um efeito determinado pela alta umidade existente sobre o hospedeiro, o que dificultaria a confecção do orifício de emergência. A umidade disponibilizada pela solução tampão utilizada como diluente para os crioprotetores pode ter provocado a rejeição das fêmeas parasitóides e/ou ter dificultado a introdução de seus ovojetores. No final de cada período de exposição ao parasitoidismo, observou-se, ao redor e na superfície de alguns hospedeiros, a presença de um fluido viscoso e amarelo, provavelmente saído do interior dos pupários. Algumas pupas apresentavam-se aderidas por meio desta substância. É possível que os pupários tenham absorvido o líquido diluente durante o congelamento ou degelo, e após a lavagem e secagem com papel toalha, o excesso aparente de líquido tenha sido eliminado. A temperatura ambiente, mais elevada, registrada no primeiro dia, durante o monitoramento dos grupos glicerol e DMSO-freezer, poderia ter auxiliado a redução da umidade na superfície dos pupários, favorecendo o desempenho dos pteromalídeos. Por outro lado, a manutenção do índice de temperatura, durante os três dias de exposição dos parasitóides aos pupários de *C. megacephala* pertencentes ao grupo DMSO-freezer, não garantiu resultados mais expressivos, inclusive para o lote de pupas frescas.

O odor exalado pelo hospedeiro e proveniente dos resíduos da fonte alimentar, possui um importante papel no quimiotropismo. Neste experimento, além das pupas muscóides terem sido acondicionadas e lavadas em meio líquido antes de sua exposição à matrizes parasitóides, desativando o seu odor natural, os pteromalídeos encontravam-se potencialmente susceptíveis aos odores exalados pelos produtos químicos empregados como crioprotetores. De fato, o produto DMSO liberou forte odor, percebido facilmente na sala de criação (relativize-se, aqui, a percepção olfativa humana), o que poderia ter repellido e/ou arrestado as fêmeas parasitóides ("estranhamento"), prejudicando, inclusive, o parasitoidismo nos lotes de pupas frescas. Admite-se a possibilidade da atuação deletéria desse fator, reduzindo ou inibindo a interação parasitóide: pupa muscóide, associado ou não às especulações anteriores. A redução expressiva da taxa de eficiência no lote de pupas frescas pode corroborar esta hipótese. É interessante enfatizar, por outro lado, que, em média, a relação parasitóide: pupário eficien-

te mostrou-se muito expressiva, nos lotes de pupas frescas (CARDOSO & MILWARD-DE-AZEVEDO, 1996). Nestas amostras, possivelmente, os fatores extrínsecos que possivelmente interferiram sobre o quimiotropismo e o comportamento reprodutivo das fêmeas de *N. vitripennis*, não influenciaram o desempenho dos parasitóides imaturos.

ALTON (1920, *In* WHITING 1967) registrou, em condições controladas de laboratório (25 °C de temperatura) e em ambiente natural, uma irregular, mas persistente proporção de larvas em diapausa. De acordo com o autor, uma simples fêmea pode produzir ambos os tipos de larvas (ativas e diapáusicas), no mesmo pupário. Devido ao tempo decorrido desde a exposição ao parasitoidismo até o momento de dissecação dos pupários, neste experimento, não foi possível afirmar se as larvas monitoradas eram diapáusicas ou mesmo quiescentes. Todavia, a ocorrência destas formas que apresentaram velocidade de desenvolvimento reduzida, pode assegurar, na natureza, estrategicamente, a sobrevivência da progênie, arquitetada pelas fêmeas matrizes. MERWE (1943) acompanhou processos análogos à verdadeira diapausa ao submeter larvas a altas temperaturas, durante um curto intervalo de tempo. Comentou sobre a possível ocorrência da destruição de promotores da pupação. Entretanto, no presente bioensaio, não foram assinalados extresses térmicos. A qualidade nutricional disponibilizada pelas pupas hospedeiras previamente submetidas a baixas temperaturas e empregadas como substrato de criação, também não justifica o fenômeno observado, pois manifestou-se, também, nos lotes de pupas frescas.

A razão sexual dos parasitóides criados nos lotes de pupas frescas foi próxima a 0,5, na maioria dos ensaios. No grupo DMSO-NL, entretanto, esta variável caracterizou-se por um maior número de machos. Embora a literatura cite o aumento do número de fêmeas em progênies de parasitóides desenvolvidos em pupas submetidas anteriormente a baixas temperaturas (para detalhes, vide a revisão apresentada por MILWARD-DE-AZEVEDO & CARDOSO, 1996 e 1998), o número reduzido de espécimens produzidos nos grupos experimentais não foi suficiente para compor uma amostra populacional significativa e, portanto, inferências sobre esta variável poderiam ser tendenciosas.

