

MINISTÉRIO DA SAÚDE

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALEXANDRE DA SILVA XAVIER

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIONOMIA DE DíPTEROS MUSCÓIDES
(SARCOPHAGIDAE) DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E FORENSE**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

Orientação: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

RIO DE JANEIRO

2012



MINISTÉRIO DA SAÚDE

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALEXANDRE DA SILVA XAVIER

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIONOMIA DE DÍPTEROS MUSCÓIDES
(SARCOPHAGIDAE) DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E FORENSE**

Orientação: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Aprovada em: 31/05/2012

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rubens Pinto de Mello (Presidente)

Prof. Dr. José Roberto Pujol Luz

Prof. Dr. Reginaldo Peçanha Brazil

Rio de Janeiro, 31 de maio de 2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, à minha família, por sempre ter me incentivado e compreendido a difícil jornada acadêmica que eu escolhi fazer.

Agradeço à Dra. Margareth Queiroz, por me aceitar em seu laboratório e me orientar com todo o apoio possível, disponibilizando todos os equipamentos e materiais necessários para a realização desta dissertação.

Agradeço ao Prof. Dr. Celso Guimarães Barbosa pela ajuda nas análises estatística, principalmente relacionados à distribuição de Weibull.

Agradeço ao Dr. José Mario d'Almeida, por ter sido o responsável por eu conhecer a Dra. Margareth e por todos os seus ensinamentos na graduação.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LTL-SEMEF por toda ajuda e pelas dicas (tanto dentro do laboratório como nas mesas dos bares) para que eu pudesse realizar meu projeto da melhor forma possível. Principalmente ao Rodrigo Rocha Barbosa pela ajuda na coleta e identificação das espécies envolvidas nesta dissertação e à Paloma Martins Mendonça pela ajuda na etapa de microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço a Dra. Jacenir Mallet e a todos da Plataforma de Microscopia pela ajuda durante a preparação das amostras e observações no microscópio eletrônico de varredura.

“O corpo estava em fase de putrefação e um jorro de líquidos malcheirosos havia pingado do seu corpo até o chão, formando uma espessa poça escura. O cadáver estava inchado pela ação dos gases e parecia indecentemente gordo. De sua boca aberta saía uma enorme língua roxa, onde pousavam dezenas de moscas esverdeadas, que não paravam de zunir em volta dele.”

(Manel Loureiro, em Apocalipse Z – O princípio do fim).

ÍNDICE

	Pag.
1. Introdução	01
2. Revisão de literatura	04
2.1 – A Entomologia Forense e os dípteros muscóides	04
2.2 – Família Sarcophagidae.....	05
2.3– Gênero <i>Sarcodexia</i>	07
2.3.1– <i>Sarcodexia lambens</i>	07
2.4– Gênero <i>Oxysarcodexia</i>	08
2.4.1 - <i>Oxysarcodexia amorosa</i>	09
2.5 - A identificação de dípteros muscóides através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)	10
3. Objetivos	12
3.1 – Objetivos específicos	12
4. Metodologia	13
4.1 – Bionomia de <i>Sarcodexia lambens</i> e <i>Oxysarcodexia amorosa</i>	13
4.2 – Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	17
5. Resultados:	18
5.1 – Aspectos bionômicos de <i>Sarcodexia lambens</i>	18
5.2 – Aspectos bionômicos de <i>Oxysarcodexia amorosa</i>	22
5.3 – Caracterização morfológica através da microscopia eletrônica de varredura de <i>Oxysarcodexia amorosa</i>	26
5.3.1 – Larva de segundo instar de <i>Oxysarcodexia amorosa</i>	26
5.3.2 – Larva de terceiro instar de <i>Oxysarcodexia amorosa</i>	27
5.3.3 – Pupa de <i>Oxysarcodexia amorosa</i>	28
7. Discussão	35
7.1 – Bionomia das espécies	35
7.2 – Microscopia eletrônica de varredura	38
8. Conclusão	42
9. Referências Bibliográficas	43

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 2.1 – <i>Sarcodexia lambens</i> . (Fonte: www.insects.oeb.harvard.edu).....	08
Figura 2.2 – <i>Oxysarcodexia amorosa</i> . (Fonte: www.diptera.info).....	09
Figura 4.1 – Armadilha do tipo Shannon modificada armada no campus da FIOCRUZ para coleta dos dípteros muscóides.....	13
Figura 4.2 – Vista geral da gaiola de madeira (A) para criação de dípteros muscóides e detalhes do interior (B).....	14
Figura 4.3 – Recipiente menor contendo dieta à base de carne bovina moída putrefata e recipiente maior contendo vermiculita para o processo de pupação.....	15
Figura 4.4 – Tubo de ensaio no qual as larvas L3 eram individualizadas para que fosse realizada a sexagem.....	16
Figura 5.1 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para machos de <i>Sarcodexia lambens</i> [observado (cruzes); esperado (linha)] mantidos em condições de laboratório ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12hrs de fotofase).	20
Figura 5.2 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para fêmeas de <i>Sarcodexia lambens</i> [observado (bolas); esperado (linha)] mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12hrs de fotofase).	21
Figura 5.3 – Número de larvas depositadas por fêmeas de <i>Sarcodexia lambens</i> mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12hrs de fotofase) ao longo dos dias de observação.	22
Figura 5.4 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para machos de <i>Oxysarcodexia amorosa</i> [observado (cruzes);	

esperado (linha)] mantidos em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12hrs de fotofase).24

Figura 5.5 - Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para fêmeas de *Oxysarcodexia amorosa* [observado (bolas); esperado (linha)] mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12hrs de fotofase).25

Figura 5.6– Número de larvas depositadas por fêmeas de *Oxysarcodexia amorosa* mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12hrs de fotofase) ao longo dos dias de observação.26

Figura 5.7 – Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando alguns segmentos (setas). B – Visão da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm) espinhos (e) e espiráculo anterior (ea). C – Visão detalhado do palpo maxilar, mostrando antena (a), cristas orais (co) e papilas (p).....29

Figura 5.8 – Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão detalhada do espiráculo anterior (ea) e espinhos do primeiro segmento torácico (e). B – Visão da região posterior, mostrando os tubérculos circunspiraculares (setas), os espiráculos posteriores (ep) e os tubérculos (tc). C – Visão detalhada das duas aberturas espiraculares (setas).....30

Figura 5.9 – Micrografia eletrônica de larvas de terceiro instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão detalhada da região cefálica, mostrando antena (a), cristas orais (co), palpo maxilar (pm), espinhos (e) e espiráculo anterior (ea). B – Visão detalhada do palpo maxilar (pm), mostrando antena (a) e papilas (setas). C – Visão detalhada evidenciando os espinhos do primeiro segmento torácico (e), abaixo das cristas orais (co).....31

Figura 5.10 – Micrografia eletrônica de larvas de terceiro instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão detalhada do espiráculo anterior (ae), mostrando as aberturas espiraculares (ae). B – Visão da região posterior, mostrando os espiráculos posteriores (ep), os tubérculos circunspiraculares

(setas) e os tubérculos caudais. C – Visão detalhada das três aberturas espiraculares (setas).32

Figura 5.11 – Micrografia eletrônica de varredura da pupa de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão geral da pupa, mostrando o espiráculo anterior (setas). B – Visão detalhada da região anterior, mostrando o espiráculo anterior (ea). C – Visão da região anterior, evidenciado a retração cefálica.....33

Figura 5.12 – Micrografia eletrônica de varredura da pupa de *Oxysarcodexia amorosa*. A - Visão da região posterior, mostrando a placa espiracular rodeada pelos tubérculos. B – Visão dos espiráculos posteriores e as três aberturas espiraculares (setas).34

LISTA DE TABELAS

Pag.

Tabela 5.1: Duração e viabilidade dos estágios larvais de *Sarcodexia lambens* criadas em dieta à base de carne bovina putrefata a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR.....18

Tabela 5.2: Peso (mg) das larvas L3 de *Sarcodexia lambens* ao abandonarem a dieta à base da carne bovina putrefata.....19

Tabela 5.3: Duração e viabilidade dos estágios larvais de *Oxysarcodexia amorosa* criadas em dieta à base de carne bovina putrefata a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR.....23

Tabela 5.4: Peso (mg) das larvas L3 de *Oxysarcodexia amorosa* ao abandonarem a dieta à base de carne bovina putrefata a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR.....23

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIONOMIA DE DÍPTEROS MUSCÓIDES (SARCOPHAGIDAE) DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E FORENSE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alexandre da Silva Xavier

Os muscóides da família Sarcophagidae além de serem importantes vetores mecânicos e atuarem como agentes irritantes e espoliadores, assim como produtores de miíases ao homem e animais, também representam um importante papel como indicadores forenses. Com o conhecimento de seu ciclo biológico, as larvas depositadas por esses insetos podem ser utilizadas na datação do intervalo pós-morte (IPM). A família Sarcophagidae é descrita como uma das que apresentam um maior potencial informativo para análises forenses. Este trabalho objetiva estudar pela primeira vez a bionomia de *Sarcodexia lambens* e *Oxysarcodexia amorosa*, bem como fazer a primeira caracterização morfológica através da microscopia eletrônica de varredura da espécie *O. amorosa*. Para o estudo de bionomia, as colônias foram estabelecidas a partir de adultos capturados no campus da FIOCRUZ. Foram analisados: peso de larvas maduras, período larval e pupal, fase de neolarva a adulto e emergência de adultos. Foi analisada a viabilidade das larvas e dos adultos ao longo do experimento. O estudo do potencial biótico e da longevidade da espécie foi realizado para se obter as curvas de sobrevivência. Para a análise através do microscópio eletrônico de varredura, as larvas foram lavadas com solução salina e fixadas em uma solução de glutaraldeído a 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 durante uma hora. No mesmo tampão foi utilizado tetróxido de ósmio a 1% para realizar a pós-fixação. Séries crescentes de acetona foram utilizadas para que ocorresse a desidratação e depois, as amostras foram submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂. Para que pudesse ocorrer a visualização no microscópio eletrônico de varredura, as amostras foram montadas em fita condutora de carbono, em suportes metálicos e cobertos por ouro. Para *S. lambens*, a viabilidade larval foi de 82% e o período de L1 até L3 foi de 3,51±0,99 dias. As larvas L3 iniciaram o processo de pupa com peso em média de 33,67±7,13mg. O período pupal durou em média 8,26±0,93 dias e teve uma viabilidade de 65,24%. O tempo de larva a adulto teve uma média de 11,53±1,22 dias e 54,50% de viabilidade. A longevidade média das fêmeas foi de 39,33±1,52 dias e a dos machos de 57,33±4,72 dias. Para *O. amorosa*, a viabilidade larval foi de 76%. O período de larval foi de 3,51±0,64 dias. As L3 iniciaram o processo de pupação com peso médio de 28,28±3,38mg. A viabilidade pupal foi de 88,15% com média de emergência de 10,14±0,63 dias. A porcentagem de machos e fêmeas foi de 52,98% e de 47,01%, respectivamente. O tempo de neolarva a adulto apresentou média de 13,60±0,69 dias e viabilidade de 67%. A longevidade média da espécie foi de 85,33±18,82 dias.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND BIONOMY OF MUSCOID FLIES (DIPTERA, SARCOPHAGIDAE) OF HEALTH AND FORENSIC IMPORTANCE

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alexandre da Silva Xavier

The flies of Sarcophagidae family besides being important mechanical vectors and act as irritants and spoilers, as well as producing myiasis in man and animals, also play an important role as forensic indicators. With the knowledge of their life cycle, larvae deposited by these insects can be used in the dating of the postmortem interval (PMI). Sarcophagidae is described as one having higher potential information for forensic analysis. This work aims to know by the first time the bionomy of *Sarcodexia lambens* and *Oxysarcodexia amorosa*, as well as make the first morphological characterization by scanning electron microscopy (SEM) of *O. amorosa*. To the bionomics study, the colonies were established from adult flies captured on FIOCRUZ's campus. Were analyzed: weight of L3, larval and pupal stage, period of neolarvae to adult and adult emergence. We analyzed the viability of larvae and adults throughout the experiment. The study of the potential biotic and longevity of the species was carried out to obtain the survival curves. For analysis by SEM, the larvae were washed with saline solution and fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer 0.1 M, pH 7.2, for 1 hour. In the same buffer was used osmium tetroxide 1% to perform post-fixation. A series of increasing acetone were used for the dehydration and then the samples were subjected to the method of the critical point drying using CO₂. The samples were mounted on stubs and covered by gold, to visualization on SEM. To *S. lambens*, the larval viability was 82% and the length L1 to L3 was 3.51 ± 0.99 days. The L3 larvae started the pupae process with weight on average of 33.67 ± 7.13 mg. The pupal length had on average 8.26 ± 0.93 days and had a viability of 65.24%. The period of neolarvae to adult averaged 11.53 ± 1.22 days and 54.50% of viability. The average longevity of was 39.33 ± 1.52 days for females and 57.33 ± 4.72 days for males. For *O. amorosa*, the larval viability was 76%. The larval period was 3.51 ± 0.64 days. The L3 began the pupae process with average weight of 28.28 ± 3.38 mg. The pupal viability was 88.15% with an average emergence of 10.14 ± 0.63 days. The percentage of males and females was 52.98% and 47.01% respectively. The period of neolarvae to adults had an average of 13.60 ± 0.69 days and viability of 67%. The average longevity of this species was 85.33 ± 18.82 days.

1. Introdução

Os insetos da ordem Diptera são considerados como moscas verdadeiras cosmopolitas, com cerca de 150000 espécies descritas em 158 famílias (Thompson 2006). Esta ordem é dividida em duas subordens: Nematocera e Brachycera. Nesta última se encontram moscas com antenas dotadas de até sete segmentos e apresentando frequentemente uma arista. A subordem Brachycera é subdividida em três infraordens: Muscomorpha, Tabanomorpha e Asilomorpha. A infraordem Muscomorpha possui duas divisões: Aschiza e Schizophora. Esta última apresenta as subdivisões Acalyptrata e Calyptratae. Na subdivisão Calyptratae estão presentes as superfamílias Hippoboscoidea, Muscoidea e Oestroidea (McAlpine e Wood 1989).

No Brasil, existem espécies de aproximadamente 22 famílias de dípteros que estão associados à carcaça de animais. As quatro famílias com maior importância forense são: Muscidae (Diptera: Muscoidea), Fanniidae (Diptera: Muscoidea), Calliphoridae (Diptera: Oestoidea) e Sarcophagidae (Diptera: Oestoidea) (Carvalho et al. 2000). Além disso, estas famílias possuem importância médica-veterinária por serem importantes vetores mecânicos e biológicos de organismos patogênicos tanto para o homem, como para os animais domésticos (Greenberg e Povolny 1971). De acordo com Freitas et al. (1982), os muscóides podem atuar como agentes irritantes e espoliadores, produtores de míiases no homem e nos animais domésticos e silvestres, apresentando altos índices de sinantropia e endofilia (d'Almeida e Lopes 1983; Moura et al. 1997; Carvalho et al. 2000).

