

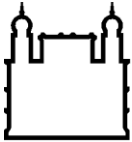
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO, MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE VARREDURA E SEQUÊNCIAS DE DNA DE
DÍPTEROS MUSCOIDES DA FAMÍLIA SARCOPHAGIDAE DE
IMPORTÂNCIA MÉDICA-VETERINÁRIA E FORENSE**

ALEXANDRE DA SILVA XAVIER

Rio de Janeiro
Maio de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALEXANDRE DA SILVA XAVIER

Desenvolvimento pós-embriônico, microscopia eletrônica de varredura e sequências de DNA de dípteros muscoides da família Sarcophagidae de importância médica-veterinária e forense

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

Orientador (es): Prof^a. Dr^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz
Prof. Dr. Fernando Araújo Monteiro

RIO DE JANEIRO

Maio de 2016

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

X3 Xavier, Alexandre da Silva

Desenvolvimento pós-embrionário, microscopia eletrônica de varredura e sequências de DNA de dípteros muscoides da família Sarcophagidae de importância médica-veterinária e forense / Alexandre da Silva Xavier. – Rio de Janeiro, 2016.

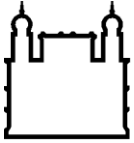
xxi, 139 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 122-138

1. Diptera. 2. Sarcophagidae. 3. Bionomia. 4. Sequências de DNA. 5. Entomologia forense. I. Título.

CDD 595.774



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: ALEXANDRE DA SILVA XAVIER

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE
VARREDURA E SEQUÊNCIAS DE DNA DE DÍPTEROS MUSCOIDES DA FAMÍLIA
SARCOPHAGIDAE DE IMPORTÂNCIA MÉDICA-VETERINÁRIA E FORENSE**

ORIENTADORES: Prof^a. Dr^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Prof. Dr. Fernando Araújo Monteiro

Aprovada em: 18/05/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Viviane Zahner - (IOC-FIOCRUZ) - Presidente

Prof. Dr. Rubens Pinto de Mello (IOC/FIOCRUZ) - Membro

Prof. Dra. Janyra Oliveira Costa (Instituto de Criminalística Carlos Éboli/ICCE) - Membro

Prof. Dra. Maria Luíza Fellipe Bauer (IOC/FIOCRUZ) – Suplente

Prof. Dra. Marise Maleck (Universidade Severino Sombra/USS – Vassouras, RJ) – Suplente

Rio de Janeiro, 18 de maio de 2016

Agradecimentos

O resultado final dessa tese só foi possível devido a diferentes tipos de ajudas que eu tive durante sua realização. Ajudas acadêmicas, científicas, técnicas, filosóficas, “espirituais” e motivacionais. Sendo assim, gostaria de agradecer a todos aqueles que me ajudaram e me inspiraram, seja de forma direta ou indiretamente.

Agradeço, primeiramente e acima de tudo, à minha família pelo apoio incondicional, por entender que a vida de quem faz ciência no Brasil não é fácil e por sempre ser minha inspiração e meu porto seguro.

Agradeço à Raquel, minha namorada, companheira, amiga, ajudante, incentivadora e musa inspiradora. Sua força de vontade e sua disposição para fazer mil coisas ao mesmo tempo me inspiraram e me mostraram que eu também consigo.

Agradeço à Dr^a. Margareth Queiroz, minha orientadora, professora, amiga, incentivadora, e por ter sido fundamental no caminho que escolhi trilhar. Obrigado pelas oportunidades, pela confiança e por todo apoio.

Agradeço ao Dr. Fernando Monteiro, pela orientação e por ter cedido o espaço em seu laboratório para que parte desta tese fosse realizada.

Agradeço à Dr^a. Viviane Zahner, pelo comprometimento ao ler a tese e pela revisão, dicas e sugestões, além de toda paciência em me ajudar com minhas dúvidas ao longo dos experimentos.

Agradeço aos amigos e colegas (pesquisadores, pós-doutorandos, doutorandos, mestrandos e alunos de iniciação científica) do Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF), por tornar meus dias lá agradáveis e divertidos e, principalmente, pelas ajudas nas coletas, pelos conselhos e pelos ensinamentos.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Barbosa, pelo auxílio e ensinamentos na identificação das espécies, pela ajuda durante as coletas e por compartilhar comigo a paixão pela música, cerveja, Fluminense e Sarcophagidae.

Agradeço à Dr^a. Teresa Fernandes, por toda atenção e dedicação ao me ajudar com dicas e com materiais e por sempre fazer comidas maravilhosas.

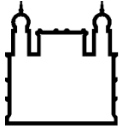
Agradeço à Dr^a. Cátia Antunes de Mello-Patiu, pela identificação de algumas das espécies presentes nesta tese.

Agradeço à CAPES, pelo apoio financeiro (ao projeto Capes Parasitologia Básica: Processo Nº 23038.008374/2011-11) e pelos poucos atrasos no pagamento da bolsa.

E por fim, gostaria de agradecer também à coordenação de pós-graduação e à secretaria acadêmica do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), à Plataforma de Microscopia Rudolf Barth e à Plataforma de Sequenciamento de DNA pelo apoio, simpatia e por terem sido fundamentais para o desenvolvimento desta tese.

*“For long you'll live and high you'll fly
And smiles you'll give and tears you'll cry
And all you touch and all you see
Is all your life will ever be”*

(Pink Floyd, Breathe, 1973)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

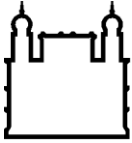
DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO, MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E SEQUÊNCIAS DE DNA DE DÍPTEROS MUSCOIDES DA FAMÍLIA SARCOPHAGIDAE DE IMPORTÂNCIA MÉDICA-VETERINÁRIA E FORENSE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Alexandre da Silva Xavier