A complexidade de fatores passíveis de participação nos resultados descritos neste trabalho impossibilitou o fornecimento de dados comprobatórios sobre os efeitos crioprotetores do glicerol e do DMSO, induzidos experimental e exogenamente, em pupas muscóides. Contudo, embora admitindo-se que a metodologia empregada neste trabalho não tenha corroborado com o incremento do desempenho reprodutivo de *N. vitripennis*, o potencial representado pela utilização de crioprotetores, objetivando a otimização de criações em larga escala desta e de outras vespas parasitóides, não deve ser, absolutamente, desprezado (RIVERS *et al.*, 2000). Este bioensaio, exploratório, é inédito, no país. A atuação de equipes interdisciplinares poderá minimizar as distorções metodológicas, implementando protocolos mais eficientes e passíveis de serem admitidos por interesses comerciais ajustados a programas de sustentabilidade ambiental.

## AGRADECIMENTOS

À contribuição do técnico de laboratório, Sr. Ivan Serafin Da Silva, durante o estabelecimento e manutenção dos estoques de parasitóides e auxílio técnico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, K. & R.A. CHAUDHRY. 1980. Cryopreservation of buffalo semem. **Vet. Record**, **106**: 199-201.
- ARAÚJO, M.F.L.; R.B. REINA; M.C.O GORLA; A.V. MONTEIRO & J.E. TOLEZANO. 1993. Investigação e isolamento de *Leishmania*: criopreservação de amostras de biópsias de lesões cutâneas na leishmaniose tegumentar experimental **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, **53**(1-2): 81-84.
- ARMIGER, L.C. 1993. Cell viability in cryopreserved heart valves. **New Zealand Vet. J.**, **43**.
- BENCHIMOL, M.; M. ATTÍAS; N.L. CUNHA E SILVA & T.U. CARVALHO. 1996. **Métodos de Estudo da Célula**. Editado por Marlene Benchimol/apoio: CAPES-FAPERJ-UENF-UFRJ-FENORTE. 140 p.

- CALLOW, L.L. & J. FARRANT. 1973. Cryopreservation of the promastigote form of *Leishmania tropica* var *Major* at different cooling rates. **Int. J. Parasit.**, **3**: 77-8.
- CARDOSO, D. & E.M.V. MILWARD-DE-AZEVEDO. 1995. Influência da densidade de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) sobre a capacidade reprodutiva de fêmeas nulíparas de *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Revta bras. Ent.**, **39** (4): 779-786.
- CARDOSO, D. & E.M.V. MILWARD-DE-AZEVEDO. 1996. Aspectos da biologia de *Nasonia vitripennis* (Walker) (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas de *Chrysomya megacephala* (FABRICIUS) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), sob condições de laboratório. **Revta bras. Ent.** **40** (2): 143-146.
- CORRÊA-FERREIRA, B.S. & M.C.N. OLIVEIRA. 1998. Viability of *Nezara viridula* (L.) eggs for parasitism by *Trissolcus basalís* (Woll.), under different storage techniques in liquid nitrogen. **An. Soc. Entomol.**, **27**(1): 101-115.
- EDWARDS, R.L. 1954. The host-finding and oviposition behaviour of *Mormoniella vitripennis* (Walker) (Hym., Pteromalidae), a parasite of muscoid flies. **Behaviour**, **7**: 88-112.
- FRIEDLER, S.; L.C. GIUDICE & E.J. LAMB. 1988. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, **49** (5): 743-763.
- GIBSON, G.A.P.; J.D. READ & R. FAIRCHILD. 2000. Bibliography of chalcid (Chalcidoidea) parasitoids of filth flies. First update: october, 2000. URL – <http://res2.agr.ca/ecorc/apss/refintro.htm>
- GEDEN, C.J.; D.A RUTZ; R.W. MILLER & D.C. STEINKRAUS. 1992. Suppression of house flies (Diptera: Muscidae) on New York and Maryland dairies using releases of *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) in an integrated management program. **Environ. Entomol.**, **21**(6): 1419-1426.
- GILL, J.H. & J.M. REDWIN. 1995. Cryopreservation of the first-stage larvae of *Trichostrongylid* nematode parasites. **Int. J. Parasit.**, **25**(12): 1421-1426.
- HARDY, R.N. 1979. **Temperatura e vida animal**, Coleção Temas de Biologia. EPU/EDUSP. Volume 24, 91 p.