Em seu trabalho com dípteros caliptrados, d'Almeida (1986) definiu o termo "lixeria natural" para estas moscas, visto que suas larvas participam de maneira ativa na degradação da matéria orgânica na natureza, desenvolvendo-se em muitos tipos de substratos, que vão desde tecidos de animais e vegetais, carcaças de vertebrados e invertebrados, lixo urbano, até fezes. O nicho ecológico destes

muscóides os enquadra em um papel na área de saúde pública, como vetores mecânicos em potencial de enterovírus, enterobactérias, ovos de helmintos e outros patógenos (Greenberg 1971). As larvas de alguns desses muscóides podem ser divididas em dois grupos: biontófagas e necrobiontófagas, se desenvolvendo em tecidos vivos e mortos de vertebrados, respectivamente (Zumpt 1965; Guimarães et al. 1983). Segundo Guimarães e Papavero (1999), as larvas biontófagas são responsáveis por causar miíases primárias, enquanto larvas necrobiontófagas causam miíases secundárias.

Os dípteros da família Sarcophagidae e Calliphoridae demonstram maior potencial informativo para análises forenses por serem os primeiros a chegarem a um cadáver e podem apresentar um padrão de sucessão de espécies ao longo da decomposição, variando com sua região geográfica (Campobasso et al. 2001; Marchenko 2001).

Segundo Barros et al. (2008), a maior frequência de espécies de sarcófagídeos é encontrada durante a fase de inchamento do cadáver. Eles são encontrados com frequência sobre as carcaças e/ou em suas extremidades, ao contrário das espécies de outras famílias de importância forense como Muscidae e Calliphoridae, que se localizam nas partes internas, de preferência nos locais mais liquefeitos (Thyssen e Linhares 2007).

Os insetos presentes na carcaça aceleram o processo de decomposição, devido ao processo de degradação da massa corpórea (Payne 1965; Jirón e Cartín 1981). Salviano et al. (1996) destacaram a importante função ecológica que as larvas de dípteros muscóides desempenham, pois são responsáveis por 90% da degradação da massa corpórea.

Além da observação do ciclo de desenvolvimento dos ovos e larvas depositados por esses insetos para que a estimativa do IPM seja obtida, servindo como um instrumento para auxiliar peritos e investigadores criminais durante as investigações jurídicas, tal comportamento biológico também tem sido utilizado como auxílio na identificação de casos de maus-tratos e abandono de crianças, idosos e incapazes (Smith 1986; Liu e Greenberg 1989; Benecke et al. 2004). Além disso, as larvas de moscas podem servir como substrato para análises toxicológicas nos

casos de suspeitas de envenenamento, onde as amostras convencionais não estão mais disponíveis (Goff e Lord 1994). Alguns autores destacam também a importância para a detecção de algumas substâncias tóxicas, dentre elas drogas ilícitas e fármacos como diazepam e as anfetaminas (Carvalho et al. 2000; Introna et al. 2001; Bourel et al. 2001; Gagliano-Candela e Aventaggiato 2001; Campobasso et al. 2004).

Os trabalhos relacionados à caracterização morfológica e a bionomia de sarcófagídeos são incipientes na literatura, principalmente estudos relacionados aos gêneros *Sarcodexia* e *Oxysarcodexia*. Este trabalho objetivou estudar a bionomia de *Sarcodexia lambens* e *Oxysarcodexia amorosa*. Este trabalho apresenta os primeiros resultados referentes à morfologia de *O. amorosa* através da MEV.

2. Revisão de literatura

2.1. A Entomologia Forense e os dípteros muscóides

A entomologia forense estuda insetos e outros artrópodes que possuem alguma correlação com eventos criminais, fornecendo informações essenciais a peritos e investigadores (Keh 1985). Existem três áreas na qual a entomologia forense pode ser subdividida: urbana, que abrange os insetos que afetam o homem e seu ambiente; pragas de produtos armazenados, que está relacionada com insetos (inteiros ou partes deles) que são encontrados contaminando alimentos; e Médico-Legal, que está relacionado os componentes criminais do sistema legal, com ênfase nos insetos que utilizam animais mortos como fonte de comida e/ou postura de ovos ou larvas (Lord e Stevenson 1986).

Atualmente, muitas espécies de dípteros pertencentes às famílias Calliphoridae, Sarcophagidae, Fanniidae, Muscidae, Drosophilidae, Phoridae e Phiophilidae têm sido associadas a carcaças, fazendo com que estes insetos sejam considerados como indicadores forenses (Smith 1986).

Estas espécies ditas como indicadores forenses desempenham um importante papel criminal, visto que a maioria dos sinais de decomposição ocorre entre as primeiras 72-96 horas após o óbito, quando o cadáver sofre alterações provocadas por variáveis intrínsecas ao próprio corpo e relacionadas ao meio ambiente (Henssge et al. 2000). Quando a temperatura do corpo se iguala à temperatura do ambiente, após as primeiras horas da morte, e não há mais como avaliar parâmetros como a rigidez cadavérica, a mancha abdominal e os livores, os insetos são capazes de determinar com precisão quando ocorreu a morte (Kashyap e Pillai 1989). Os métodos químicos, físicos e histológicos não são apropriados para determinar o intervalo pós-morte (IPM) quando o corpo é encontrado dias ou

semanas após a morte, no qual se encontra em um estágio avançado de decomposição (Amendt et al. 2004).

O tempo de desenvolvimento, resposta à diapausa, bem como as características ecológicas entre espécies necrófagas podem diferir, ainda que dentro de um mesmo gênero (Higley e Haskell 2001), o que faz com que larvas encontradas no mesmo estágio de desenvolvimento não necessariamente possuam a mesma idade ou o mesmo tempo de colonização (Amendt et al. 2004). Desta forma, o conhecimento do ciclo de vida e características biológicas, morfológicas e ecológicas dos insetos faz-se necessário (Erzinçlioglu 1983).

2.2. Família Sarcophagidae

Conhecidas como moscas da carne, as espécies da família Sarcophagidae estão presentes em todas as regiões biogeográficas. Dentre as 2500 espécies de sarcófagídeos descritas, cerca de 800 espécies são encontradas na Região Neotropical, em climas variando entre o tropical e o temperado (Shewell 1987; Pape 1996). São moscas encontradas em estudos de sucessão e mesmo não sendo tão abundantes como os dípteros das famílias Calliphoridae e Muscidae, são as que apresentam frequentemente uma maior diversidade de espécies em carcaça de porcos ou cadáveres (Oliveira-Costa et al. 2001). Algumas espécies são atraídas por excremento e matéria orgânica animal em decomposição, e são consideradas causadoras de miíases em homens e animais domésticos (Zumpt 1965).

Os sarcófagídeos são muscóides de tamanho variando entre médio a grande (4-25 mm), com uma coloração cinza fosco e três faixas pretas longitudinais no mesonoto. O abdome é manchado ou quadriculado. Possuem uma fileira de cerdas na meropleura e um subescutelo não desenvolvido. Geralmente possuem uma uniformidade geral, com poucas características externas podendo ser utilizadas com segurança para identificar espécies. Portanto, a observação da estrutura e da forma da terminália do macho providencia as características essenciais para identificação (Carvalho e Mello-Patiu 2008).

A família Sarcophagidae possui três subfamílias: Miltogramminae, Paramacronychiinae e Sarcophaginae. A subfamília Miltogramminae, com pouca diversidade neotropical, apresenta dípteros com tamanho variando de pequeno a médio, com espécies possuindo larvas cleptoparasitas de Hymenoptera. A subfamília Paramacronychiinae, ausente na região neotropical, apresenta dípteros parasitóides ou predadores de insetos, de caramujos terrestres (Pulmonata) e de ovos de tartarugas, além de serem considerados produtores de miíases em mamíferos. A subfamília Sarcophaginae, apresenta maior diversidade de espécies e distribuição concentrada no Novo Mundo. A maioria das espécies é de tamanho médio, embora haja espécies grandes (20 mm) e pequenas (5 mm). Suas larvas possuem hábitos diversos, com espécies saprófagas, necrófagas, coprófagas, produtoras de miíases em vertebrados, parasitóides de insetos, predadoras de aranhas, caramujos terrestres e miriápodes (Lopes 1973; Pape 1996; Mello-Patiu et al. 2009).

A maioria das espécies da família Sarcophagidae apresenta uma incubação com os ovos eclodindo de forma intra-uterina, o que faz com que as fêmeas depositem larvas de primeiro instar (cujo esqueleto céfalofaríngeo é sempre fortemente esclerotizado) sobre a carcaça (Lopes 1982; Shewell 1987). Essa oviviparidade faz com que as larvas iniciem imediatamente sua alimentação na carcaça, garantindo aos sarcófagídeos um pioneirismo na colonização dos cadáveres, uma vez que a outra família mais frequente nas fases iniciais da colonização cadavérica, Calliphoridae, é ovípara e necessita de um tempo adicional para a eclosão das larvas (Denno e Cothran 1976; Barros et al. 2008).

Na subfamília Sarcophaginae, espécies dos gêneros *Oxysarcodexia*, *Peckia* e *Sarcodexia* são frequentemente coletadas em animais em estado avançado de decomposição (Monteiro-Filho e Penereiro 1987; Moura et al. 1997; Souza e Linhares 1997; Carvalho et al. 2000; Carvalho e Linhares 2001; Barros et al. 2008; Carvalho e Mello-Patiu 2008).

2.3. Gênero *Sarcodexia*

O Gênero *Sarcodexia* é monoespecífico, possuindo como único representante a espécie *Sarcodexia lambens* (Wiedemann, 1830), que já foi denominada *Sarcodexia innota* (Walker, 1861) e *Sarcodexia sternodontes* (Townsend, 1891), atualmente sendo considerados sinônimos (McAlpine 1981; Leão et al. 1996). Esta espécie está mais comumente distribuída na região Neotropical, sendo que alguns autores a consideram uma espécie cosmopolita (Pape 1996).

Uma das principais características do gênero é apresentar o falo com ápice bifido, os cercos são em forma de concha, inclinados para frente e com um ápice divergente. As cerdas da gena são embranquecidas e a tibia média apresenta uma longa cerda que alcança, ultrapassando, a tibia apical (Carvalho e Mello-Patiu 2008).

2.3.1. *Sarcodexia lambens*

A espécie *S. lambens* (figura 2.1) possui importância em entomologia médica e forense (Lopes e Leite 1989), sendo encontrada como larva e adulto em cadáveres humanos, além de iscas de peixes, carcaças de ratos, de porcos e de coelhos (Carvalho e Linhares 2001; Oliveira-Costa et al. 2001; Leandro e d'Almeida 2005; Moretti 2006; Barbosa et al. 2009; Vairo et al. 2010). Além disso, foi registrada como espécie causadora de miíases em animais domésticos e em humanos (Guimarães et al. 1983; Mulieri et al. 2010).



Figura 2.1 – *Sarcodexia lambens*. (Fonte: www.insects.oeb.harvard.edu)

No Brasil, *S. lambens* apresenta uma abundância mais elevada durante os meses mais quentes do ano (Linhares 1981), podendo ser considerada uma espécie que evita o ambiente urbano (Ferreira 1979; Linhares 1981; Dias et al. 1984).

S. lambens tem sido registrada como um inseto parasitóide facultativo, um predador de insetos feridos, um produtor de miíases em pássaros e mamíferos, assim como um inseto que utiliza carcaças de vertebrados e invertebrados para larviposição (Townsend 1983; d’Almeida 1988, 1989; Fessl et al. 2001; Mulieri et al. 2010).

2.4. Gênero *Oxysarcodexia*

O gênero *Oxysarcodexia*, é um dos mais ricos em espécies da família Sarcophagidae, com 81 espécies conhecidas e registradas em sua maioria na região Neotropical, especialmente no Brasil, com grande similaridade entre elas (Pape 1996). Algumas espécies do gênero possuem o hábito de depositar suas larvas em

fezes humanas ou em outros animais (Tibana e Mello 1985). Este gênero pode ser diferenciado dos outros da família Sarcophagidae por apresentarem um ctenídeo (cerdas curtas e achatadas) na tíbia média. As cerdas da gena são negras, porém as cerdas da pós-gena apresentam algumas cerdas embranquecidas. Algumas espécies apresentam o falo com ventrália visivelmente desenvolvida e ornamentada (Carvalho e Mello-Patiu 2008).

2.4.1. *Oxysarcodexia amorosa*

A espécie *Oxysarcodexia amorosa* (Schiner, 1868) (figura 2.2) está distribuída pela América Latina (do México ao Brasil) e segundo Barbosa et al. (2009), é uma das mais frequentes moscas encontradas em carcaças da região metropolitana do Rio de Janeiro, apresentando importância em entomologia médica-veterinária e forense.



Figura 2.2 – *Oxysarcodexia amorosa*. (Fonte: www.diptera.info)

Com o conhecimento de seu ciclo biológico, as larvas depositadas por esses insetos podem ser utilizadas na estimativa do intervalo pós-morte, assim como auxiliar a identificação de casos de maus-tratos e abandono de crianças, idosos e incapazes (Benecke et al. 2004).

2.5. A identificação de dípteros muscóides através da microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Uma das formas mais seguras de se identificar os dípteros muscóides se baseia nas características da morfologia dos adultos. Entretanto, a maioria dos espécimes encontrados junto a carcaças corresponde às larvas e aos ovos, fazendo com que seja necessária a criação destes imaturos até que alcancem a fase adulta. Visto que existem poucas descrições de imaturos, torna-se relevante um estudo dessa natureza, envolvendo não só a morfologia, através da microscopia ótica, como também a microscopia eletrônica de varredura. No entanto, caso os fatores abióticos, como luminosidade, temperatura e umidade não sejam mantidas similares àqueles da região de onde as larvas foram retiradas, podem ocorrer imprecisões com relação à estimativa do intervalo pós-morte (IPM), além da morte dos ovos e larvas, impossibilitando assim a identificação das espécies envolvidas. E nos casos criminais, a rápida determinação do IPM é crucial à investigação, não havendo tempo hábil para a criação dos imaturos até a emergência do adulto (Greenberg e Szyska 1984; Queiroz e Carvalho 1987; Erzinçlioglu 1989; Liu e Greenberg 1989; Queiroz et al. 1997; Oliveira et al. 2007).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta de identificação rápida utilizada pela entomologia forense para determinar o IPM, sendo utilizada por diversos autores na identificação de ovos, larvas e pupas de dípteros muscóides (Kitching 1976; Greenberg e Szyska 1984; Liu e Greenberg 1989; Peterson e Newman 1991; Greenberg e Singh 1995; Sukontason et al. 2004a, 2004b; Thyssen e Linhares 2007; Mendonça et al. 2010).

A morfologia externa dos imaturos possui um grande valor diagnóstico para a entomologia forense, e com a MEV é possível obter uma melhor e mais detalhada

visualização de ovos, larvas e pupas, facilitando com maior precisão a identificação de espécies de importância forense. Greenberg e Kunich (2002) reuniram chaves dicotômicas de espécies de imaturos e adultos de moscas ao redor do mundo, conjugado com informações relativas à biologia das principais espécies.

Contudo, a grande maioria de estudos ainda se encontra principalmente no hemisfério norte, porém é importante a realização de estudos em diversas regiões do mundo, uma vez que de acordo com Greenberg e Singh (1995), pode haver diferenças morfológicas entre diversas populações dos dípteros analisados, principalmente em amostras distantes geograficamente e temporalmente.