As moscas Sarcophagidae, além de vetores mecânicos, agentes irritantes ou espoliadores e produtores de miíases ao homem ou animais, são importantes indicadores forenses. O cálculo para estimativa do intervalo pós-morte (IPM) pode ser feito relacionando a idade de imaturos coletados no cadáver com dados disponíveis na literatura sobre a biologia da espécie. A família Sarcophagidae é uma das que apresentam um maior potencial informativo para análises forenses, porém a morfologia de muitos imaturos não é conhecida. Isto obriga a sua criação em laboratório para, após a emergência do inseto adulto macho, ser realizada a identificação. Técnicas taxonômicas, como a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o *DNA barcoding* utilizando como marcador molecular um fragmento do gene mitocondrial COI são importantes ferramentas para auxiliar na rápida identificação destas espécies, sem a necessidade de aguardar a criação em laboratório. Além disso, métodos moleculares carregam a vantagem de obter a identificação da espécie através de fragmentos de insetos coletados numa cena de crime. Os poucos dados referentes às espécies de Sarcophagidae, principalmente na Região Neotropical, faz com que seja necessária a maior quantidade possível de informações a respeito desta família que possam vir a ser úteis para a entomologia forense. Objetivou-se aumentar o banco de dados de informações sobre espécies de Sarcophagidae que apresentam importância ou potencial importância médica-veterinária e forense através da descrição da bionomia de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*, da ultraestrutura de imaturos (L1, L2, L3 e pupário) de quatro espécies e da eficiência do *DNA barcoding* para identificação precisa e rápida de 12 espécies coletadas em diferentes regiões. Em relação à bionomia, *P. (E.) anguilla*, apresentou a 27 °C viabilidade larval de 84 % e o período de L1 até L3 de 6,61 dias. As larvas L3 iniciaram o processo de pupa com peso médio de 131,17 mg. O período pupal médio foi de 13,47 dias com viabilidade de 91,6 %. O período de neolarva a adulto foi de 22,62 dias e 77 % de viabilidade. A longevidade média dos machos foi de 24,89 dias e das fêmeas foi de 32,6 dias, as quais depositaram 1326 larvas ao longo de 20 dias. O corpo das larvas das espécies estudadas segue o padrão vermiforme típico de muscoides, com 12 segmentos. A região anterior é pontiaguda, enquanto a região posterior é mais robusta. Os espinhos do colar cefálico de *Ravinia belforti*, com pontas duplas, triplas ou quádruplas, se mostraram diferentes dos espinhos das demais espécies estudadas. O espiráculo anterior apresentou fileiras regulares para as espécies *P. (E.) anguilla* e *P. (E.) collusor* e irregulares em *P. (Pattonella) intermutans* e *R. belforti*. Dentre as quatro espécies, *R. belforti* foi a que mais apresentou características que a diferenciam das demais espécies estudadas. Em relação ao *DNA barcoding* foi sequenciado um fragmento do gene COI de 635pb. Das 12 espécies analisadas, cinco não encontraram correspondentes no BLAST. O COI foi capaz de identificar corretamente as 12 espécies mesmo quando oriundas de populações diferentes. Estes dados são importantes para estudos sobre entomologia forense relacionados com sarcófagídeos que ocorrem no Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

POSTEMBRYONIC DEVELOPMENT, SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND DNA SEQUENCES OF FLESH FLIES (DIPTERA: SARCOPHAGIDAE) OF MEDICAL-VETERINARY AND FORENSIC IMPORTANCE

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

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. The postmortem interval is related to the age of immature species of flies found on corpses and can be estimated using data available in the literature on the biology of the species. Sarcophagidae is one having a higher potential information for forensic analysis. As the morphology of many immature Sarcophagidae is unknown, these immature forms must be collected and characterized after the emergence of the adult male. Taxonomic techniques such as scanning electron microscopy (SEM) and DNA barcoding using as a molecular marker a COI mitochondrial gene fragment are important tools to assist in a rapid regardless to wait for the rearing in laboratory. Moreover, molecular methods carry the advantage of obtain a species identification through the insect fragments collected at a crime scene. The few data about flesh flies in the Neotropical region makes the greatest possible amount of information about this family is required, which may be useful for forensic entomology. This work aims to increase the database information about flesh flies with medical-veterinary and forensic importance or potential importance through the bionomy of *Peckia (Euboettcheria) anguilla*, the ultrastructure analysis of the immature (L1, L2, L3 and puparium) of four species and the efficiency validation of DNA barcoding for a precise identification of 12 species collected in different states of Brazil. Regarding bionomy, *P. (E.) anguilla* (at 27 °C) showed a larval viability of 84 % and L1-L3 period of 6.61 days. Larvae L3 began the process of pupa with an average weight of 131.17 mg. The average pupal period was 13.47 days with viability of 91.6 %. Neolarva-Adult period was 22.62 days with viability of 77 %. The longevity of males was 24.89 days and females was 32.6 days, which deposited 1326 larvae along 20 days. The larval body of the four species studied follows the typical wormlike pattern of muscoid, with 12 segments. The anterior region is narrower than the posterior region. The spines of cephalic collar of *Ravinia belforti* (with double, triple or quadruple points) were different from the spines of the other species studied. The anterior spiracles presented regular rows for *P. (E.) anguilla* and *P. (Euboettcheria) collusor* and irregular rows for *P. (Pattonella) intermutans* and *R. belforti*. The flesh fly *R. belforti* showed characteristics that differentiate it from the other species studied. With respect to DNA barcoding, a fragment of 635bp COI gene was sequenced successfully. Among the 12 species analyzed, five found no match in BLAST. The COI was able to correctly identify 12 species even from different populations. These data are important for studies of forensic entomology about flesh flies that occur in Brazil.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	vii
1. Introdução.....	1
1.1. Entomologia Forense	1
1.2. Ordem Diptera	4
1.3. Família Sarcophagidae	6
1.4. Identificação taxonômica de dípteros muscoides de importância forense.....	9
2. Objetivo Geral	15
2.1. Objetivos específicos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Coleta e estabelecimento das colônias	16
3.2. Desenvolvimento pós-embriônico, potencial biótico e longevidade dos adultos.....	18
3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	20
3.4. DNA <i>Barcoding</i>	22
3.4.1. Extração do DNA.....	22
3.4.2. Amplificação do DNA.....	23
3.4.3. Purificação do DNA	24
3.4.4. Reação de sequenciamento e alinhamento.....	24
4. Resultados	26
4.1. Desenvolvimento pós-embriônico e potencial biótico de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) sob condições de laboratório.	27
4.2. Caracterização morfológica de imaturos de dípteros muscoides através da microscopia eletrônica de varredura.....	30
4.2.1. <i>Ravinia belforti</i>	31
4.2.1.1. Larva de primeiro instar – L1	31
4.2.1.2. Larva de segundo instar – L2	32
4.2.1.3. Larva de terceiro instar – L3	32
4.2.1.4. Pupário	33

4.2.2.	<i>Peckia (Pattonella) intermutans</i>	46
4.2.2.1.	Larva de primeiro instar – L1	46
4.2.2.2.	Larva de segundo instar – L2	46
4.2.2.3.	Larva de segundo instar – L3	47
4.2.2.4.	Pupário	47
4.2.3.	<i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i>	59
4.2.3.1.	Larva de segundo instar – L1	59
4.2.3.2.	Larva de segundo instar – L2	59
4.2.3.3.	Larva de segundo instar – L3	60
4.2.3.4.	Pupário	61
4.2.4.	<i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i> – variação morfológica	75
4.2.4.1.	Larva de segundo instar – L1	75
4.2.4.2.	Larva de segundo instar – L2	75
4.2.4.3.	Larva de segundo instar – L3	76
4.2.4.4.	Pupário	76
4.3.	Identificação molecular de dípteros muscoides da família Sarcophagidae	90
5.	Discussão	100
5.1.	Desenvolvimento pós-embrionário e potencial biótico de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) sob condições de laboratório	100
5.2.	Caracterização morfológica de imaturos de dípteros muscoides através da microscopia eletrônica de varredura	105
5.3.	Identificação molecular de dípteros muscoides da família Sarcophagidae	113
6.	Considerações Finais	119
7.	Conclusões	121
8.	Referências Bibliográficas	122
9.	Anexo I – Ultrastructure analysis of the immature stages of <i>Ravinia belforti</i> (Diptera: Sarcophagidae), a species of medical-veterinary and forensic importance, by scanning electron microscopy	139