- HEY, J.M. & D.R. MacFARLANE. 1998. Crystallization of ice in aqueous solutions of glycerol and dimethyl sulfoxide 2: ice crystal growth kinetics. **Cryobiology**, **37**: 119-130.
- KASHIWAZAKI, N.; S. OHTANI; K. MIYAMOTO & S. OGAWA. 1991. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at - 196 °C. **Vet. Record**, **128**: 256-257.
- KLUNKER, V.R. 1982. Die wirtseignung kälte konservierter *Musca domestica* - puparien für die massenzucht der schlupfwespe *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). **Angew. Parasitol.**, **23**: 32-42.
- KLUNKER, V.R. & K. FABRITIUS. 1992. Ergebnisse und erfahrungen mit der stammhaltung und massenzucht einiger pupariumparasitoide von fliegen auf kältekonservierten wirtspuparien. **Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew Ent.**, **8**: 287-294.
- LEATHER, S.R.; K.F.A. WALTERS & J.S. BALE. 1995. **The ecology of insect overwintering**. Cambridge, University Press, 255 p.
- LOVELOCK, J.E. 1954. Physical instability and thermal shock in red cells. **Nature**, **173**(4406): 659-661.
- LOVELOCK, J.E. & M.W.H., BISHOP. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. **Nature**, **183**(4672): 1394-1395.
- MANGOLD, A.J.; D.H. AGUIRRE & A.A. GUGLIELMONE. 1990. Post-thawing viability of vaccines for bovine babesiosis and anaplasmosis cryopreserved with glycerol. **Vet.Parasit.**, **37**: 301-306.
- MAZUR, P.; S.P. LEIBO & E.H.Y. CHU. 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. **Exp. Cell Res.**, **71**: 345-355.
- MERWE, J.S. 1943. Investigations on the biology and ecology of *Mormoniella vitripennis* Walker (Pteromalidae, Hym.). **J. Ent. Soc. S. Africa**, **6**: 48-74.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. & D. CARDOSO. 1996. Criação de *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) em pupas congeladas de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): testes preliminares. **Arq. Biol. Tecnol.**, **39** (1): 89-98.
- MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. & D. CARDOSO. 1998. *Nasonia vitripennis*: um microhimenóptero controlador de moscas varejeiras. Seropédica, RJ: Departamento de Parasitologia Animal, IB-UFRRJ, *In: Explorando os animais que nos exploram: caleidoscópio de idéias e fatos/ Tópicos*. CD-ROM. Online. Resgatado na Internet em dezembro/

- 2001: [http:// www. ufrj. br/ posgrad/ proin/ cd- proin. htm](http://www.ufrj.br/posgrad/proin/cd-proin.htm), em Tópicos.
- MORGAN, P. B. 1980. Sustained releases of *Spalangia endius* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) for the control of *Musca domestica* L. and *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). **J. Kansas Entomol. Soc.**, **53**(2): 367:372.
- MORGAN, P.B.; R.S. PATTERSON & G.C. LA BRECQUE. 1976. Controlling house flies at a dairy installation by releasing a protelean parasitoid, *Spalangia endius* (Hymenoptera: Pteromalidae). **J. Georgia Entomol. Soc.**, **11**(1): 39-43.
- MURTHEY, S.S.N. 1998. Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol. **Cryobiology**, **36**: 84-96.
- MUTETWA, S.M. & E.R. JAMES. 1985. Low temperature preservation of *Plasmodium* spp. **Parasitology**, **90**: 589-603.
- POITRAS, P.; P. GUAY; D. VAILLANCOURT; N. ZIDANE & M. BIGRAS-POULIN. 1994. In vitro viability of cryopreserved equine embryos following different freezing protocols. **Can. J. Vet. Res.**, **58**: 235-241.
- POLGE, C.; A.U. SMITH & A.S. PARKER. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, **164**: 666.
- RIVERS, D.B. 1996. Changes in oviposition behavior of the ectoparasitoid *Nasonia vitripennis* and *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) when using different species of fly hosts, prior oviposition experience, and allospecific competition. **Behaviour**, **89**(3): 466-474.
- RIVERS, D.B. & D.L. DENLINGER. 1994. Developmental fate of the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, envenomated by the pupal ectoparasitoid, *Nasonia vitripennis*. **J. Insect Physiol.**, **40**(2): 121-127.
- RIVERS, D.B.; R.E. LEE Jr & D.L. DENLINGER. 2000. Cold hardiness of the fly pupal parasitoid *Nasonia vitripennis* is enhanced by its host *Sarcophaga crassipalpis*. **J. Insect Physiol.**, **46**: 99-106.
- SAHA, S.; M. TAKAGI; A. BOEDIONO & T. SUZUKI. 1994. Direct rehydration of in vitro fertilised bovine embryos after vitrification. **Vet. Record**, **12**: 276-277.

- SALT, R.W. 1958. Role of glycerol in producing abnormally low supercooling and freezing points in an insect, *Bracon cephi* (Gahan). **Nature**, **3**(4618): 1281.
- VAN WYK, J.A.; H.M. GERBER & R.M.R. ALVES. 1990. Cryopreservation of some common nematodes of ruminants for up to 11,3 years. **Onderstepoort J. Vet. Res.**, **57**: 1-6.
- WHITING, A.R. 1967. The biology of the parasitic wasp *Mormoniella vitripennis* (= *Nasonia vitripennis*) (Walker). **Q. Rev. Biol.**, **42**: 333-406.
- WYLIE, H.G. 1958. Factors that affect host finding by *Nasonia vitripennis* (Walk.) (Hymenoptera: Pteromalidae). **Can. Entomol.**, **90**: 597-608.

Recebido: 17/01/03

Aceito: 04/04/03