3. Objetivo Geral

- Conhecer a Bionomia das espécies *Sarcodexia lambens* e *Oxysarcodexia amorosa*;

3.1. Objetivos específicos

- Analisar a duração e viabilidade dos estágios larval, pupal e fase de larva a adulto de *S. lambens* e *O. amorosa*;
- Analisar o potencial biótico e a longevidade dos adultos de *S. lambens* e *O. amorosa*;
- Fornecer subsídios para a identificação dos estágios imaturos de importância médica-veterinária e forense da espécie *O. amorosa*;
- Caracterizar a morfologia dos ínstares larvais e da pupa da espécie *O. amorosa* descrevendo o tegumento, a distribuição dos espinhos, região cefálica (antena, palpos maxilares e cristas orais), espinhos do colar cefálico, espiráculos anteriores e posteriores e peritremas utilizando como ferramenta a microscopia eletrônica de varredura.

4. Metodologia

4.1. Bionomia de *Sarcodexia lambens* e *Oxysarcodexia amorosa*

As colônias *S. lambens* e *O. amorosa* foram estabelecidas a partir de adultos capturados no campus da FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, durante o período de julho a agosto de 2011. Os adultos foram capturados com auxílio de uma armadilha do tipo Shannon modificada por nossa equipe de pesquisa (figura 4.1) contendo em seu interior carcaças de camundongos albinos (*Mus musculus* L.) e após identificação das espécies, foram transferidos e mantidos em gaiolas de madeira (30 cm x 30 cm x 30 cm) revestidas por tela de náilon (figuras 4.2A e 4.2B), onde foi oferecida carne moída para a larviposição.



Figura 4.1 – Armadilha do tipo Shannon modificada armada no campus da FIOCRUZ para coleta dos dípteros muscóides.

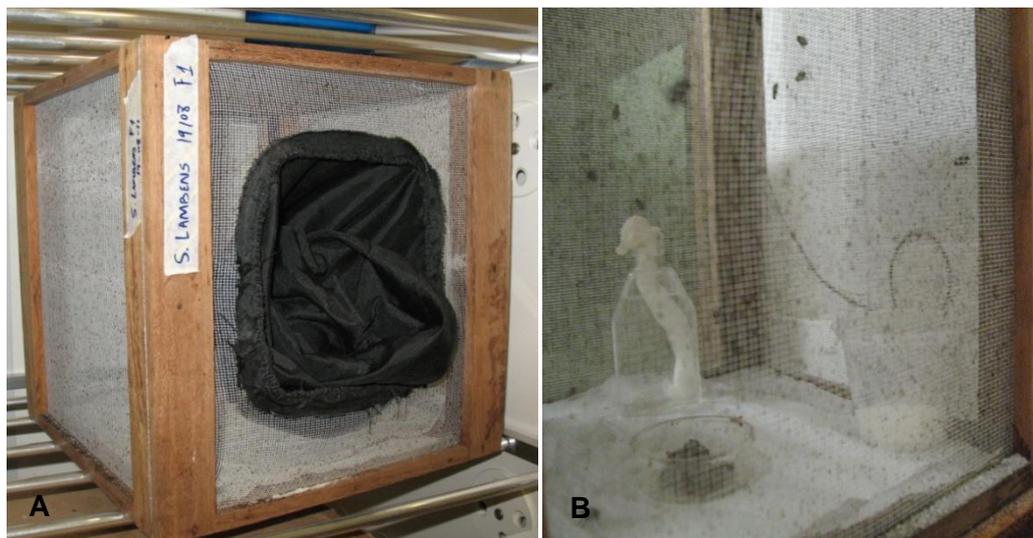


Figura 4.2 – Vista geral da gaiola de madeira (A) para criação de dípteros muscóides e detalhes do interior (B).

Para o estudo de bionomia, imediatamente após a larviposição, 200 larvas de primeiro instar (L1) de cada espécie foram retiradas da carne moída em estágio inicial de putrefação e transferidas com o auxílio de um pincel fino (número zero) para quatro recipientes de plástico (50 larvas em cada), contendo 2g de carne bovina moída putrefata por larva. Estes recipientes foram alocados dentro de recipientes maiores contendo vermiculita no fundo, para que as larvas maduras (L3), ao abandonarem a dieta, se enterrarem no substrato e iniciem o processo de pupa (figura 4.3).



Figura 4.3 – Recipiente menor contendo dieta à base de carne bovina moída putrefata e recipiente maior contendo vermiculita para o processo de pupação.

Após serem pesadas, as larvas maduras foram individualizadas em tubos de ensaio contendo vermiculita até $\frac{1}{4}$ do volume total dos tubos (figura 4.4) para medir a duração do período pupal. Após a emergência dos adultos, era realizada a sexagem dos mesmos.



Figura 4.4 – Tubo de ensaio no qual as larvas L3 dos muscóides eram individualizadas para que fosse realizada a sexagem.

Ao longo do experimento foram analisados o peso de larvas maduras, o período larval (L1 - L3) e pupal, a fase de larva a adulto e a emergência de adultos. Também foi contabilizada a viabilidade das larvas e dos adultos ao longo do experimento.

Para avaliar a longevidade das espécies e potencial biótico, foram observadas três gaiolas de madeira (para cada espécie) contendo cada uma 15 casais oriundos dos quatro recipientes, onde diariamente foi registrado o número de larvas depositadas em carne moída em estágio inicial de putrefação.

As curvas de sobrevivência para machos e fêmeas foram representadas pelo modelo de distribuição de Weibull, descrito por Sgrillo (1982). Os testes estatísticos foram realizados com o programa de computador InStat (versão 3.05, 2000) e Microsoft Office Excel 2010. O experimento foi realizado em câmara climatizada a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ de UR e 12 horas de fotofase.

4.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As larvas de *O. amorosa* foram mortas em água quente (75-80°C) por cinco minutos e fixadas com uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2. Posteriormente foram lavadas três vezes durante cinco minutos neste mesmo tampão. Depois, o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, mantido no escuro por uma hora e em seguida, o excesso do tetróxido de ósmio foi retirado através de lavagens com o tampão cacodilato de sódio 0,1M. A próxima etapa consistiu na desidratação das amostras, através de séries crescentes de acetona (7,5, 15, 30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo 10 minutos em cada concentração. Ao final desta etapa, as amostras foram submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂ superseco em aparelho de Balzers (Hayat 1970).

As pupas foram mantidas apenas congeladas, sem processo de fixação, pós-fixação e/ou secagem, devido a sua rigidez cuticular formada por quitina.

As larvas, pupas e adultos foram montados em suportes metálicos específicos ("Stubs"), aderidos em fita dupla-face, e cobertos por uma fina camada de ouro branco (20-30nm) para que permitisse sua visualização através do microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz. Foram utilizadas aproximadamente 15 larvas de cada estágio larval e 10 pupas. Algumas amostras foram cortadas com um bisturi transversalmente, para melhor visualização de suas ultraestruturas. As micrografias obtidas no microscópio foram transferidas diretamente ao computador.

A terminologia utilizada para a identificação dos imaturos segue a proposta por McAlpine (1981).

5. Resultados:

5.1. Aspectos bionômicos de *Sarcodexia lambens*

A viabilidade larval de *S. lambens* foi de 82%. O período larval médio foi de $3,51 \pm 0,99$ dias, variando de 2-7 dias (tabela 5.1).

Tabela 5.1: Duração e viabilidade dos estágios larvais de *Sarcodexia lambens* criadas em dieta à base de carne bovina putrefata a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	DURAÇÃO (DIAS)		VIABILIDADE (%)
	MÉDIA \pm DP	INTERVALO DE VARIAÇÃO	
ESTÁGIO LARVAL	$3,51 \pm 0,9$	2 - 7	82,00
ESTÁGIO PUPAL	$8,26 \pm 0,9$	6 - 12	65,24
FASE DE LARVA A ADULTO	$11,53 \pm 1,2$	9 - 15	54,50

DP = Desvio Padrão

As larvas maduras L3 de *S. lambens* abandonaram a dieta e iniciaram o processo de pupação com peso médio de $33,67 \pm 7,13$ mg, com mínimo de 16 mg e máximo de 51 mg (tabela 5.2). A média do peso das larvas maduras que originaram adultos machos foi de $35,18 \pm 6,22$ mg, variando de 22-48 mg e das fêmeas foi de $34,36 \pm 7,62$ mg, variando de 24-51 mg (tabela 5.2). Não foi verificado um valor significativo para distinguir machos de fêmeas pelo peso larval.

Tabela 5.2: Peso (mg) das larvas L3 de *Sarcodexia lambens* ao abandonarem a dieta à base da carne bovina putrefata.

LARVA MADURA	PESO (mg)	
	MÉDIA ± DP	INTERVALO DE VARIAÇÃO
FÊMEAS	34,36 ± 7,6	24 - 51
MACHOS	35,18 ± 6,2	22 - 48
FÊMEAS E MACHOS	33,67 ± 7,1	16 - 51

DP = Desvio Padrão

A viabilidade pupal foi de 65,24% (tabela 5.1). O período pupal médio durou $8,26 \pm 0,93$ dias, variando entre 6-12 dias (tabela 5.1).

A porcentagem sexual de machos e fêmeas emergidos foi, respectivamente, de 51,4 e 48,6%, com razão sexual de 0,48. O período de neolarva a adulto variou de 9-15 dias, apresentando tempo médio de $11,53 \pm 1,22$ dias e viabilidade de 54,5% (tabela 5.1).

O valor do teste qui-quadrado para machos foi de 0,1217 (não-significativo) e para fêmeas foi de 0,4642 (não-significativo), mostrando que a curva de sobrevivência para esses insetos seguem o modelo de distribuição de Weibull (figuras 5.1 e 5.2).

O tempo médio de longevidade para fêmeas e machos foi de $39,33 \pm 1,52$ e de $57,33 \pm 4,72$ dias, respectivamente, com o máximo de longevidade atingindo o 61º dia.

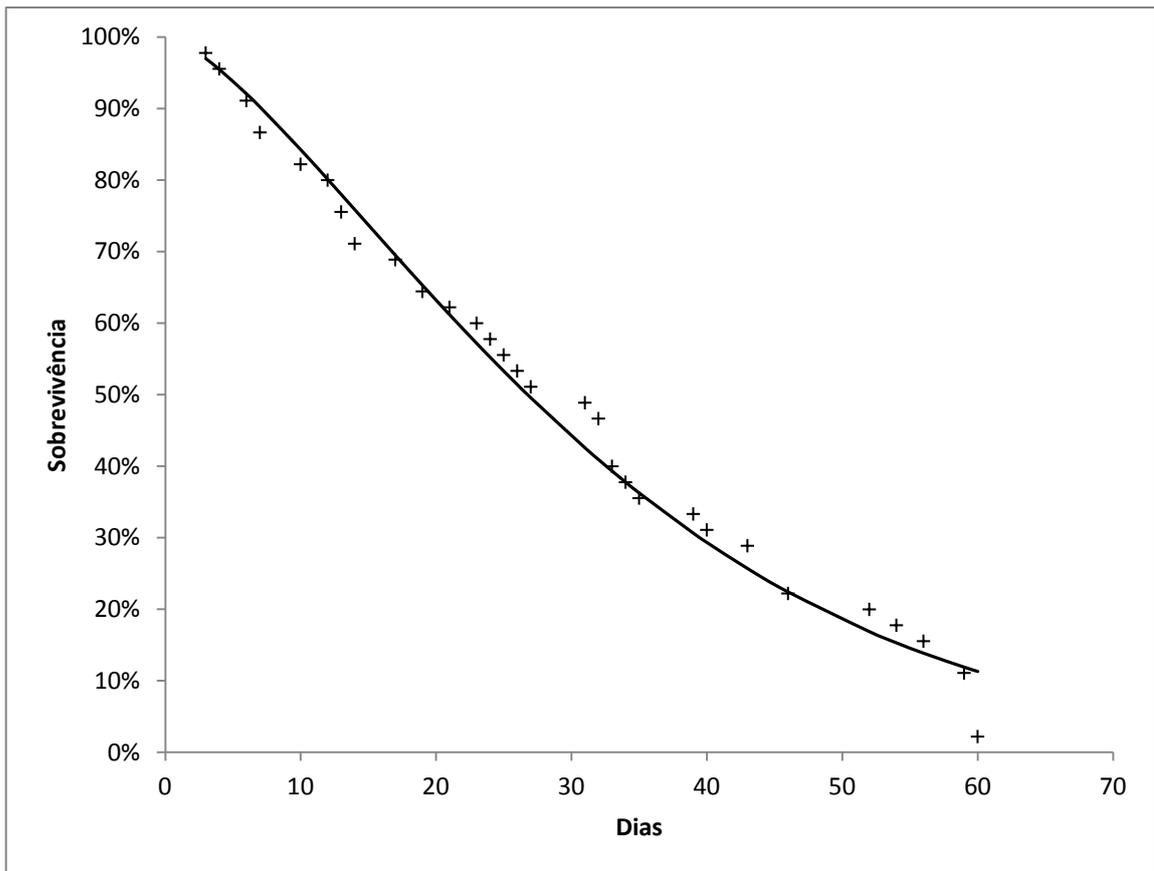


Figura 5.1 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para machos de *Sarcodexia lambens* [observado (cruzes); esperado (linha)] mantidos em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase).

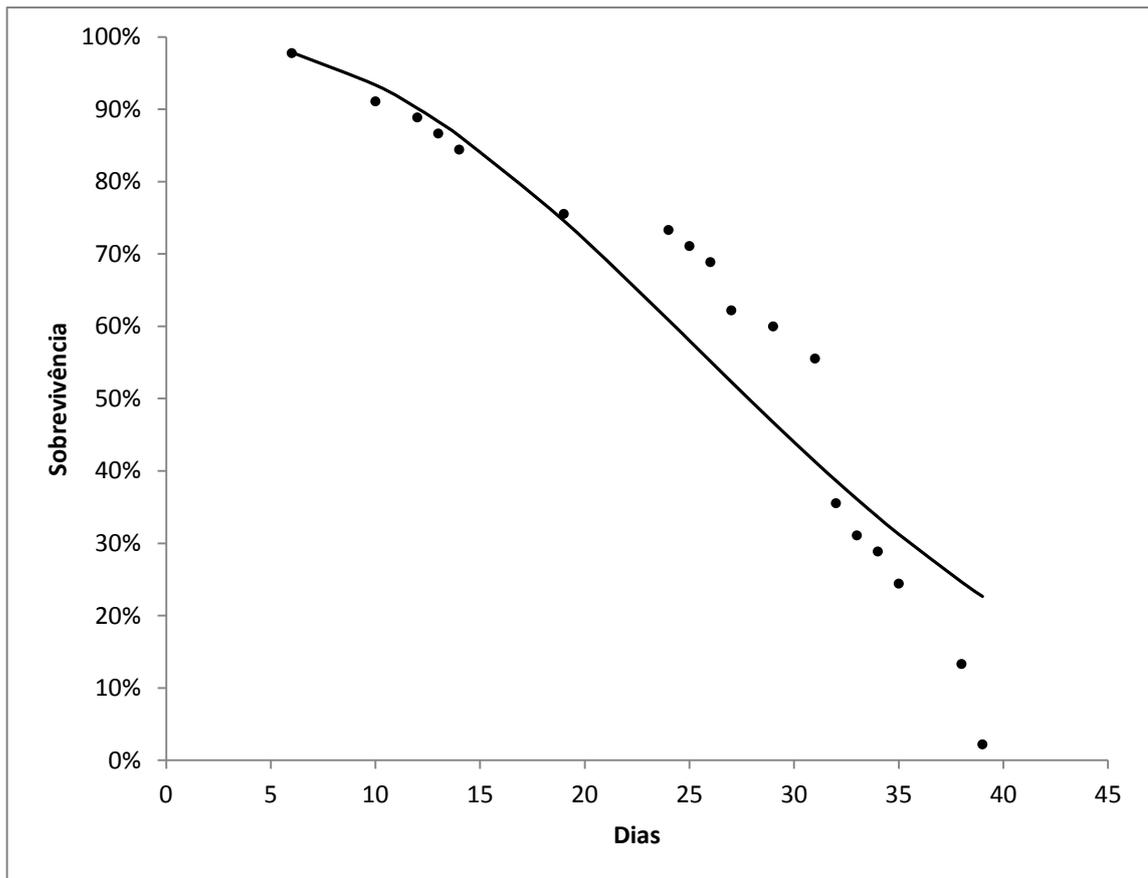


Figura 5.2 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para fêmeas de *Sarcodexia lambens* [observado (bolinhas); esperado (linha)] mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase).