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 – Armadilha de tenda do tipo Shannon modificada utilizada para a captura das espécies estudadas	16
Figura 3.2 – Gaiola de madeira (30x30x30cm) telada utilizada para a criação em laboratório das espécies de díptero muscoides	17
Figura 3.3 – Estante ventilada utilizada para a criação em laboratório de dípteros muscoides	17
Figura 3.4 – Carne moída em estágio inicial de putrefação utilizada como substrato de postura e água e açúcar para a solução açucarada (50%) que compõe a dieta dos dípteros muscoides criados em condições de laboratório.....	18
Figura 3.5 – Potes de plástico contendo carne moída em estágio inicial de putrefação (pote pequeno) e vermiculita (pote grande).....	19
Figura 3.6 – Tubo de ensaio contendo uma mosca individualizada para que seja realizada a sexagem.....	19
Figura 3.7 – Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.	22
Figura 4.1 – Estrutura das genitálias da variação morfológica (A) e de <i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i> (Diptera: Sarcophagidae) (B) retirada de Buenaventura & Pape 2013. As setas indicam as diferenças entre as duas genitálias. Pregonito (Prg), pósgonito (Pog), juxta (J), surstilo (Sr) e cerco (Ce).	26
Figura 4.2 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull com os resultados observados (pontos) e os resultados esperados (linha) para adultos machos de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).	29

Figura 4.3 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull com os resultados observados (pontos) e os resultados esperados (linha) para adultos fêmeas de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).	29
Figura 4.4 – Número de larvas depositadas em carne moída em estágio inicial de decomposição dividido pelo número de fêmeas de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).....	30
Figura 4.5 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Visão geral do corpo da larva com a região anterior (a) e posterior (p). B – Pseudocéfalo com cristas orais (co) e colar cefálico (seta).....	34
Figura 4.6 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Vista frontal do pseudocéfalo com ganchos maxilares, cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (seta). B – Detalhe dos espinhos do colar cefálico com pontas duplas, triplas e quádruplas.....	35
Figura 4.7 – Micrografia eletrônica de varredura da região posterior de uma larva de primeiro instar de <i>Ravinia belforti</i> . A seta indica o espiráculo posterior internalizado na cavidade anal.	36
Figura 4.8 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Larva de corpo inteiro. Região anterior (a) e posterior (p). B – Região anterior com os palpos maxilares (pm), as cristas orais (co) e os espinhos do colar cefálico (seta). Os ganchos maxilares se encontram retraídos	37
Figura 4.9 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Detalhe do pseudocéfalo com o par de antenas (a) e ganchos maxilares retraídos. B – Espiráculo anterior (ea) com as papilas (setas) dispostas em fileiras irregulares	38

Figura 4.10 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Espinhos intersegmentares torácicos. B – Região posterior rodeada por tubérculos circunspiraculares (tc). Espiráculo posterior internalizado, com duas aberturas espiraculares (setas) em cada peritrema (p).....	39
Figura 4.11 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Visão de alguns segmentos da região anterior: pseudocéfalo (seta), segmentos torácicos (t1, t2 e t3) e três segmentos abdominais (a1, a2 e a3). B – Detalhe da região cefálica com antena (a), papilas (p), crista oral (co) e espinhos do colar cefálico (seta). Ganchos maxilares retraídos.....	40
Figura 4.12 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Espinhos do colar cefálico. B – Seta indicando a irregularidade das papilas no meio do espiráculo anterior.....	41
Figura 4.13 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de <i>Ravinia belforti</i> . A – Espinhos do intersegmento torácico. B – Região posterior com as setas indicando as três aberturas espiraculares em cada um dos peritremas.....	42
Figura 4.14 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de <i>Ravinia belforti</i> . A – Vista geral do pupário. Região anterior (a) e posterior (p). B – Vista frontal da região anterior com o pseudocéfalo retraído (seta) e os espiráculos anteriores (ea).....	43
Figura 4.15 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de <i>Ravinia belforti</i> . A – Espinhos intersegmentais. B – Espiráculo anterior.	44
Figura 4.16 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de <i>Ravinia belforti</i> . A – Vista frontal da região posterior com a placa espiracular internalizada (sp). B – Detalhe do espiráculo posterior com o par de peritremas (p) e as três aberturas espiraculares em cada um deles (setas).....	45
Figura 4.17 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de <i>Peckia (Pattonella) intermutans</i> . A – Corpo inteiro da larva. Região	

anterior (a) e região posterior (p). B – Região anterior, mostrando o pseudocéfalo (pc), os ganchos maxilares (gm), o colar cefálico (seta) e o primeiro (t1) e segundo (t2) segmento torácico. 49

Figura 4.18 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – Pseudocéfalo (pc) dividido em dois lóbulos, com um par de antenas (a) e de papilas maxilares (pm). Colar cefálico (cc); primeiro (t1) e segundo (t2) segmento torácico; ganchos maxilares (gm); e espinhos intersegmentares (seta). B – Detalhe dos espinhos do colar cefálico dividindo as cristas orais (co) do primeiro segmento torácico (t1)..... 50

Figura 4.19 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – Espinhos intersegmentares dividindo o quarto segmento abdominal (a4) do quinto (a5). A seta indica a orientação de alguns espinhos para a região anterior. B - Região posterior rodeada de tubérculos (tc) ainda em desenvolvimento e peritremas (p) com duas aberturas espiraculares (setas).51

Figura 4.20 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – Larva de corpo inteiro com os 12 segmentos: segmento cefálico (sc), segmentos torácicos (t1-t3), segmentos abdominais (a1-a7) e segmento anal (sa). A seta indica o espiráculo anterior. B – Região anterior: antena (a); papilas maxilares (pm), ganchos maxilares (gm), crista oral (co) e espinhos do colar cefálico (cc)..... 52

Figura 4.21 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A - Espiráculo anterior com fileiras regulares de papilas. B – Espiráculo posterior circundado com os tubérculos circunspiraculares (tc) e duas aberturas (setas) em casa peritrema (p) 53

Figura 4.22 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – Região anterior: pseudocéfalo (pc); colar cefálico (cc); primeiro segmento torácico (t1); espiráculo anterior (ea); espinhos intersegmentares (setas); e segundo segmento torácico (t2). B – Detalhe do pseudocéfalo: antena (a); papilas maxilares (pm), ganchos

maxilares (gm), crista oral (co); colar cefálico (cc) e primeiro segmento torácico (t1).....	54
Figura 4.23 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de <i>Peckia (Pattonella) intermutans</i> . A – Espiráculo anterior com papilas dispostas em fileiras irregulares (setas). B – Detalhe dos espinhos intersegmentares	55
Figura 4.24 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de <i>Peckia (Pattonella) intermutans</i> . A – Região posterior com o par de peritremas (p) na placa espiracular internalizada e rodeada por tubérculos circunspiraculares (tc). B – Detalhe do par de peritremas (p) do espiráculo posterior, com três aberturas espiraculares cada um (setas).....	56
Figura 4.25 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário <i>Peckia (Pattonella) intermutans</i> . A – visão geral do pupário: região anterior (a) e região posterior (p). B – Vista frontal da região anterior, com o pseudocéfalo retraído (seta) e os espiráculos anteriores (ea).....	57
Figura 4.26 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário <i>Peckia (Pattonella) intermutans</i> . A – Espiráculo anterior com as papilas dispostas em fileiras irregulares (setas). B – Vista frontal da região posterior com o espiráculo posterior internalizado.	58
Figura 4.27 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> . A – Larva de corpo inteiro: segmento cefálico (sc); segmentos torácicos (t1-t3); segmentos abdominais (a1-a7) e segmento anal (sa). B – Região anterior com ganchos maxilares (gm), palpo (p), colar cefálico (cc) e primeiro (t1) e segundo (t2) segmentos torácicos divididos por espinhos intersegmentares (seta).	62
Figura 4.28 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> . A – Espinhos intersegmentares torácicos orientados para a região posterior. B – Espinhos intersegmentares abdominais orientados para a região anterior e para a região posterior.	63