Ao final do experimento foram contabilizadas 1433 larvas depositadas no substrato para postura à base de carne bovina moída putrefata, entre o 7^o e 38^o dia de observação, com o número de larvas depositadas por fêmea variando entre 0,38 e 10,17 (figura 5.3).

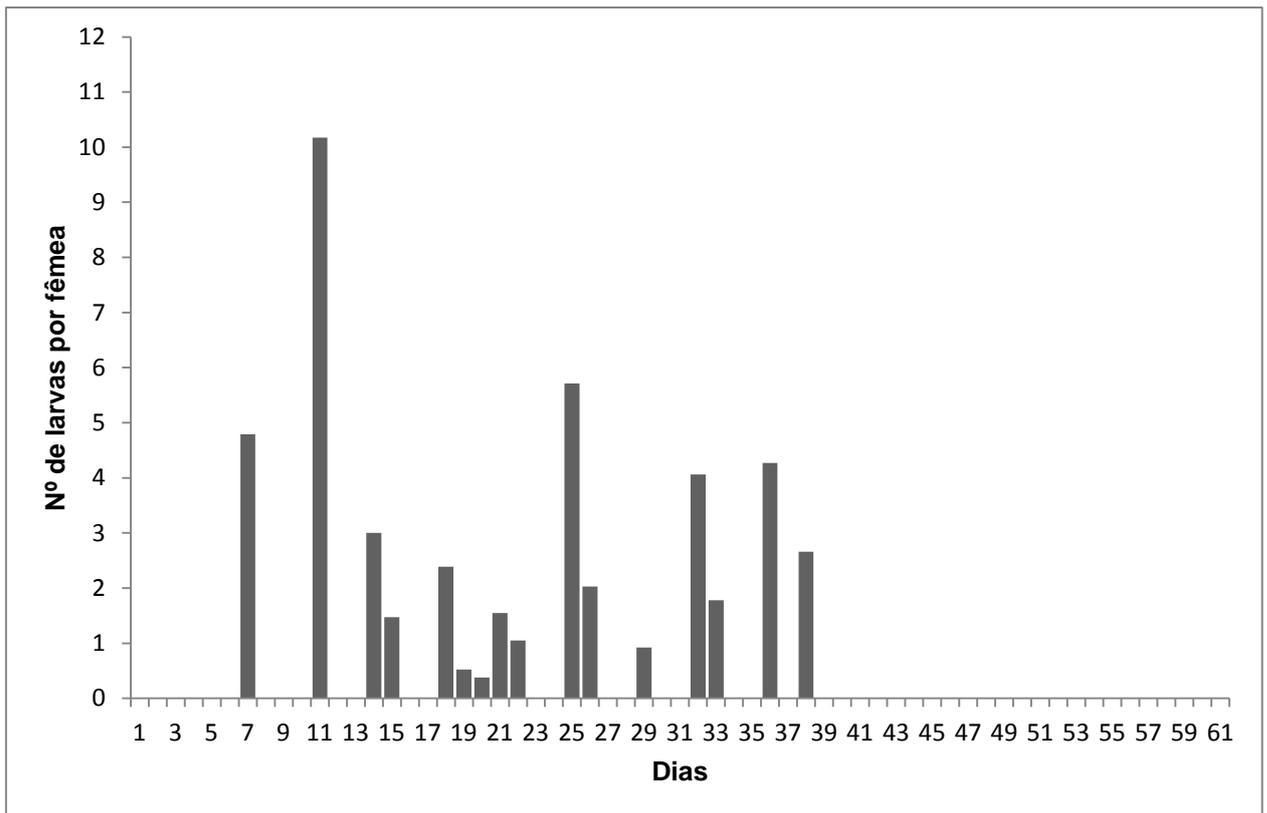


Figura 5.3 – Número de larvas depositadas por fêmeas de *Sarcodexia lambens* mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase) ao longo dos dias de observação.

5.2. Aspectos bionômicos de *Oxysarcodexia amorosa*

A viabilidade larval de *O. amorosa* foi de 76%, com um período larval de $3,51 \pm 0,64$ dias, apresentando intervalo de 3-6 dias (tabela 5.3).

Tabela 5.3: Duração e viabilidade dos estágios larvais de *Oxysarcodexia amorosa* criadas em dieta à base de carne bovina putrefata a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR.

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	DURAÇÃO (DIAS)		VIABILIDADE (%)
	MÉDIA \pm DP	INTERVALO DE	
		VARIAÇÃO	
ESTÁGIO LARVAL	3,51 \pm 0,64	3 - 6	76,00
ESTÁGIO PUPAL	10,14 \pm 0,63	9 - 11	88,15
FASE DE LARVA A ADULTO	13,60 \pm 0,69	12 - 16	67,00

DP = Desvio Padrão

As larvas maduras L3 abandonaram a dieta com um peso médio de $28,28 \pm 3,38$ mg, variando de 14-39 mg (tabela 5.4). Não foi observado nenhum peso limitante no processo de pupação, visto que houve emergência de moscas oriundas de larvas com o peso mínimo de 14 mg. A média do peso das larvas maduras que originaram adultos machos foi de $28,83 \pm 2,53$ mg, variando de 22-37 mg e das fêmeas foi de $28,28 \pm 3,33$ mg, variando de 14-33 mg (Tabela 5.4).

Tabela 5.4: Peso (mg) das larvas L3 de *Oxysarcodexia amorosa* ao abandonarem a dieta à base de carne bovina putrefata a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ UR.

LARVA MADURA	PESO (mg)	
	MÉDIA \pm DP	INTERVALO DE
		VARIAÇÃO
FÊMEAS	28,28 \pm 3,33	14 - 33
MACHOS	28,83 \pm 2,53	22 - 37
FÊMEAS E MACHOS	28,28 \pm 3,38	14 - 39

DP = Desvio Padrão

A viabilidade pupal foi de 88,15% com média de emergência de $10,14 \pm 0,63$ dias e mínimo de 9 e máximo de 11 dias (tabela 5.3).

A porcentagem de machos e fêmeas foi de 52,98 e de 47,01%, respectivamente, com razão sexual de 0,47. O tempo de neolarva a adulto

apresentou média de $13,60 \pm 0,69$ dias, variando de 12-16 dias e com uma viabilidade de 67% (tabela 5.3).

O valor do teste qui-quadrado para machos foi de 0,6641 (não-significativo) e para fêmeas foi de 1,6049 (não-significativo), mostrando que a curva de sobrevivência para esses insetos seguem o modelo de distribuição de Weibull (figura 5.3 e figura 5.4).

A longevidade média da espécie foi de $85,33 \pm 18,82$ dias, sendo a média de machos de $84,00 \pm 19,97$ dias e de fêmeas de $83,66 \pm 15,94$ dias. O dia máximo de longevidade foi de 107 dias.

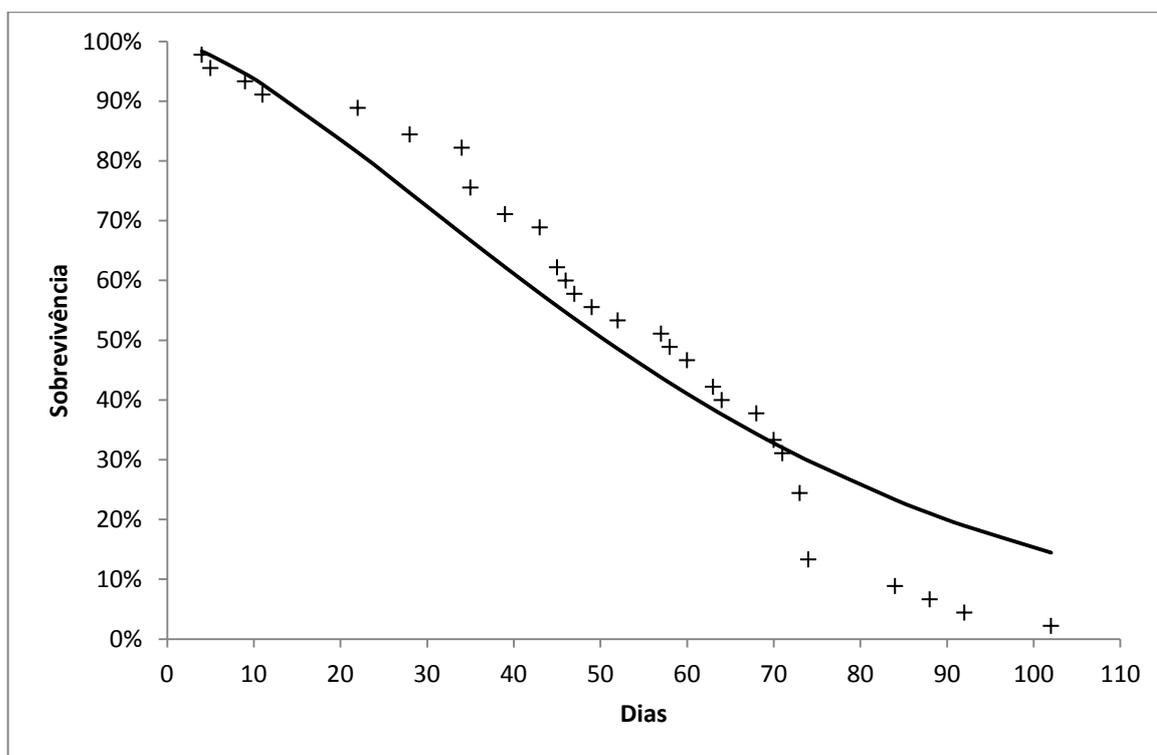


Figura 5.4 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para machos de *Oxysarcodexia amorosa* [observado (cruzes); esperado (linha)] mantidos em condições de laboratório ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase).

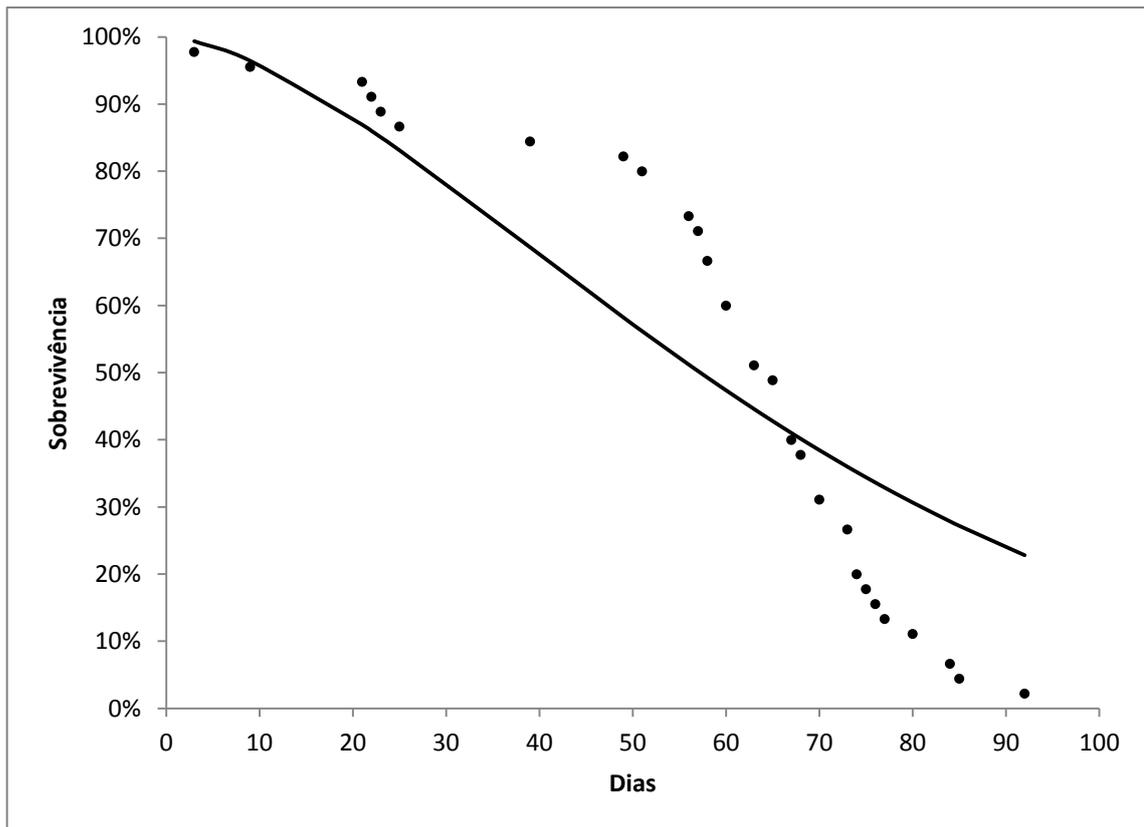


Figura 5.5 - Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull para fêmeas de *Oxysarcodexia amorosa* [observado (bolas); esperado (linha)] mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase).

Ao final do experimento foram contabilizadas 4781 larvas depositadas no substrato para postura à base de carne bovina moída putrefata, entre o 12º e 85º dia de observação, com o número de larvas depositadas por fêmea registrando mínimo de 0,33 e máximo de 12,07 no 29º dia.