- Figura 4.29 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Vista frontal da região posterior com o espiráculo internalizado e o par de peritremas (p) com duas aberturas em cada um (setas). B – Detalhe dos peritremas com as duas aberturas espiraculares 64**
- Figura 4.30 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Região anterior: pseudocéfalo com ganchos maxilares (gm), crista oral (co) e colar cefálico (cc). A seta indica o espiráculo anterior no primeiro segmento torácico (t1). B – Detalhe do pseudocéfalo com o par de antenas (a), ganchos (gm), cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (setas). 65**
- Figura 4.31 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Espinhos do colar cefálico com pontas simples ou duplas. B – espiráculo anterior com 17 papilas espiraculares 66**
- Figura 4.32 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Região posterior com o par de peritremas (p) que compõem o espiráculo posterior rodeados pelos tubérculos circunspiraculares (tc). B – Detalhe dos peritremas com duas aberturas espiraculares em cada um (setas)...... 67**
- Figura 4.33 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Região anterior com ganchos (gm), cristas orais (co), colar cefálico (seta), espiráculo anterior (ea) e os três segmentos torácico (t1-t3). B – Pseudocéfalo. 68**
- Figura 4.34 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Espinhos do colar cefálico. B – Espiráculo anterior com 14 papilas espiraculares69**
- Figura 4.35 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Espinhos intersegmentares torácicos orientados para a região posterior. B – Espinhos intersegmentares abdominais orientados para ambas as regiões..... 70**

- Figura 4.36 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Vista frontal do espiráculo posterior com os peritremas (p) rodeados pelos quatro trios de tubérculos (tc). B – Peritremas com três aberturas espiraculares (setas)..... 71
- Figura 4.37 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Visão frontal com pseudocéfalo retraído (seta) e espiráculos anteriores (ea). B – Espiráculo anterior. 72
- Figura 4.38 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Espinhos do segundo segmento torácico. B – Espinhos intersegmentares abdominais 73
- Figura 4.39 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Região posterior. B – Visão frontal da região posterior com o espiráculo internalizado (seta). 74
- Figura 4.40 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Pseudocéfalo com as cristas orais (co). B – Espinhos do colar cefálico. 78
- Figura 4.41 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Espinhos intersegmentares dividindo o segmento abdominal do segmento anal (seta). Cavidade anal (ca) com a placa espiracular internalizada na região posterior e rodeada por tubérculos circunspiraculares (tc). 79
- Figura 4.42 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Região cefálica com ganchos maxilares (gm), cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (seta). B – Espiráculo anterior (ea). 80
- Figura 4.43 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Espinhos intersegmentares torácicos. B - Espinhos intersegmentares abdominais 81
- Figura 4.44 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Espiráculo posterior com um par

de peritremas (p). B – Peritrema (p) com duas aberturas espiraculares (setas)..... 82

Figura 4.45 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Região anterior com destaque para o pseudocéfalo (pc), colar cefálico (seta), espiráculo anterior (ea), segmentos torácicos (t1-3), segmento abdominal (a1) e espinhos intersegmentares (ei). B – Pseudocéfalo com as cristas orais (co) e colar cefálico (cc).....83

Figura 4.46 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Colar cefálico ao lado das cristas orais (co). B – Espiráculo anterior 84

Figura 4.47 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Espinhos intersegmentares torácicos separando o segundo (t2) e terceiro (t3) segmento. B – Espinhos abdominais separando o quinto (a5) e sexto (a6) segmento. 85

Figura 4.48 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Região posterior com o espiráculo, par de peritremas (p) e tubérculos circunspiraculares (tc). B – Par de peritremas (p) com três aberturas espiraculares cada um (setas)..... 86

Figura 4.49 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Visão lateral com o pseudocéfalo retraído (seta) e espiráculos posteriores (ea). Segundo (t2) e terceiro (t3) segmentos torácicos. B – Visão frontal da região anterior com pseudocéfalo retraído (seta) e espiráculos anteriores (ea). 87

Figura 4.50 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Espiráculo anterior com papilas espiraculares (setas). B – Espiráculo posterior com setas indicando os peritremas internalizados..... 88

- Figura 4.51 – Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de 12 espécies de Sarcophagidae. Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicações testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*.....96**
- Figura 4.52 - Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de espécies do gênero *Peckia* (Diptera: Sarcophagidae). Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicações testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*..... 97**
- Figura 4.53 – Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de espécies do gênero *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae). Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicações testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*..... 98**
- Figura 4.54 – Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de espécies dos gêneros *Peckia* e *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae). Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicações testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*..... 99**

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Viabilidade dos estágios imaturos de <i>Peckia (Eubottcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ UR e 12 horas de fotofase).	27
Tabela 4.2: Duração em dias dos estágios imaturos de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ UR e 12 horas de fotofase).....	27
Tabela 4.3: Peso (mg) de larvas L3 maduras de <i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i> (Diptera: Sarcophagidae) mantidas em condições de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$ UR e 12 horas de fotofase).	28
Tabela 4.4: Nome, localização, código e número de amostras sequenciadas das 12 espécies de Sarcophagidae submetidas às análises moleculares	90
Tabela 4.5: Matriz de distância genética (em porcentagem) para as populações das 12 espécies de dípteros muscoides da família Sarcophagidae estudadas	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 – Comparação entre as principais características morfológicas de imaturos de quatro espécies de dípteros muscoides da família Sarcophagidae analisados através da microscopia eletrônica de varredura..... 89

1. Introdução

1.1. Entomologia Forense

Além de estojos de projéteis, impressões digitais, manchas de sangue e fios de cabelo, os insetos e alguns outros artrópodes também podem ser utilizados como evidências em uma investigação criminal (Lord e Burger 1983). Conhecida popularmente como entomologia forense, esta ciência é na realidade o estudo de insetos, aracnídeos e crustáceos que associados a demais procedimentos periciais, principalmente aqueles na qual uma morte violenta está envolvida, tem o propósito de revelar informações úteis para uma investigação criminal (Cats e Goff 1992; Oliveira-Costa e Mello-Patiu 2004).

Centenas de espécies de artrópodes são atraídas por carcaças de animais em decomposição, inclusive de cadáveres humanos. Estes animais utilizam as carcaças como fonte proteica e estímulos para cópula e postura de suas formas imaturas, como ovos ou larvas (Carvalho e Linhares 2001; Oliveira-Costa et al. 2001; Barros et al. 2008; Barbosa et al. 2009; Oliveira e Vasconcelos 2010; Rosa et al. 2011; Alves et al. 2014). Desta forma, estes animais vivem em, se alimentam de e/ou se reproduzem sobre carcaças de outros animais de acordo com suas preferências biológicas e com o estado de decomposição da carcaça (Benecke 2001).