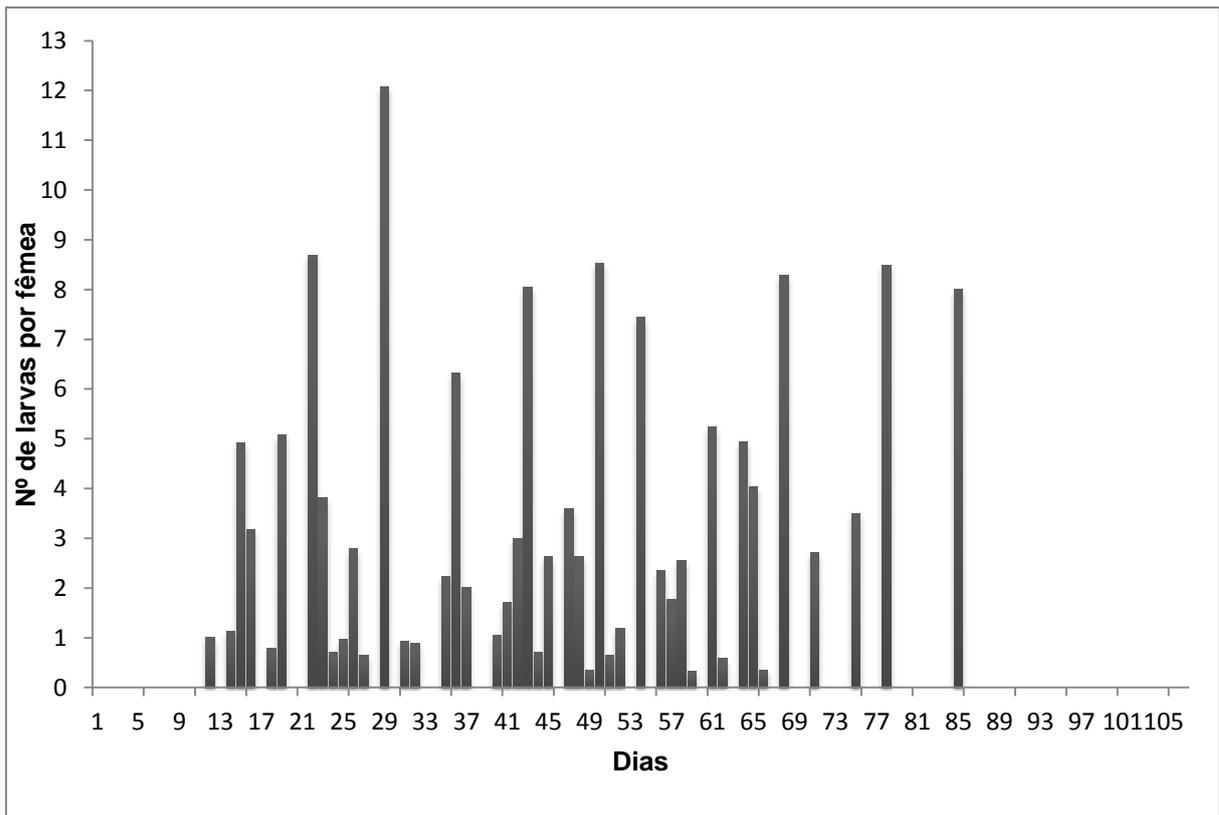


Figura 5.6 – Número de larvas depositadas por fêmeas de *Oxysarcodexia amorosa* mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $60 \pm 10\%$ UR e 12h de fotofase) ao longo dos dias de observação.

5.3. Caracterização morfológica através da microscopia eletrônica de varredura de *Oxysarcodexia amorosa*

5.3.1. Larva de segundo instar de *Oxysarcodexia amorosa*

O corpo da larva de segundo instar de *O. amorosa* apresenta um padrão vermiforme, em formato de cone, sendo a região anterior mais estreita e a região posterior mais robusta. A larva é composta por 13 segmentos, sendo um cefálico, três torácicos e nove abdominais, que são intercalados por fileiras de espinhos (figura 5.7A).

Na região cefálica encontram-se os órgãos sensoriais, como os palpos maxilares e as antenas. O primeiro segmento é dividido do segundo segmento pelo colar cefálico. As cristas orais localizadas nos palpos maxilares já se encontram

desenvolvidas na larva de segundo instar, bem como as antenas (figuras 5.7B e 5.7C). Nenhum gancho bucal foi observado na região cefálica das larvas, sugerindo que os dentes da larva de *O. amorosa* sejam curtos ou ausentes.

Na larva de segundo instar já é possível observar o espiráculo anterior, presente no primeiro segmento torácico (ou segundo segmento larval), compostos por 9-11 ramificações espiraculares, que apresentam uma abertura em sua região apical e estão dispostos em uma única fileira (figura 5.8A).

No último segmento do corpo da larva, um par de espiráculos posteriores apresentando duas aberturas cada um se encontra rodeado por tubérculos, denominados tubérculos circunspiraculares. Na região ventral encontram-se os tubérculos caudais, ainda em desenvolvimento. Os espiráculos posteriores estão localizados dentro do peritrema e este na placa espiracular em forma de D internalizada na região posterior (figura 5.8B) As larvas de segundo instar apresentam duas aberturas espiraculares que são abertas ou fechadas através dos músculos espiraculares (figura 5.8C).

5.3.2. Larva de terceiro instar de *Oxysarcodexia amorosa*

As larvas de terceiro instar de *O. amorosa* mantém o formato de cone de seu corpo, que diferem das larvas de segundo instar por serem maiores e mais pesadas, além de apresentarem um maior número de espinhos ao longo de todo o corpo.

Outra diferença para as larvas de segundo instar é que as larvas de terceiro instar apresentam uma região cefálica mais bem desenvolvida, com as cristas orais e palpos maxilares completamente formados. A coroa de espinhos da região cefálica também está mais visível e desenvolvida, com fileiras de espinhos que vão ficando mais grossos e densos ao se aproximarem do primeiro segmento torácico (figuras 5.9A, 5.9B e 5.9C).

O espiráculo anterior segue a mesma estrutura apresentada pelas larvas de segundo instar, porém as ramificações espiraculares estão mais ornamentadas e desenvolvidas (figura 5.10A).

Os tubérculos circunspiraculares da região terminal da larva de terceiro instar são mais desenvolvidos e maiores que os das larvas de segundo instar. Além disso, apresentam maior quantidade de espinhos em sua superfície. Da mesma forma, os tubérculos caudais se encontram totalmente formados. Na placa espiracular internalizada no último segmento caudal encontra-se os dois espiráculos posteriores localizados em peritremas incompletos, com três aberturas espiraculares cada um (figuras 5.10B e 5.10C).

5.3.3. Pupa de *Oxysarcodexia amorosa*

As pupas de *O. amorosa* são muito semelhantes às larvas de terceiro instar. No processo de pupação ocorre a esclerotização da cutícula, dando maior rigidez a pupa, porém, esta mantém o mesmo padrão de espinhos apresentado pelo instar anterior (figura 5.11A).

A região cefálica é retraída, de forma que não se pode mais observar estruturas como palpos maxilares, cristas orais ou antenas, deixando os espiráculos anteriores no limite da região apical (figuras 5.11B e 5.11C).

Na região posterior, o segmento anal está mais truncado e os tubérculos circunspiraculares e caudais diminuem de tamanho, servindo como proteção para a placa espiracular. Os espiráculos posteriores apresentam a mesma estrutura do instar anterior, com três fendas espiraculares (figuras 5.12A e 5.12B).

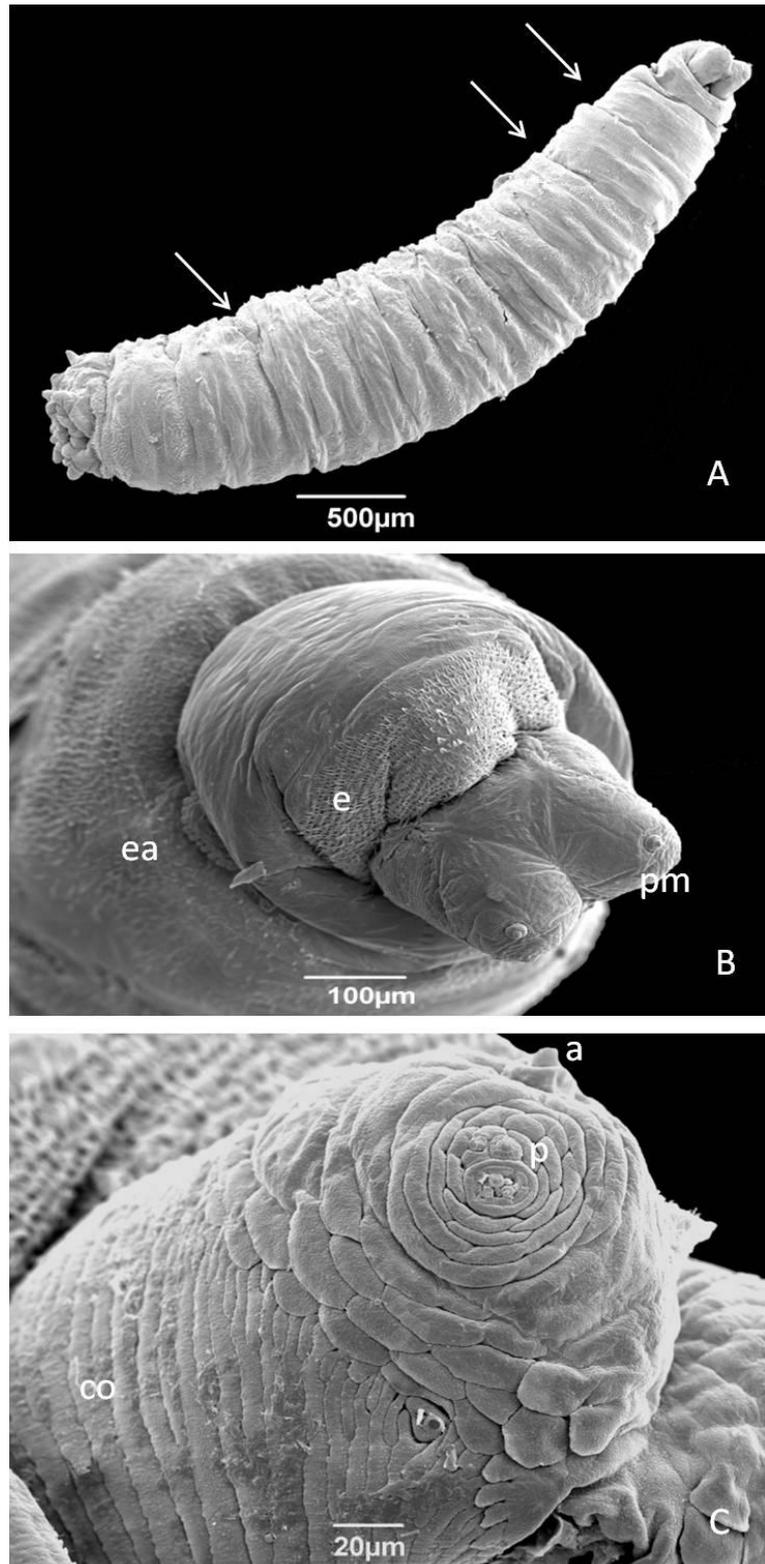


Figura 5.7 – Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando os segmentos (setas). B – Visão da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm) espinhos (e) e espiráculo anterior (ea). C – Visão detalhado do palpo maxilar, mostrando antena (a), cristas orais (co) e papilas (p).

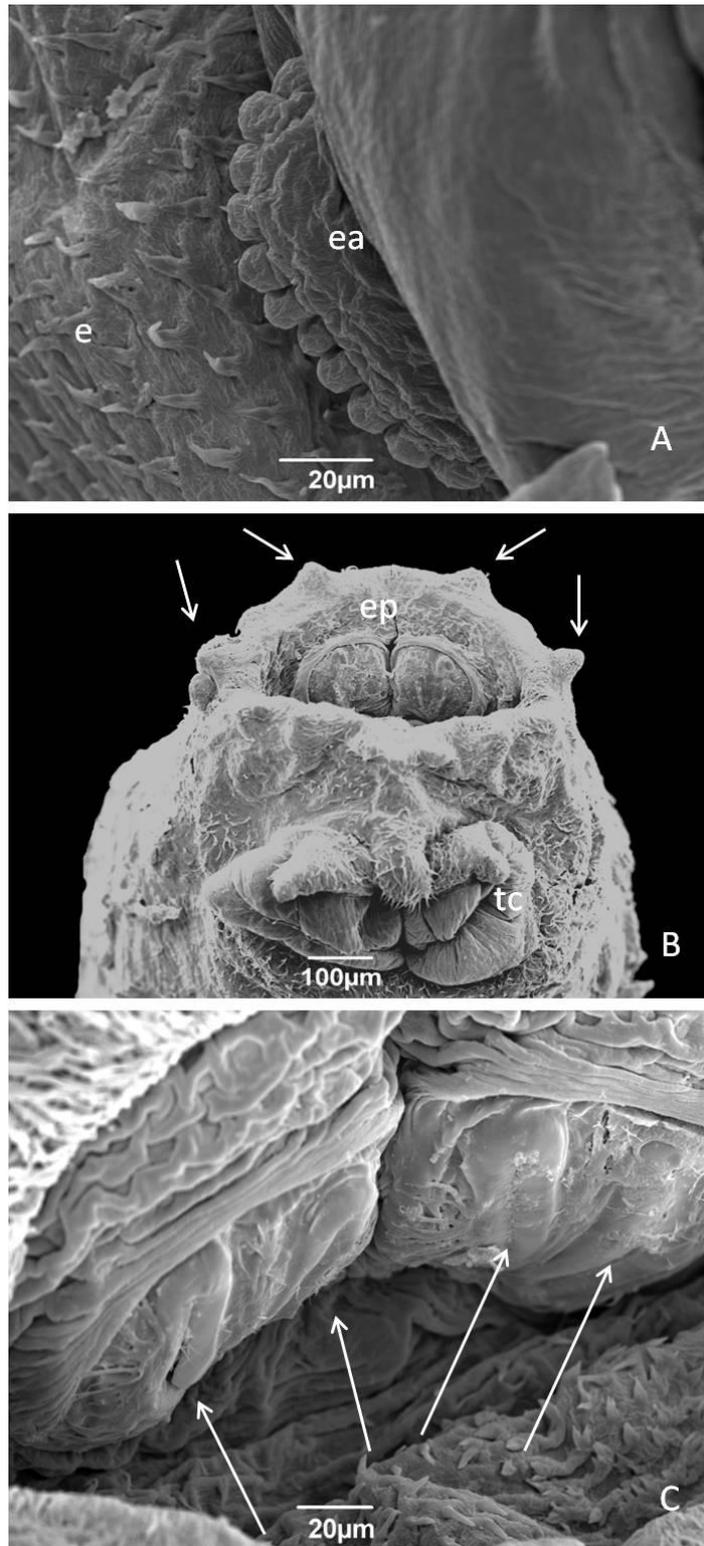


Figura 5.8 – Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão detalhada do espiráculo anterior (ea) e espinhos do primeiro segmento torácico (e). B – Visão da região posterior, mostrando os tubérculos circunspiraculares (setas), os espiráculos posteriores (ep) e os tubérculos caudais (tc). C – Visão detalhada das duas aberturas espiraculares (setas).