De acordo com uma das primeiras revisões sobre entomologia forense (Keh 1985), o primeiro registro do uso de insetos auxiliando uma investigação criminal ocorreu no século XII, na China, e foi relatado no livro *The Washing Away of Wrongs*. Apesar disso, a entomologia forense só veio a se consolidar de vez na Europa a partir da segunda metade do século XIX, com os trabalhos dos médicos franceses Louis Bergert em 1855 e Jean Pierre Mégnin em 1894 (Benecke 2001).

No Brasil, os estudos de insetos necrófagos iniciaram-se com os trabalhos de Edgard Roquette Pinto, no Rio de Janeiro, e Oscar Freire, na Bahia, em 1908. Estes dois pesquisadores foram influenciados pelos trabalhos de sucessão entomológica sobre cadáveres descritos por Mégnin no livro *La Faune des Cadavres: application de l'entomologie à la médecine légale*. Os pioneiros trabalhos de Roquette Pinto e

Freire foram responsáveis por registrar a diversidade da fauna de insetos necrófagos em regiões da Mata Atlântica. Além disso, e mais importante, seus estudos mostraram que a sucessão cadavérica dos insetos no Brasil segue um padrão diferente daquele observado por Mégnin na Europa. Esta descoberta impulsionou os estudos sobre sucessão cadavérica de insetos necrófagos em diferentes regiões geográficas e proporcionou diversos trabalhos sistêmicos a respeito destes insetos ao redor do mundo (Freire 1923; Benecke 2001; Pujol-Luz et al. 2008).

Para Lord e Stevenson (1986), a entomologia forense pode ser dividida em três categorias: entomologia forense urbana, entomologia forense de produtos estocados e entomologia forense médico-legal. A primeira lida com os insetos considerados como pragas urbanas que afetam o homem e seu ambiente como, por exemplo, baratas e cupins. A entomologia forense de produtos estocados está relacionada com insetos (ou suas partes) encontrados em alimentos ou vestimentas. A entomologia forense médico-legal (ou médico-criminal) utiliza insetos em investigações, principalmente aquelas relacionadas a crimes que resultam em mortes violentas.

Segundo Spitz e Fischer (1980), o processo de putrefação, iniciado logo após a morte, é um fenômeno transformativo e destrutivo que consiste basicamente na degradação e decomposição da matéria orgânica por bactérias anaeróbicas e aeróbicas. A partir da ocorrência da morte, o corpo inicia um processo de decomposição dividido em quatro estágios: descoloração, inchamento, liquefação e decomposição avançada. Esses estágios, normalmente, apresentam uma ordem consecutiva, porém não há uma divisão clara de onde termina um estágio e começa o seguinte (Campobasso et al. 2001).

Os métodos tradicionais de perícia que irão analisar a rigidez cadavérica, a temperatura do corpo, a hipóstase, dentre outros são comumente utilizados para estimar o intervalo pós-morte (IPM, intervalo de tempo entre a morte e a descoberta do cadáver). Porém, esta estimativa perde a precisão quando o corpo é encontrado em estágios avançados de putrefação, *i.e.* a partir de 72 horas após a morte. É para tentar suprir essa falta de precisão que a entomologia forense pode ser utilizada como mais uma ferramenta para estimar o IPM (Cats e Goff 1992).

Estimar o IPM é uma das principais aplicações da entomologia forense (Amendt et al 2000; Oliveira-Costa e Mello-Patiu 2004), porém ela também pode auxiliar peritos de outras formas, como em análises toxicológicas nos casos de suspeitas de envenenamento ou na detecção de substâncias, como drogas ilícitas e fármacos como diazepam e anfetamina (Gagliano-Candela e Aventaggiato 2001; Campobasso et al. 2004); na obtenção do DNA da vítima ou do suspeito através da coleta de sangue do conteúdo estomacal de insetos adultos ou da larva (Bonacci et al. 2009) e para indicar casos de maus tratos e abandono de idosos, crianças e incapazes pela coleta de larvas que realizam parte de seu ciclo de vida em fezes (Benecke e Lessing 2001; Benecke et al. 2004). Além disso, os insetos coletados na cena do crime podem revelar dados a respeito da geografia do local, confirmar se a morte ocorreu no mesmo lugar onde o corpo foi encontrado e também indicar rotas do tráfico de drogas, com insetos ou vestígios de insetos endêmicos de determinada região coletados em pacotes de drogas (Benecke 1998; Alacs et al. 2010).

Existem duas formas para realizar a estimativa do IPM através do uso de vestígios entomológicos coletados em uma cena de crime: a primeira, durante os estágios iniciais de decomposição, é baseada no desenvolvimento das formas imaturas de uma determinada espécie coletada sobre o cadáver. A segunda forma de estimar o IPM se refere aos estágios avançados de decomposição. Nesses casos, a estimativa pode ser baseada na composição da comunidade de insetos (ou artrópodes) sobre o cadáver, visto que esta composição desempenha um padrão de sucessão esperado (Catts e Goff 1992).

Diversos animais, principalmente os insetos, desempenham um papel importante durante a decomposição de uma carcaça ou um cadáver. Estes insetos que se alimentam de tecidos em decomposição possuem órgãos sensoriais altamente especializados que são estimulados pelos odores e gases produzidos durante o processo de putrefação (Rodriguez e Bass 1983).

Desta forma, o cadáver é colonizado por diversos insetos pertencentes a diferentes *taxa* que irão providenciar informações utilizadas em uma investigação criminal (Smith 1986). Goff (1993) dividiu estes artrópodes em quatro grupos ecológicos distintos: necrófagos (que se alimentam diretamente do cadáver), necrófilos ou predadores (que se alimentam dos insetos que se alimentam do

cadáver), omnívoros (que se alimentam tanto do cadáver como dos insetos) e oportunistas (que utilizam o cadáver como uma extensão de seu habitat).

Apesar de todos esses grupos modificarem de alguma forma a decomposição do cadáver e, assim, influenciar na estimativa do IPM, os necrófagos representam o grupo mais importante para a entomologia forense. Neste grupo estão presentes espécies das ordens Diptera (moscas) e Coleoptera (besouros) (Campobasso et al. 2001).

1.2. Ordem Diptera

Por apresentar uma maior frequência e abundância na decomposição, a ordem Diptera engloba os insetos de grande importância forense. Ela é uma das três ordens pertencentes à seção Antliophora, ao lado de Mecoptera e Siphonaptera. Diptera compreende insetos endopterigotos com um par funcional de asas membranosas no mesonoto e um par de asas posteriores reduzidas em halteres (também chamados de balancins). Apresentam protórax e metatórax muito reduzidos. Os adultos possuem peças bucais do tipo sugador, frequentemente adaptadas para perfurar. As larvas são ápodas, com variados instares larvais de acordo com a espécie. As pupas são do tipo adéctica, obtecta ou exarata, esta inclui o pupário (McAlpine et al. 1981; Carvalho et al. 2012).

Os dípteros, popularmente conhecidos como moscas e mosquitos, estão entre as cinco ordens megadiversas de insetos holometábolos, ao lado de Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera e Siphonaptera. Estas ordens combinadas abrangem cerca de 903.000 espécies, sendo responsáveis por 91% de toda a diversidade de insetos conhecida no mundo (Rafael et al. 2009).