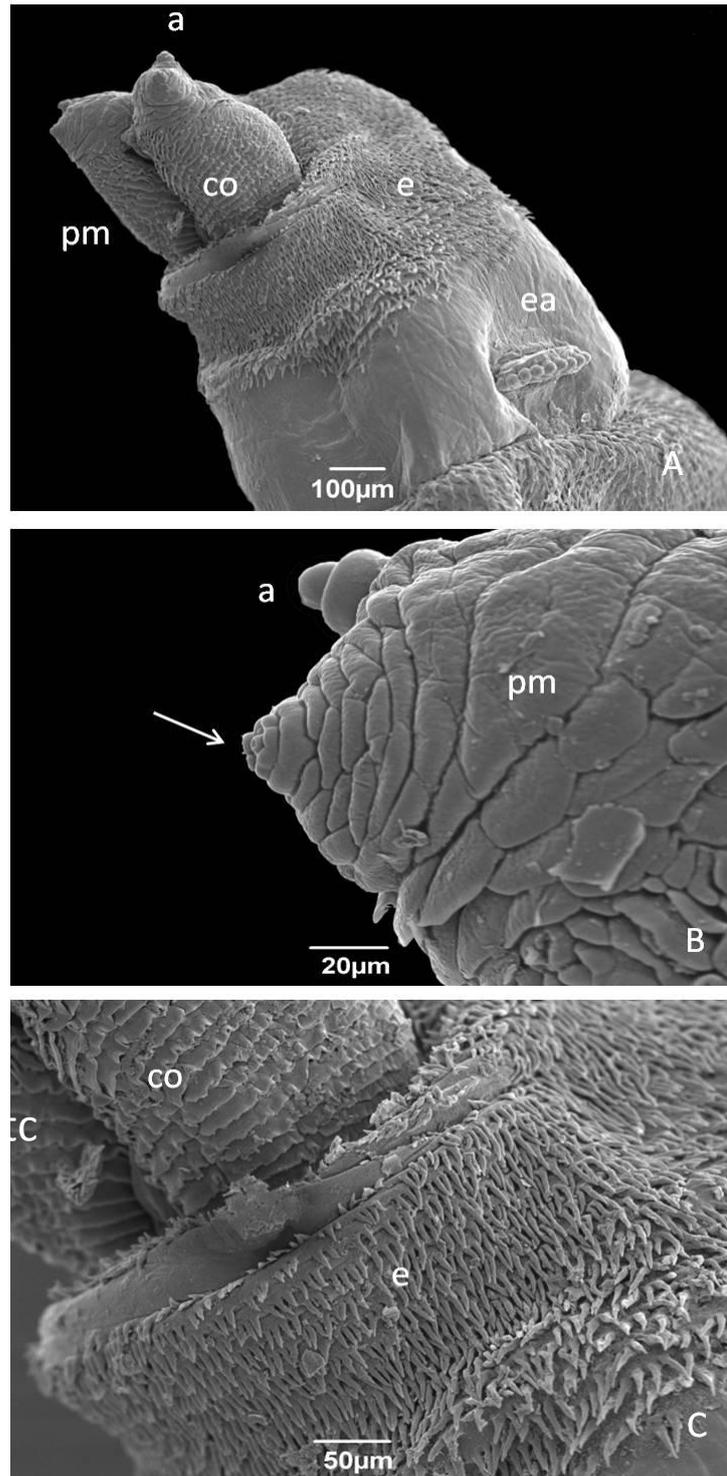


Figura 5.9 – Micrografia eletrônica de larvas de terceiro instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão detalhada da região cefálica, mostrando antena (a), cristas orais (co), palpo maxilar (pm), espinhos (e) e espiráculo anterior (ea). B – Visão detalhada do palpo maxilar (pm), mostrando antena (a) e papilas (setas). C – Visão detalhada evidenciando os espinhos do primeiro segmento torácico (e), abaixo das cristas orais (co).

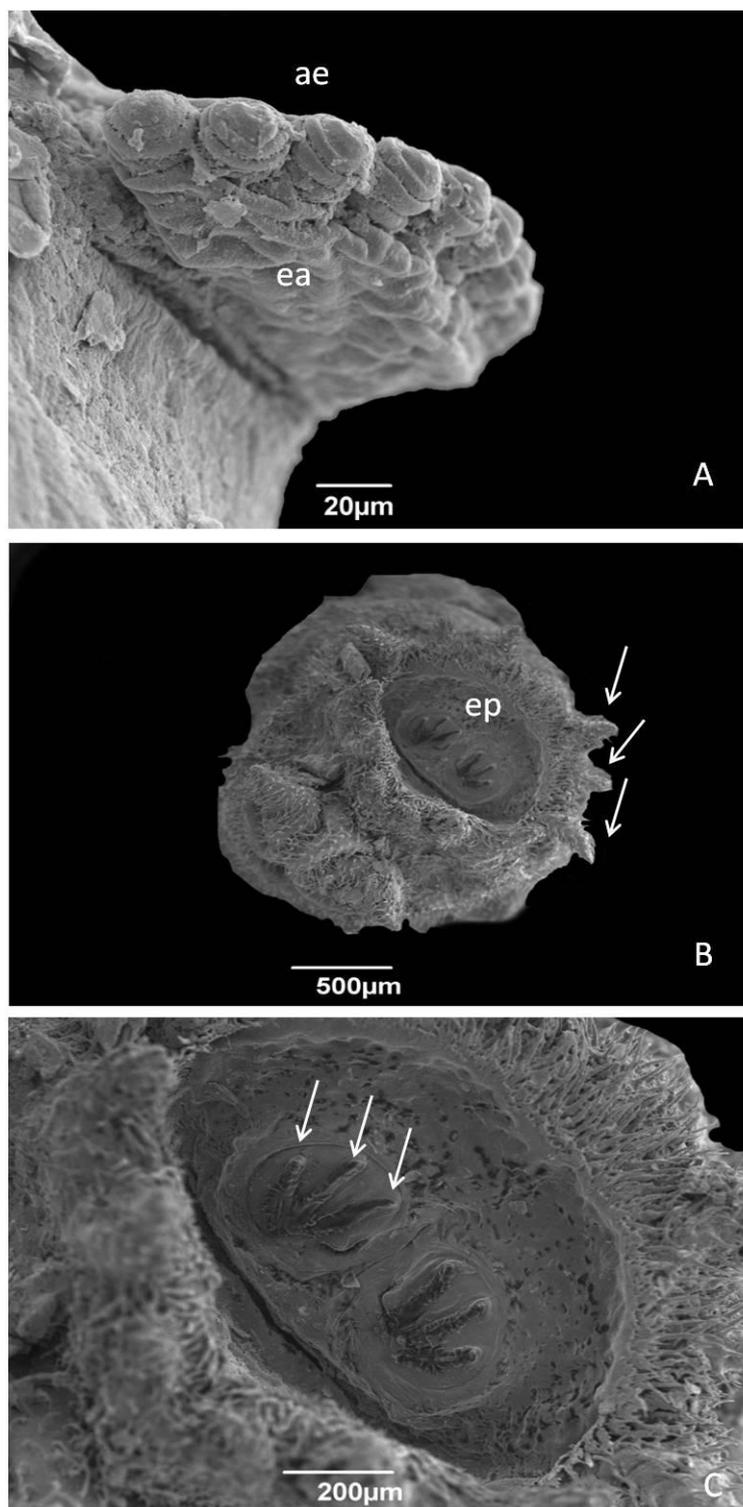


Figura 5.10 – Micrografia eletrônica de larvas de terceiro instar de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão detalhada do espiráculo anterior (ae), mostrando as aberturas espiraculares (ea). B – Visão da região posterior, mostrando os espiráculos posteriores (ep), os tubérculos circunspiraculares (setas) e os tubérculos caudais (tc). C – Visão detalhada das três aberturas espiraculares (setas).

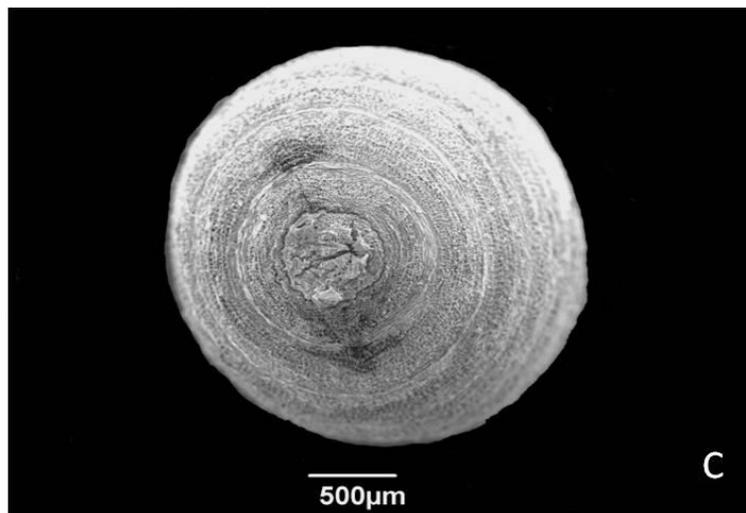
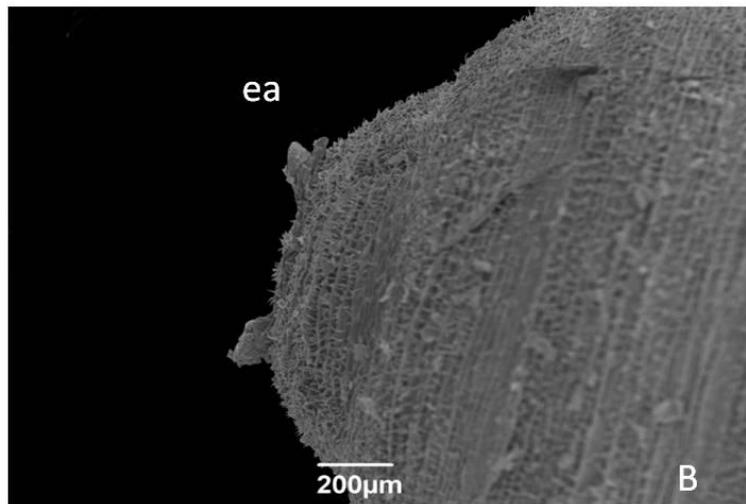
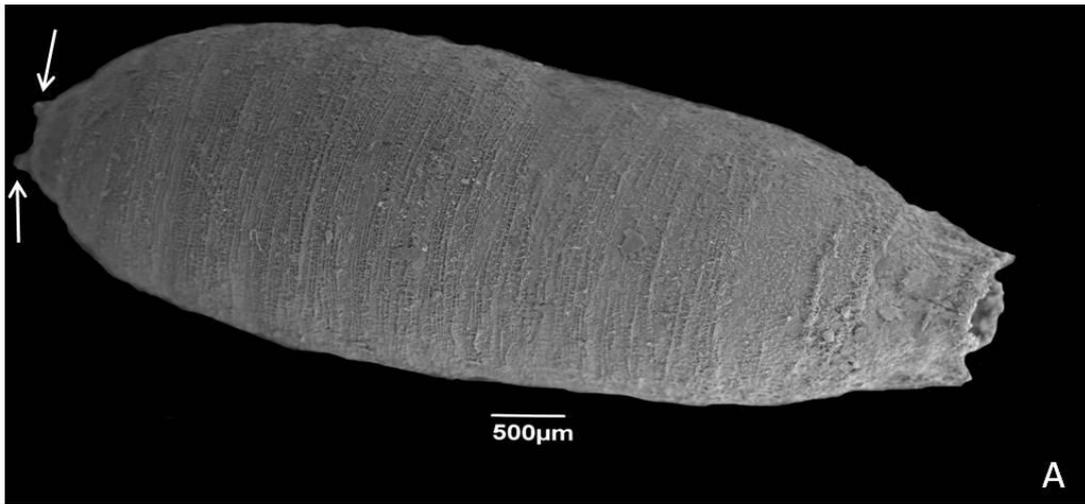


Figura 5.11 – Micrografia eletrônica de varredura da pupa de *Oxysarcodexia amorosa*. A - Visão geral da pupa, mostrando o espiráculo anterior (setas). B – Visão detalhada da região anterior, mostrando o espiráculo anterior (ea). C – Visão da região anterior, evidenciado a retração cefálica.

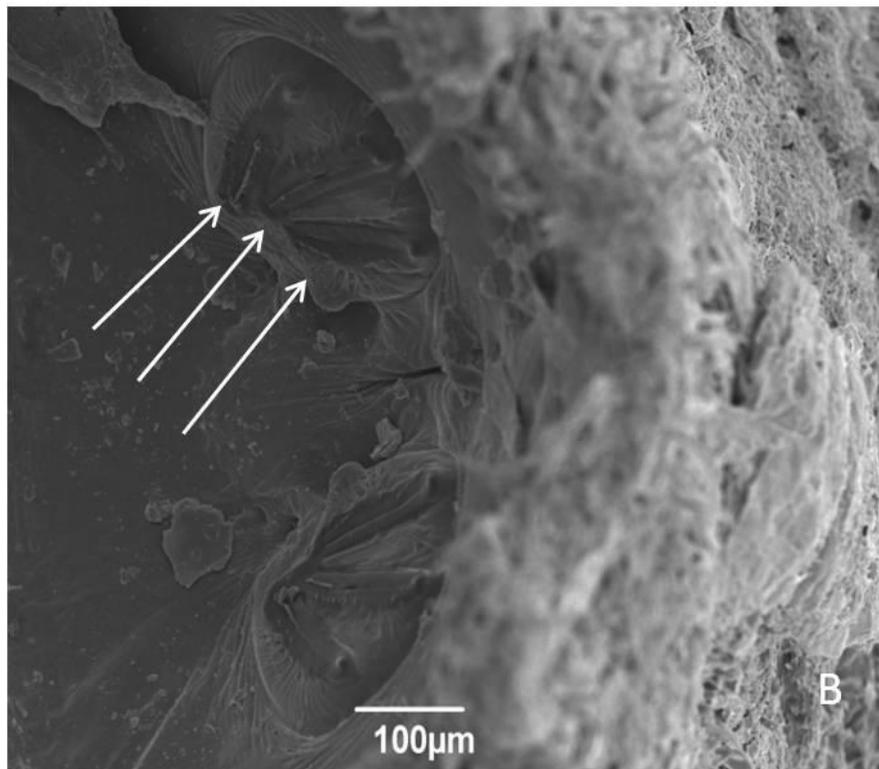
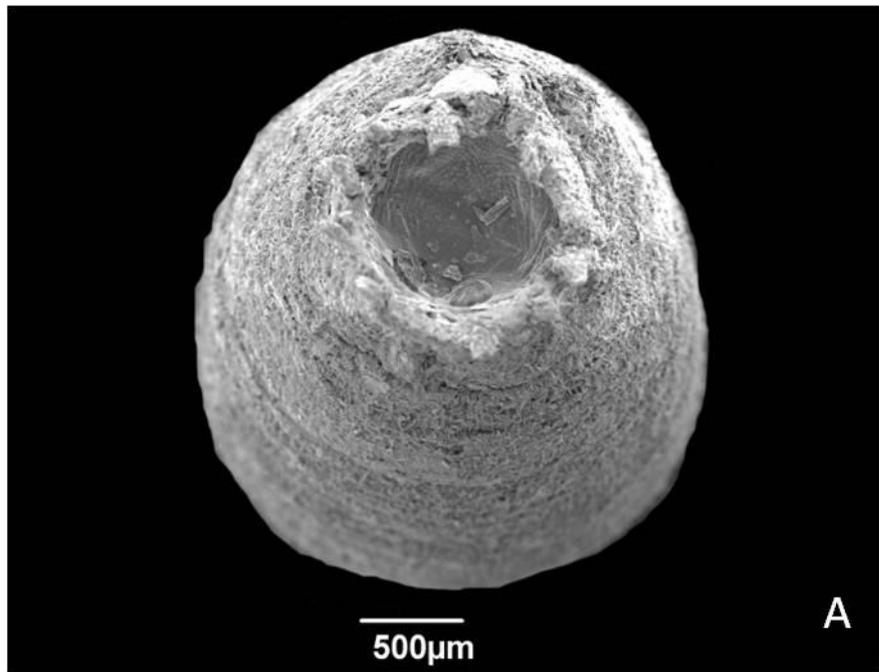


Figura 5.12 – Micrografia eletrônica de varredura da pupa de *Oxysarcodexia amorosa*. A – Visão da região posterior, mostrando a placa espiracular rodeada pelos tubérculos. B – Visão dos espiráculos posteriores e as três aberturas espiraculares (setas).

6. DISCUSSÃO

6.3. Bionomia das espécies

O número de trabalhos relacionados à bionomia de sarcófagídeos ainda é bastante reduzido, sendo inexistentes, até agora, trabalhos relacionados aos gêneros *Oxysarcodexia* e *Sarcodexia*.