Dentre as ordens megadiversas, Diptera é a melhor inventariada, com catálogos taxonômicos para todas as regiões biogeográficas (Amorim et al. 2002; Carvalho et al. 2012). Atualmente já foram descritas cerca de 153.000 espécies, dispostas em 188 famílias e aproximadamente 10.000 gêneros (Pape e Thompson 2013). Apesar de a ordem compreender de 10 a 15 % de toda a biodiversidade

mundial (Yeates et al. 2007), o número de espécies descritas ainda é incipiente. Existem estimativas de que o total de espécies de dípteros viventes ao redor do mundo possa estar entre 400.000 e 1 milhão (Brown et al. 2009; Rafael et al. 2009). Na região Neotropical foram descritas mais de 118 famílias, com 31.000 espécies. No Brasil, estão presentes aproximadamente 8.700 espécies de Diptera (Carvalho et al. 2012).

Muitas espécies de dípteros são importantes vetores ativos ou passivos de organismos que podem causar doenças no homem, em seus animais domésticos e também em animais de criação pecuarista (Greenberg 1973; Oliveira et al. 2002). Por outro lado, existem espécies que são benéficas como, por exemplo, moscas predadoras ou parasitoides que atuam no controle biológico de pragas. A maioria das larvas alimenta-se de matéria orgânica em decomposição, além de plantas e fungos, ajudando a manter o equilíbrio populacional de diversos organismos em seus ecossistemas (Carvalho et al. 2012).

Além disso, as larvas de determinadas espécies podem ser responsáveis por uma afecção conhecida como miíase (Leão et al. 1996). Estas larvas invadem tecidos e órgãos tanto de homens como de outros animais e podem ser classificadas em dois grupos: biontófagas e necrobiontófagas. O primeiro grupo está relacionado às larvas que se alimentam de tecido animal vivo e são responsáveis por causar miíases primárias. As larvas necrobiontófagas se alimentam de tecido animal morto e são responsáveis por causar miíases secundárias (Dias et al. 1984; Guimarães e Papavero 1999).

A ordem Diptera é dividida em duas subordens: Nematocera e Brachycera. Na subordem Nematocera estão inseridos os dípteros popularmente conhecidos como mosquitos. Em Brachycera se encontram moscas com antenas dotadas de até sete segmentos e que normalmente apresentam uma arista.

A subordem Brachycera é dividida em quatro infraordens: Muscomorpha, Tabanomorpha, Stratiomyomorpha e Xylophagomorpha. A infraordem Muscomorpha é sustentada pela posição do espiráculo posterior das larvas no último segmento abdominal, também conhecido como segmento anal.

Muscomorpha possui duas seções: Aschiza e Schizophora. Estas duas sessões são separadas com base na ausência ou na presença da sutura ptilinial, respectivamente. Schizophora compreende aproximadamente 80 famílias. As moscas adultas emergem ao romper o pupário com o auxílio de uma estrutura membranosa chamada ptilínio, localizada na extremidade da cabeça. O ptilínio infla e é evertido através da sutura ptilinial, logo acima das bases das antenas. Após emergir do pupário, o ptilínio é retraído por ação muscular, mantendo a sutura em forma de U invertido.

Schizophora compreende duas subseções: Calyptratae e Acalyptratae, cuja divisão se baseia no tamanho da caliptra inferior, ausente na maioria dos Acalyptratae. Além desta característica, os Calyptratae possuem um sulco na base do pedicelo, uma sutura transversal completa no mesonoto e cerdas costais alternadas em tamanho, dentre outras características. Três superfamílias estão presentes dentro da subseção Calyptratae: Hippoboscoidea, Muscoidea e Oestroidea. Uma das principais características da superfamília Hippoboscoidea é o desenvolvimento por viviparidade adenotrófica, ou seja, a larva eclode no oviduto da fêmea e se alimenta a partir de uma glândula acessória. Muscoidea é a superfamília sustentada por uma abertura anal do macho localizada acima dos cercos, pelo décimo esternito do macho formando um esclerito baciliforme e o espiráculo abdominal do segmento 7 localizado no segmento 8. Oestroidea é caracterizada por uma série vertical de cerdas no mero, um grupo de cerdas no anatergito, veia M terminando na veia C antes do ápice da asa e edeago com dentículos cuticulares ventrais no ápice (McAlpine e Wood 1989; Amorim e Yeates 2006; Yeates et al. 2007).

1.3. Família Sarcophagidae

A família Sarcophagidae é uma das seis famílias que compreendem a superfamília Oestroidea, ao lado de Calliphoridae, Oestridae, Mystacinobiidae, Rhinophoridae e Tachinidae. Ao contrário da família Calliphoridae, que é popularmente conhecida como moscas varejeiras, os sarcófagídeos não possuem

um nome popular no Brasil, apesar de serem frequentemente encontrados em ambientes domiciliar. Em inglês, elas são conhecidas como *flesh flies* (moscas da carne, em tradução livre).

Os dípteros muscoides da família Sarcophagidae são cosmopolitas e compreendem atualmente 3.094 espécies descritas em 173 gêneros (Pape et al. 2011). Na região Neotropical já foram descritas cerca de 750 espécies. A maior parte destas espécies neotropicais ocorre em áreas tropicais ou temperadas mais quente (Pape 1996; Carvalho et al. 2012). No Brasil, existem cerca de 270 espécies de Sarcophagidae (Carvalho et al. 2012).

São moscas de aparência externa relativamente uniforme, robustas e de coloração cinza fosco, que variam de 2 a 25 mm de comprimento. O tórax geralmente é listrado longitudinalmente, com diversas espécies apresentando três listras pretas no mesonoto. O abdome é quadriculado ou manchado com coloração marrom, amarelo e cinza. A genitália, localizada no último segmento abdominal, possui coloração que varia de amarelo-palha a vermelho (Shewell 1987).

Por possuírem uma uniformidade em relação à morfologia externa, existem poucas características que podem ser utilizadas com segurança para identificar espécies de Sarcophagidae. Geralmente, esta identificação se dá através da observação da genitália do macho, visto que cada espécie apresenta um padrão morfológico único de estruturas que formam a genitália (Carvalho e Mello-Patiu 2008; Buenavetura e Pape 2013). Atualmente, alguns autores estão desenvolvendo métodos de caracterização morfológica das estruturas da genitália de adultos fêmeas, bem como do formato da espermateca e o do sexto e sétimo esternito do abdome (Szpila et al. 2015a; Vairo et al. 2015a).

As fêmeas são vivíparas ou ovovivíparas, com as larvas eclodindo no útero imediatamente antes da larviposição. As larvas apresentam uma coloração que varia do branco ao amarelo-palha. O corpo das larvas é do tipo vermiforme com a extremidade anterior mais fina do que a extremidade posterior. Geralmente, a larva apresenta espinhos ao longo dos segmentos do corpo, com exceção do primeiro segmento, onde está localizada a região cefálica. Os espiráculos posteriores estão dentro de uma cavidade, no último segmento abdominal da larva (Shewell 1987).