Os estudos de bionomia de Salviano et al. (1996) obtiveram um valor de viabilidade larval de 89,82%, a 27°C, para *Peckia (Squamatodes) trivittata* (= *Squamatoides trivittatus*), enquanto que Madubunyl (1986) obteve 80,69%, a 23-28°C para *Sarcophaga (Bercaea) africa* (= *Sarcophaga haemorrhoidalis*).

A duração do período larval de *S. lambens* e *O. amorosa* não se assemelha aos resultados observados nos estudos de Salviano et al. (1996) sobre a biologia de *P. (S.) trivittata*, que durou 4,2 dias em temperatura de 27°C. Levot (1979) relatou a duração do estágio larval de 2,8 dias a 27 ± 1°C para *Sarcophaga (Liopygia) crassipalpis* (= *Parasarcophaga crassipalpis*) e Ferraz (1992) verificou que o período larval de *Peckia (Peckia) chrysostoma* foi 3,7 dias a 25,9°C e 3,9 dias a 27°C.

O peso médio de *P. (S.) trivittata* obtido por Salviano et al (1996) foi de 257 ± 33mg para machos e 238 ± 34mg para fêmeas. Em relação a *S. lambens* e *O. amorosa*, não foram verificados valores significativos para distinguir machos de fêmeas pelo peso larval.

As larvas com peso abaixo de 22mg de *S. lambens* chegaram a empupar, porém não houve a emergência, podendo ser considerado um peso limite para o desenvolvimento do adulto. A espécie *O. amorosa* não apresentou um peso limitante

observado no estudo, pois adultos emergiram de pupas com peso mínimo de 14mg. De acordo com Slansky e Scriben (1985), o tamanho e o peso do inseto adulto, são os dois principais fatores que influenciam seu desempenho. O tamanho influencia o comportamento de acasalamento e a dispersão. O peso revela a quantidade de energia e de nutrientes armazenados. Os dois fatores juntos podem influenciar a fecundidade final das moscas adultas.

Ainda em relação ao peso larval, Hanski (1987) afirmou que determinados dípteros necrófagos estão mais aptos a pupar ao apresentarem peso final abaixo dos valores padrões pré-estimados do que outras espécies. Esse fato, possivelmente, se dá como uma estratégia para minimizar os efeitos deletérios da competição. Williams e Richardson (1983) exemplificaram essa observação em seus estudos com *Calliphora erythrocephala* (Meigen, 1826) (Calliphoridae, Diptera), cujo peso mínimo crítico de pupas pode alcançar até 12% do seu peso padrão sem prejudicar a emergência dos adultos. Von Zuben (1992) observou que o resultado da competição larval por alimento de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Calliphoridae, Diptera) indica que apenas as larvas que ingerirem a quantidade de alimento que lhes permita atingir o peso mínimo necessário para a pupação, obtêm sucesso na sequência do seu ciclo de desenvolvimento.

Em relação à viabilidade pupal, Ferraz (1992) obteve 69,9% para *P. (P.) chrysostoma* a 25,9°C, semelhante ao obtido para *S. lambens*. Enquanto que Salviano et al. (1996) obtiveram uma viabilidade pupal de 92,75% para *P. (S.) trivittata*, a 27°C. Os estudos de Madubunyl (1986) com *S. (B.) africa* mostraram uma viabilidade pupal de 89,83%, a 23-28°C, coincidindo com os resultados obtidos para *O. amorosa*.

O período pupal médio de *O. amorosa* foi maior que o de *S. lambens*, assim como sua viabilidade. Salviano et al. (1996) obtiveram um valor para o período pupal de *P. (S.) trivittata* de $15,7 \pm 1,6$ dias. Alguns autores afirmam que o período pupal dos sarcófagídeos, em temperaturas próximas de 27°C, varia entre 10-20 dias (Nishida 1984; Jirón e Bolanos 1986; Ferraz 1992), o que faz com que o período pupal de *S. lambens* fique aquém do registrado por esses autores, mostrando que algumas espécies dessa família podem ter uma emergência de adulto mais precoce.

A razão sexual das duas espécies presentes neste estudo foi praticamente igual. Salviano et al. (1996) obtiveram uma porcentagem de 54,36% para machos e 45,64% de fêmeas para *P. (S.) trivittata*, o que sugere que entre os sarcófagídeos, normalmente, emerge um número maior de machos.

O período de neolarva a adulto e a sua porcentagem de viabilidade também foram maior em *O. amorosa*, quando comparado a *S. lambens*. Loureiro et al. (2005) observaram que o tempo de neolarva a adulto para *Peckia (Pattonella) intermutans* variou de 17-20 dias, sob as mesmas condições de temperatura e umidade. Gomes et al. (2003) para *P. (P.) chrysostoma*, também sob as mesmas condições de temperatura e umidade, relataram um período médio de neolarva a adulto de $19,33 \pm 1,59$ dias.

Em relação ao tempo médio de longevidade para fêmeas e machos, *O. amorosa* apresentou diferença significativa quando comparada com *S. lambens* e até mesmo outras espécies do gênero *Peckia*. Salviano et al. (1996) obtiveram uma média de longevidade para *P. (S.) trivittata* de $11,9 \pm 1,1$ dias para fêmeas e $14,7 \pm 1,3$ dias para machos, indicando que, a 27°C, *O. amorosa* e *S. lambens* possuem longevidade mais elevada, quando comparada com *P. (S.) trivittata*.

As fêmeas de *S. lambens* apresentaram um pico de mortalidade mais acentuado a partir do 30º dia, enquanto os machos tiveram um declínio mais homogêneo ao longo dos dias, não apresentando valores que significassem algum pico de mortalidade. Em relação a *O. amorosa*, as fêmeas apresentaram um pico mais evidente de mortalidade a partir do 59º dia, enquanto o número de machos começou a decair mais visivelmente a partir do 73º dia. Nas duas espécies estudadas, os machos tiveram uma longevidade maior que as fêmeas, sendo que para *O. amorosa*, essa longevidade foi quase a mesma, não podendo ser considerada como um padrão. Estes resultados não são semelhantes aos estudos de Ferraz (1992) para *P. (P.) chrysostoma*, que obteve uma longevidade maior em fêmeas. Salviano et al. (1996) obtiveram uma longevidade maior em fêmeas de *P. (S.) trivittata* sob temperatura de 16°C, enquanto que a 27°C, a mesma espécie apresentou maior longevidade de machos. A razão para isso pode estar relacionada com o fato de que a 27°C ocorre um maior desgaste nas fêmeas devido ao aumento do metabolismo. Salviano et al. (1996) também destacaram que a menor

longevidade das fêmeas pode ser decorrente ao desgaste pelo desenvolvimento ovariano.

O número de larvas depositadas por *O. amorosa* foi mais de três vezes maior do que o número de larvas depositadas por *S. lambens*. Essa fertilidade elevada pode estar relacionada ao fato de que *O. amorosa* apresentou um maior número de larviposições, além de uma maior longevidade de fêmeas, mostrando ter um potencial biótico muito maior do que *S. lambens*.

Interessante observar que apesar de possuir um maior potencial biótico, *O. amorosa* demorou quase o dobro do tempo de *S. lambens* para realizar a primeira larviposição, o que pode sugerir, como *S. lambens* tem um curto intervalo de larviposição, que o processo de maturação ovariana e a realização de cópulas ocorram muito mais rápido para essa espécie, quando comparada à *O. amorosa*.

6.4. Microscopia eletrônica de varredura

Por ser uma espécie ovovivípara, a visualização dos ovos das moscas da família Sarcophagidae ocorre apenas quando as fêmeas grávidas são dissecadas em laboratório (Lopes e Leite 1989). O período entre o primeiro estágio larval (L1) e o segundo (L2) é muito rápido, onde a neolarva depositada no substrato em questão de minutos passa para o estágio L2. Desta forma, a obtenção da larva de primeiro instar normalmente se dá espremendo o abdome de fêmeas grávidas e matando as larvas imediatamente em água quente. A morfologia do ovo e das larvas de primeiro instar de *O. amorosa* serão descritas futuramente.

A estrutura geral das larvas de *O. amorosa* observadas ao MEV é semelhante àquela relatada para outras espécies de dípteros muscóides, apresentando corpo vermiforme em formato de cone, sendo a extremidade mais fina responsável por abrigar as estruturas cefálicas, enquanto a extremidade mais truncada abriga as estruturas anais, bem como o espiráculo posterior (Guimarães e Amorim 2006).

O formato de cone das larvas, segundo Greenberg e Kunich (2002), é ergonomicamente mais eficiente para que elas possam se enterrar no substrato

arenoso para iniciar o processo de pupação, bem como facilita a alimentação nos tecidos.

Na região cefálica das larvas de segundo instar de *O. amorosa* encontram-se os órgãos sensoriais. Diferente de algumas espécies de sarcófagídeos, como *Parasarcophaga dux*, por exemplo, *O. amorosa* não possui ganchos bucais (ou maxilas). Sukontason et al. (2003) descreveram grandes e achatados ganchos bucais em *P. dux*. Vairo (2010) também relatou a presença de ganchos bucais em seu trabalho com a caracterização morfológica de *S. lambens*. Dessa forma, *O. amorosa* possui uma estrutura maxilar semelhante a observado por Lopes e Leite (1986) e Leite e Lopes (1987) para outras espécies do gênero *Oxysarcodexia*, como *O. paulistanensis*, *O. thornax* e *O. confusa*, apresentando dentes curtos e em menor número, de difícil visualização.

Uma importante característica que pode ser usada para identificação de espécies de moscas é o espiráculo anterior (Guimarães e Amorim 2006), visualizado a partir do segundo instar larval. Segundo Kitching (1976), o espiráculo anterior é composto por ramificações espiraculares ou papilas dispostas em fileiras (lineares ou de forma irregular) que podem variar 1 a 30 ou mais. Em *O. amorosa* o número de ramificações espiraculares variou de 9 a 11 ramificações, dispostas numa única fileira. As poucas ramificações dessa espécie coincidem com os resultados de Uni et al. (1999) para *Sarcophaga (Liopygia) crassipalpis* que encontraram de 11 a 12 ramificações. Vairo (2010) obteve um número que variou de 11 a 13 ramificações espiraculares em *S. lambens*. Nos estudos de Leite e Lopes (1987) com *O. confusa*, os autores obtiveram de 10 a 12 ramificações, resultado bem próximo ao obtido em nossos estudos. Ruiz-Martinez et al. (1989) relataram que *Wohlfahrtia magnifica* apresenta 5 ou 6 ramificações espiraculares.

Porém, poucos sarcófagídeos apresentam um número pequeno de ramificações espiraculares. *P. dux* apresenta uma variação de 14 a 17 ramificações, distribuídas no espiráculo anterior através de apenas uma fileira (Sukontason et al, 2003). Ishijima (1967) observando diversas espécies de sarcófagídeos obteve resultados diferentes para o número de ramificações espiraculares, como por exemplo: *Parasarcophaga albiceps* (32-38), *P. orchidea* (28-34 e duas fileiras de ramificações), *P. shiritakaensis* (46-49), *Robineauella scoparia* (48-54),

Boettcherisca peregrina (24-26 e duas fileiras de ramificações) e *B. septentrionalis* (28-30 e duas fileiras de ramificações). Desta forma, o número de papilas e seus arranjos no espiráculo anterior podem ser usados para distinguir alguns gêneros, porém é muito difícil identificar uma espécie apenas com base nessas características.

Mendonça et al. (2010) em seus trabalhos com Calliphoridae, afirmam que uma das melhores características para identificar as espécies de dípteros muscóides é através do colar cefálico. *O. amorosa* apresenta um colar cefálico mais largo do que o colar observado nos estudos de Sukontason et al. (2003) com *P. dux*. Além disso, diferente de *P. dux* que possui espinhos mais uniformes, os espinhos do colar cefálico de *O. amorosa* começam finos e pequenos e vão engrossando, crescendo e se achatando até se aproximar ao primeiro segmento torácico. Estes espinhos de *O. amorosa* possuem pontas simples, diferente do que foi observado por Mendonça et al. (2010) para *Chrysomya albiceps*, no qual os espinhos desta espécie apresentavam em suas extremidades pontas duplas.

Em relação ao espiráculo posterior, localizado no último segmento larval, este se encontra no peritrema de forma incompleta, ou seja, não sendo um peritrema completamente fechado em um círculo. O peritrema circula as aberturas espiraculares. Segundo Guimarães e Amorim (2006), as larvas de moscas de primeiro instar apresentam uma abertura espiracular, as larvas de segundo instar apresentam duas aberturas e as larvas de terceiro instar, tal como as pupas, apresentam três aberturas.

A placa espiracular, onde estão localizados os peritremas, em Sarcophagidae encontra-se mais internalizada no último segmento, dificultando, em alguns casos a sua observação. Essa é uma característica importante para diferenciar sarcófagídeos de outras famílias (Leite e Lopes 1987), como Calliphoridae, que apresentam uma placa mais visível e mais externa (Queiroz et al. 1997). A placa espiracular de *O. amorosa* corrobora com essa afirmação, sendo encontrada internalizada no último segmento.

As características morfológicas das larvas de terceiro instar são semelhantes com as características das pupas, sendo a única diferença o endurecimento da

cutícula e a retração da região cefálica. Em uma cena de crime, são mais comumente encontrados os pupários, pois o corpo já se encontra em um estágio avançado de decomposição. Sendo assim, a identificação correta das pupas auxilia na estimativa do IPM.

7. CONCLUSÕES

✓ A espécie *S. lambens* obteve uma viabilidade larval maior que *O. amorosa*, porém a duração do período larval foi a mesma. A viabilidade pupal e o período pupal de *O. amorosa* foi maior do que o obtido para *S. lambens*.

✓ A espécie *O. amorosa* apresentou maior fase de neolarva a adulto, porém tanto ela como *S. lambens* mostraram uma baixa viabilidade total (de neolarva a adulto) sob as condições estabelecidas.

✓ Não foi possível diferenciar o sexo dos adultos pelo peso das larvas maduras. Não houve emergência de adultos de *S. lambens* de larvas que empuparam com peso menor que 22mg.

✓ A espécie *O. amorosa* obteve longevidade muito maior que *S. lambens*, porém não houve diferença de longevidade entre machos e fêmeas. Os machos de *S. lambens* obtiveram uma longevidade maior que as fêmeas.

✓ Por viverem mais tempo, dentro das condições laboratoriais do experimento, as fêmeas de *O. amorosa* depositaram muito mais larvas que *S. lambens*.

✓ O maior pico de postura de *S. lambens* foi no 11º dia, enquanto que o de *O. amorosa* foi no 29º dia.

✓ A microscopia eletrônica de varredura é capaz de mostrar estruturas importantes para a taxonomia da forma imatura, como os espinhos do colar cefálico.

✓ Os espiráculos anteriores de *O. amorosa* seguem o padrão de outras espécies do mesmo gênero, com ramificações espiraculares variando de 9-12 dispostas em uma única fileira, cujo número não permite a caracterização de espécies.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amendt J, Krettek R, Zehner R. Review Forensic Entomology. *Naturwiss* 2004. 91: 51-65.

Barbosa RR, Mello-Patiu CA, Mello RP, Queiroz MMC. New records of calyptrate dipterans (Fanniidae, Muscidae and Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009. 104: 923-926.

Barros RM, Mello-Patiu CA, Pujol-Luz JP. Sarcophagidae associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Rev Bras Entomol* 2008. 52: 606-609.