Os sarcófagídeos são divididos em três subfamílias: Miltogramminae, Paramacronychiinae e Sarcophaginae. Miltogramminae apresenta pouca diversidade neotropical e compreende as moscas de tamanho que varia de pequeno a médio, com larvas cleptoparasitas de abelhas e vespas. As moscas parasitoides ou predadoras de insetos e gastrópodes da subfamília Paramacronychiinae não ocorrem na Região Neotropical. A subfamília Sarcophaginae apresenta elevada diversidade neotropical. As espécies desta subfamília têm hábitos variados. Algumas moscas atuam como parasitas de insetos ou outros artrópodes, bem como causadoras de miíases primárias ou secundárias tanto no homem como em animais. As larvas de outras espécies são encontradas em matéria orgânica animal em decomposição, tais como carcaças e cadáveres humanos. Além disso, algumas espécies possuem preferência por realizar larviposição em fezes tanto humanas como de outros animais (Dias et al. 1984; d'Almeida 1996; Pape 1996; Carvalho et al. 2012).

Diversos estudos relacionados à ocorrência e abundância de espécies das principais famílias de dípteros muscoides de importância forense (Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae) já foram realizados e são importantes para compreendermos a biologia e a geografia destes insetos. Estes levantamentos, em diferentes biomas (e.g. na Mata Atlântica e no Cerrado), indicam que a família Sarcophagidae apresenta elevada diversidade de espécies, além de ser a segunda mais frequente, atrás apenas da família Calliphoridae (Leandro e d'Almeida 2005; Barbosa 2009). Isso faz com que os sarcófagídeos e califorídeos apresentem grande potencial informativo para análises forenses. Espécies destas duas famílias são os primeiros animais a encontrar um cadáver, sobre o qual iniciarão o seu desenvolvimento larval. Desta forma, podem ser considerados excelentes vestígios criminais a serem coletados em um local onde uma morte violenta ocorreu.

Os principais sarcófagídeos encontrados em estudos sobre a entomofauna cadavérica no Brasil pertencem aos gêneros *Peckia* e *Oxysarcodexia*. Diversas espécies destes gêneros, bem como de outros menos abundantes como *Ravinia*, *Helicobia* e *Sarcophaga*, podem ser comumente coletadas tanto em carcaças de diferentes animais como em fezes de bovinos, equinos, primatas e humanos. Além disso, trabalhos apontam para a coleta de espécies destes gêneros em cadáveres humanos (Oliveira e Vasconcelos 2004; Barbosa et al. 2009; Cherix et al. 2012).

Muitas espécies de Sarcophagidae também apresentam um alto índice de sinantropia. Essa relação próxima com o ser humano e com seu peridomicílio torna estas moscas potenciais carreadoras de patógenos entéricos (tais como fungos, vírus, bactérias, ovos de helmintos) que podem afetar a saúde humana (Greenberg 1973; Linhares 1981; d'Almeida e Mello 1996).

Apesar da elevada diversidade e abundância de sarcófagídeos em estudos e casos relacionados à entomologia forense, a família ainda é pouco estudada, principalmente no que se refere à biologia e morfologia dos imaturos. De acordo com o trabalho de Brown (2005), que avaliou a frequência de descrições de novas espécies em diversas famílias de dípteros muscoides neotropicais, a média de novas espécies descritas na família Sarcophagidae é de apenas 3,9 espécies por ano. Uma média considerada baixa frente à imensa diversidade de espécies desta família estimada para a região Neotropical.

1.4. Identificação taxonômica de dípteros muscoides de importância forense

A correta identificação, o conhecimento sobre o ciclo de vida e as características ecológicas e biológicas de espécies associadas a cadáveres são pré-requisitos necessários para qualquer estimativa ou estudo relacionado ao IPM (Erzinçlioglu 1985). O cálculo da estimativa do IPM pode ser feito relacionando a idade dos imaturos de dípteros muscoides coletados sobre o cadáver com dados disponíveis na literatura sobre a biologia da espécie em questão (Salviano et al. 1996; Campobasso e Introna 2001; Marchenko 2001; Oliveira-Costa e Mello-Patiu 2004; Amendt et al. 2007; Nassu et al. 2014; da-Silva-Xavier et al. 2015).

O primeiro passo da aplicação da entomologia forense na estimativa do IPM está na identificação dos espécimes coletados em uma cena do crime ou diretamente sobre um cadáver (Amendt et al. 2007). Para a família Sarcophagidae, essa identificação pode ser dificultada por diversos fatores, como por exemplo, o elevado número de espécies distribuídas na Região Neotropical, a falta de diferenças morfológicas evidentes em moscas adultas da maioria das espécies e a

carência de chaves dicotômicas para a família (Carvalho e Mello-Patiu 2008; Buenaventura e Pape 2013).

As chaves utilizadas para identificação de Sarcophagidae são geralmente focadas no padrão de genitália dos machos. Porém, é mais comum encontrar sobre um cadáver ou uma carcaça estágios imaturos ou fêmeas adultas que irão utilizar o corpo para depositar suas larvas (Anderson 1999; Otranto e Stevens 2002; Cherix et al. 2012; Szpila et al. 2015a). As poucas chaves de identificação de imaturos existentes se referem, principalmente, aos sarcófagídeos do hemisfério norte, mais comumente Europa e Ásia (Zimin 1948; Ishijima 1967; Smith 1986; Velásquez et al. 2010; Szpila et al. 2015b).

Desta forma, a morfologia de imaturos de muitas espécies de Sarcophagidae do Novo Mundo ainda é pouco conhecida, o que impossibilita a identificação da espécie apenas pela análise das formas imaturas. Isto torna obrigatória a criação em laboratório dos imaturos coletados para, após a emergência do adulto macho, ser realizada a identificação (Smith 1986; Byrd e Castner 2010). Mas, além de esperar que o ciclo de vida do inseto seja completado (o que atrasaria a resolução do caso e da estimativa do IPM), outros problemas podem impedir a identificação da espécie como, por exemplo, o pouco número de espécimes coletados, a baixa sobrevivência destes imaturos até chegar ao laboratório ou mesmo a dificuldade em se criar determinadas espécies em condições artificiais de temperatura e umidade (Sukontason et al. 2003a; Pujol-Luz et al. 2006).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma ferramenta de extrema importância para a caracterização morfológica de imaturos de dípteros. Esta ferramenta é capaz de revelar estruturas que não podem ser vistas através do microscópio óptico e, desta forma enriquecer os dados taxonômicos a respeito da morfologia destes imaturos pouco estudados (Leite e Lopes 1987; Liu e Greenberg 1989; Dahlem 1991; Sukontason et al. 2003b; Singh et al. 2012; Samerjai et al. 2014; Ubero-Pascal et al. 2010; 2015). As principais características analisadas através da MEV são a região cefálica, o padrão do colar cefálico, os espiráculos anterior e posterior, o tegumento, os espinhos intersegmentares e os tubérculos circunspiraculares (Singh et al. 2012).

Um dos maiores problemas relacionados à identificação taxonômica através de caracteres morfológicos, tanto de adultos como de imaturos, é que ela requer o espécime intacto e preservado de forma corretamente. Quando são encontrados apenas pedaços de insetos ou insetos danificados, abordagens com técnicas de análise do DNA ou de hidrocarbonetos cuticulares podem ser ideais para identificar a espécie e evitar possíveis erros em seu diagnóstico (Wells e Stevens 2008; Kather e Martin 2012; Braga et al. 2013; Amorim et al. 2014; Nakano e Honda 2015).