Benecke M, Josephi E, Zweihoff R. Neglect of Elderly: Forensic Entomology Cases and Considerations. *For Sci Int* 2004. 165: 195-199.

Bourel B, Tournel G, Hedouin V, Deveaux M, Goff LM, Gosset D. Morphine Extraction in Necrophagous Insects Remains for Determining Ante-mortem Opiate Intoxication. *For Sci Int* 2001. 120: 127-131.

Campobasso CP, Di Vella G, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *For Sci Int* 2001. 120: 18-27.

Campobasso CP, Gherardi M, Caligara M, Sironi L, Introna F. Drug Analysis in Blowfly Larvae and in Human Tissues: a Comparative Study. *Int J Leg Med* 2004. 118: 210-214.

Carvalho CJB, Mello-Patiu, CA. Keys to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol* 2008. 52: 390–406.

Carvalho LML, Linhares AX. Seasonality of insect successions and pig carcass decomposition on a natural forest area in Southeastern Brazil. *J For Sci* 2001. 46: 604-608.

Carvalho LML, Thyssen PJ, Linhares, AX, Palhares, FAB. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000. 95: 135:138.

d'Almeida JM, Lopes HS. Sinantropia de dípteros muscóides (Calliphoridae) no Estado do Rio de Janeiro. *Arq Uni Fed Rural do Rio de Janeiro* 1983. 6: 39-48.

d'Almeida JM. Substratos utilizados para a criação de dípteros caliptrados no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (RIO-ZOO). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989. 84: 257-264.

d'Almeida JM. Substratos utilizados para a criação de dípteros caliptrados em uma área urbana do Município do Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988. 83: 201-206.

d'Almeida JM. Substratos utilizados para a criação de Dípteros Caliptrados em uma Área Rural do Estado do Rio de Janeiro. *Arq Uni Fed Rural do Rio de Janeiro* 1986. 9: 13-22.

Denno RF, Cothran WR. Competitive interactions and ecological strategies of Sarcophagid and Calliphorid flies inhabiting rabbit carrion. *Ann Entomol Soc Am* 1976. 69: 109–113. 289–285.

Dias ES, Neves DP, Lopes HS. Estudos sobre a fauna de Sarcophagidae (Diptera) de Belo Horizonte. I. Levantamento taxonômico e sinantrópico. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1984. 79: 83-91.

Erzinçlioglu YZ. The application of entomology to forensic medicine. *Med Sci Law* 1983. 23: 228-230.

Ferraz MV. Estudos comparados do desenvolvimento biológico e do comportamento de *Peckia chrysostoma* (Wiedemann, 1830) e *Adiscochaeta ingens* (Walker, 1849) (Diptera: Sarcophagidae) em condições de laboratório. Tese de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1992.

Ferreira MJM. Sinantropia de dípteros muscóides de Curitiba, Paraná II. Sarcophagidae. Rev Bras Biol 1979. 39: 773-81.

Fessl B, Couri MS, Tebbich S. *Philornis downsi* Dodge & Aitken, new to the Galapagos Islands (Diptera, Muscidae). Studia dipterologica 2001. 8: 317-322.

Freitas MG, Costa HMA, Costa JO, Ilde P. Entomologia e Acarologia médica e veterinária. Belo Horizonte. Precisa Ed. Gráfica 1982. 133-173p.

Gagliano-Candela R, Aventaggiato L. The Detection of Toxic Substances in Entomological Specimens. Int J Legal Med 2001. 114: 197-203.

Goff ML, Lord WD. Entomotoxicology: A New Area for Forensic Entomology. Am J For Med Path 1994. 15: 51-57.

Gomes CM, d'Almeida JM, Santos JAA. Avaliação do efeito do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* (Euphorbiaceae), no desenvolvimento pós embrionário de *Peckia chrysostoma* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Sarcophagidae), em condições de laboratório. Entomol Vect 2003. 10: 109-120.

Greenberg B, Kunich JC. Entomology and the law: Flies as forensic indicators. Cambridge University Press 2002.

Greenberg B, Povolny O. Bionomics of flies. In: B. Greenberg. Flies and disease. Ecology, classification and biotic associations. New Jersey, Princeton 1971. 56-83.

Greenberg B, Singh D. Species identification of Calliphorid (Diptera) eggs. J Med Entomol 1995. 32: 21-26.

Greenberg B, Szyska ML. Immature Stages and Biology of Fifteen Species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). Ann Entomol Soc Am 1984. 77: 488-517.

Greenberg B. Flies and disease. Ecology: classification and biotic association. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ 1971.

Guimarães JH, Amorim, DS. Diptera. In: Costa C, Ide S, Simonka CE, orgs. Insetos imaturos: metamorfose e identificação. São Paulo, Holos 2006.

Guimarães JH, Papavaro N. Myiasis in man and animals in the neotropical region. Curitiba, PR. Ed. Plêiade 1999.

Guimarães JH, Papavero N, Prado AP. As Miíases na Região Neotropical. Rev Bras Zool 1983. 1: 239-416.

Hanski I. Nutritional ecology of dung- and carrion-feeding insects. In: Nutritional ecology of insects, mites, spiders, and related invertebrates. John Wiley & Sons, New York 1987.

Hayat MA. Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications (Vol. 1). Van Nostrand Reinhold, New York. 1970.

Henssge C, Althaus L, Bolt J, Freisleder A, Haffner HT, Henssge CA, Hoppe B, Schneider V. Experiences with a compound method for estimating the time since death. II. Integration of non-temperature-based methods. Int J Legal Med 2000. 113: 320-31.

Higley LG, Haskell NH. Insect development and forensic entomology. In: Forensic Entomology: the utility of arthropods in legal investigations. Boca Raton: CRC Press. 2001.

Introna F, Campobasso CP, Goff LM. Entomotoxicology. For Sci Int 2001. 130: 42-47.

Ishijima H. Revision of the third stage larvae of synanthropic flies of Japan. J Sanit Zool 1967. 18: 47-100.

Jirón LF, Bolaños R. Biology and larval morphology by scanning electron microscopy of *Panttonella intermutans* Walker (Diptera, Sarcophagidae). Rev Bras Entomol 1986. 30: 27-30.

Jirón LF, Cartín VM. Insect succession in the decomposition of a mammal in Costa Rica. J New York Entomol Soc; 1981. 89: 245-50.

Kashyap VP, Pillai VV. Efficacy of entomological method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. For Sci Int 1989. 40: 245-50.

Keh B. Scope and applications of forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 1985. 30: 137-154.

Kitching RL. The immature stages of the Old-world screwworm fly, *Chrysomya bezziana velleuneuve*, with comparative notes on other Australasian species of *Chrysomya*. *Bull Entomol Res* 1976. 66: 195-203.

Leandro MJF, d'Almeida JM. Levantamento de Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae em um fragmento de mata na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia* 2005. 95: 377-381.

Leão RNQ, Fraiha Neto H, Cruz JPN, Tibana R. Miíase uretal por *Sarcodexia lambens* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Sarcophagidae). Relato de um caso amazônico. *Rev Para Med* 1996. 10: 27-29.

Leite ACR, Lopes HS. Second contribution to the knowledge of the larvae Raviniini (Diptera, Sarcophagidae) based on observations using scanning electron microscope. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987. 82: 219-226.

Levot GW, Brown KR, Shipp E. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. *Bull Ent Res* 1979. 69: 469-475.

Linhares, AX. Synantropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Bras Entomol São Paulo*. 1981. 25: 189-215.

Liu D, Greenberg B. Immature stages of some flies of forensic importance. *Ann Entomol Soc Am*. 1989. 82: 80-93.

Lopes HS, Leite ACR. Morphology of the egg of *Sarcodexia lambens* (Diptera: Sarcophagidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1989. 84: 497-500.

Lopes HS, Leite ACR. Studies on some features of the first instar larvae of *Oxysarcodexia* (Diptera, Sarcophagidae), based on scanning electron microscope observations. *Rev Bras Biol* 1986. 46: 741-746.

Lopes HS. Collecting and rearing Sarcophagidae flies (Diptera) in Brazil, during forty years. *An Acad Bras Cien* 1973 45: 279-291.

Lopes HS. The importance of the mandible and clypeal arch of the first instar larvae in the classification of the Sarcophagidae (Diptera). Rev Bras Entomol 1982. 26: 293-326.

Lord WD, Stevenson JR. Directory of forensic entomologists. 2 ed. Misc. Publ. Armed Forces Pest Mgt. Board, Washington, D.C 1986. 42.

Loureiro MS; Oliveira VC, d'Almeida JM. Desenvolvimento pós- embrionário de *Pattonella intermutans* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae) em diferentes dietas. Rev Bras Entomol 2005. 49: 127–129.

Madubunyl LC. Laboratory life history parameters of the red-tailed fleshfly, *Sarcophaga haemorrhoidalis* (Fallen) (Diptera: Sarcophagidae). Insect Sci Appl 1986. 7: 617-621.

Marchenko MI. Medicolegal importance of the cadver entomofauna for the determination of the time of death. Forensic Sci Int 2001. 120: 89-109.

McAlpine JF, Peterson BV; Shewell GE, Teskey JH, Vockeroth JR, Wood DM. Manual of Nearctic Diptera, Vol. 1. Ottawa, Research Branch, Agriculture Canada, Monograph 1981.

McAlpine JF, Wood DM. Manual of Nearctic Diptera, Vol. 3. Ottawa, Research Branch, Agriculture Canada, Monograph 1989.

Mello-Patiu CA, Soares WF, Silva KP. Espécies de Sarcophagidae (Insecta: Diptera) registradas no Estado do Rio de Janeiro. Arq Museu Nacional 2009. 67: 173-188.

Mendonça PM, Santos-Mallet JR, Queiroz MMC. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae), a fly specie of forensic importance. Microsc Res Tech 2010. 73: 779–784.

Monteiro-Filho EA, Penereiro, J. Estudo da decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Biol 1987. 47: 289–295.

Moretti TC. Artrópodes associados às carcaças de pequenos roedores expostas em área de formação vegetal secundária no município de Campinas, SP. Dissertação de mestrado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2006.

Moura MO, Carvalho CJB, Monteiro-Filho ELA. A Preliminary Analysis of Insects of Medical-Legal Importance in Curitiba, State of Parana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997. 92: 269-274.

Mulier PB; Mariluis JC; Patitucci LD. Review of the Sarcophaginae (Diptera: Sarcophagidae) of Buenos Aires Province (Argentina), with a key and description of a new species. Zootaxa 2010. 2575:1–37.

Nishida K. Experimental studies on estimation of postmortem interval by means of fly larvae infesting human cadavers. Nippon-Hoigaku-Zasshi 1984. 38: 24-41.

Oliveira MS, Mello RP, Queiroz MMC. Morfologia e duração dos instares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em laboratório. Rev Bras Entomol 2007. 51: 239-245.

Oliveira-Costa J, Mello-Patiu CA, Lopes SM. Dípteros muscóides associados com cadáveres humanos na cena da morte no estado do Rio de Janeiro - Brasil. Bol Mus Nac Zoo 2001. 464: 1-6.

Pape T. Catalogue of the Sarcophagidae of the world (Insecta: Diptera). Mem Entomol International 1996. 8: 1-558.

Payne JA. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. Ecology 1965. 46: 592-602.

Peterson RD, Newman SM. Chorionic structure of the egg of the screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) J Med Entomol 1991 28: 152–160.

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

Queiroz, SMP, Carvalho CJB. Chave pictórica e descrição de larvas de 3º instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fanniidae) em Vazadouros de Resíduos Sólidos Domésticos em Curitiba, Paraná. An Soc Entomol Bras 1987. 16: 265-288.

Ruiz-Martinez I, Soler-Cruz MD, Benitez-Rodriguez R, Perez-Jimenez JM, Diaz-Lopez M. Postembryonic development of *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862) (Diptera: Sarcophagidae). J Parasitol 1989. 75: 531-539.

Salviano RJB, Mello RP; Beck LCNH, d'Almeida JM. Aspectos Bionômicos de *Squamatoides trivittatus* (Diptera, Sarcophagidae) sob condições de laboratório. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996. 91: 249–254.

Sgrillo RB. A distribuição de Weibull como modelo de sobrevivência de insetos. Ecosystema 1982. 7: 9-13.

Shewell GE. Sarcophagidae, p. 1159–1186, In: McAlpine (ed.). Manual of Nearctic Diptera. Agriculture Canada 1987. 2: 657

Slansky, F, Scriber, JM. Food consumption and utilization. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol. III, Oxford, Pergamon Press 1985.

Smith KGV. A Manual of Forensic Entomology, British Museum (Natural History). Cornell Uni Press, London 1986.

Souza AM, Linhares AX. Diptera and coleoptera of potential forensic importance in Southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. Med Vet Entomol 1997. 11: 8-12.

Sukontason K, Sukontason KL, Boonchu N, Chaiwong T, Piangjai S. Ultrastructure of eggshell of *Chrysomya nigripes* Aubertin (Diptera: Calliphoridae). Parasitol Res 2004a. 93: 151–154.

Sukontason K, Sukontason KL, Piangjai S, Choochote W, Boonchu N, Chaiwong T, Kurahashi, H. Fine structure of the eggs of blowflies *Aldrichina grahmi* and *Chrysomya pacifica* (Diptera: Calliphoridae). Biol Res 2004b. 37: 437–483.

Sukontason KL, Sukontason, K, Piangjai S, Chaiwong T, Boonchu N, , Kurahashi,H, Vogtsberger, RC. Larval ultrastructure of *Parasarcophaga dux* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae). Micron 2003. 34: 359–364.

Thompson FC. Biosystematic Database of World Diptera. Version 7.5, <http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera//biosys.htm>. 2006. Acessado em 10 de janeiro de 2012.

Thyssen PJ, Linhares AX. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). Biol Res 2007. 40: 271-280.

Tibana R, Mello CA. O sintergito 6+7 das fêmeas de *Oxysarcodexia* Townsend, 1917 (Dipt.Sarcop.). Rev Bras Biol 1985. 45: 439–445.

Townsend, CHT. A scorpion parasite. J Inst Jamaica 1983. 1: 221.

Uni S, Shinonaga S, Nishio Y, Fukunaga A, Iseki M, Okamoto T, Ueda N, Miki T. Ophthalmomyiasis caused by *Sarcophaga crassipalpis* (Diptera: Sarcophagidae) in a hospital patient. J Med Entomol 1999. 36: 906-908.

Vairo, KP. Caracterização das larvas de *Sarcodexia lambens* (Diptera: Sarcophagidae): uma espécie de importância médica e forense. Monografia (Especialização em Entomologia Médica e Acarologia). Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Rio de Janeiro 2010.

Vairo KP, Silveira B, Mello-Patiu CA, Carvalho CJB. Distribuição temporal e fauna de Sarcophagidae (Diptera) associada a decomposição de *Oryctolagus cuniculus* em duas estações climáticas em Curitiba, Paraná. In: XXVIII Congresso Brasileiro de Zoologia, Belém, Pará. Resumos do XXVIII Congresso Brasileiro de Zoologia 2010.

Von Zuben CJ. Competição larval em *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae): Estimativa de perdas em biomassa e na fecundidade e cálculo de conversão de alimento em biomassa. Rev Bras Entomol 1993. 37: 793-802.

Williams H, Richardson AMM. Life history response to larval food shortage in four species of necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae). Aust J Ecol 1983. 8: 257-263.

Zumpt F. Myiasis in man and animals in the old world. Butterworths, London 1965.