Na primeira metade da década de 1990, Kurtzman (1994) e Wilson (1995) desenvolveram abordagens baseadas em marcadores genéticos para identificação de microrganismos, como leveduras e bactérias. Estes pesquisadores acreditavam que a biologia molecular poderia servir como uma ferramenta taxonômica alternativa. Estas novas técnicas de biologia molecular favoreceram os estudos científicos relacionados aos insetos e foram responsáveis por complementar e reforçar os trabalhos mais antigos relacionados à sistemática e estudos populacionais (Caterino et al. 2000).

Paralelamente a isto, Sperling et al. (1994) publicaram um trabalho no qual propuseram uma abordagem baseada em DNA para identificação de insetos necrófagos utilizados na estimativa do IPM da família Calliphoridae. A partir de então, diversos estudos que utilizavam técnicas de DNA foram estabelecidos para auxiliar na identificação de espécies necrófagas (Benecke 1998; Otranto e Stevens 2002; Wells e Stevens 2008; Meiklejohn et al. 2011; Sharma et al. 2015).

Baseado na abordagem molecular para identificar microrganismos, Hebert et al. (2003a) expandiram a ideia para outros organismos e propuseram estabelecer um banco de dados contendo algo semelhante a um código de barras de DNA para todos os taxa de animais. Este conceito, chamado de *DNA barcoding*, foi baseado na premissa de que uma curta sequência padronizada de DNA com aproximadamente 648 pares de base (pb) poderia ser utilizada na identificação correta de uma espécie. Assim, indivíduos seriam considerados pertencentes a uma mesma espécie quando, ao comparar suas sequências de 648pb, apresentassem uma baixa distância genética. De modo contrário, se a distância genética entre os indivíduos analisados fosse elevada, eles seriam considerados pertencentes a duas espécies diferentes. Ou seja, neste conceito conhecido como *Barcoding gap* a

variação genética entre espécies (interespecífica) deverá ser sempre maior que a variação genética dentro da espécie (intraespecífica) (Hajibabaei et al. 2007).

A técnica de *DNA Barcoding* tinha como principal objetivo suprir três importantes limitações da taxonomia clássica: a identificação errônea de espécies quando fossem empregadas características com plasticidade fenotípica e variabilidade genética; as espécies morfologicamente idênticas (espécies crípticas); e as chaves de identificações taxonômicas limitadas a poucos grupos ou a determinados estágios de vida ou a apenas um dos gêneros (Hebert et al. 2003a).

Desta forma, a identificação das espécies necrófagas encontradas em uma cena de crime, por exemplo, poderia ser obtida mesmo através da coleta de imaturos, de parte de insetos ou de insetos danificados (Saigusa et al. 2005; Tan et al. 2010; Guo et al. 2012). As sequências obtidas destes espécimes podem ser comparadas com sequências depositadas previamente em um banco de dados genético (Ratnasingham e Hebert 2007), assim, através da comparação entre as similaridades das sequências, é possível identificar a espécie-alvo.

O marcador molecular utilizado para essa forma de identificação é, geralmente, o DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA leva vantagem sobre o DNA nuclear (nDNA) por ser uma molécula pequena, com organização genômica simples e uniforme e por ser relativamente resistente à degradação. Além disso, é abundante nas células dos animais, não possui íntrons e sua alta taxa de mutação providencia numerosas sequências diferentes entre espécies com uma relação taxonômica próxima (Sperling et al. 1994; Zhang e Hewitt 1997; Wells e Stevens 2008; Alacs et al. 2010).

O mtDNA possui 13 genes que expressam proteínas, porém diversas publicações sobre diagnóstico baseado no DNA de espécies de importância forense, utilizaram a subunidade I e a subunidade II do gene *citocromo oxidase*, conhecidas como COI e COII (Sperling et al. 1994). Coincidentemente, a curta sequência padronizada proposta para ser o código de barras universal dos animais está presente na extremidade 5' do COI (Hebert et al. 2003a).

Esta preferência pelo COI se dá por ser um gene facilmente isolado, por possuir sequência e estrutura conservadas ao longo dos diversos *taxa* e por

mudanças em suas sequências ocorrerem mais lentamente do que em qualquer outro gene mitocondrial, como o citocromo b (Hebert et al. 2003b; Wells e Stevens 2008). Além disso, os iniciadores universais (*primers*) para este gene são bem estabelecidos, o que facilita sua amplificação em quase todos os *taxa* de animais (Folmer et al. 1994). Ferreira et al. (2011) compararam análises feitas com marcadores nucleares e mitocondriais para identificação de Diptera e Coleoptera de importância forense e concluíram que os marcadores mitocondriais, principalmente o COI, obtiveram os melhores resultados.

Diversos trabalhos com diferentes grupos de animais vieram estabelecer a eficiência do *DNA barcoding* como uma ferramenta de identificação de espécies, como por exemplo: pássaros (Hebert et al. 2004a), peixes (Ward et al. 2005), aranhas (Barrett e Hebert 2005), borboletas (Hebert et al. 2004b) e percevejos pragas-agrícolas (Duman et al. 2015); além de outros organismos como plantas (Kress et al. 2005; Moraes et al. 2015), fungos (Summerbell et al. 2005) e bactérias (Sogin et al. 2006). Sendo assim, a proposta seria de que qualquer pessoa em qualquer lugar do mundo e a qualquer momento poderia ser capaz de identificar uma espécie de maneira rápida e eficiente, sem a necessidade de ser um taxonomista experiente (Hebert et al. 2003a).

Entretanto, a abordagem do *DNA barcoding* não é capaz de inferir estudos de genética de populações e filogenia. Além disso, alguns autores acreditam que apenas a análise de um único *locus* de DNA não é o suficiente para identificar uma nova espécie. Estes autores sugerem outros alvos além do COI, incluindo genes presentes no DNA nuclear ou no DNA ribossomal (Kutty et al. 2010). Os taxonomistas mais tradicionais também elaboraram duras críticas ao *DNA barcoding*, alegando que a simplicidade da técnica e a análise de apenas uma curta sequência de mtDNA não seriam suficientes para um estudo aprofundado de determinado táxon (Dunn 2003; Will e Rubinoff 2004).

O *DNA barcoding* nunca se mostrou ser um substituto aos métodos tradicionais e clássicos da taxonomia, e sim, apenas mais uma ferramenta para auxiliá-la, principalmente nos pontos nos quais a taxonomia apresenta limitações. Com um banco de dados previamente estabelecido para consulta e comparação das sequências obtidas, a técnica se torna uma importante ferramenta para uma rápida e

precisa identificação de espécies, principalmente aquelas de importância forense (Meiklejohn et al. 2011; Sharma et al. 2015).

2. Objetivo geral

Caracterizar morfológica e molecularmente espécies de dípteros muscoides da família Sarcophagidae de importância médica-veterinária e forense coletadas em carcaças de animais.

2.1. Objetivos específicos

Conhecer e analisar o desenvolvimento pós-embrionário, o potencial biótico e a longevidade de adultos da espécie *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) sob condições de laboratório;

Analisar a duração e a viabilidade do estágio larval e pupal da espécie *Peckia (Euboettcheria) anguilla* sob condições de laboratório;

Caracterizar através da microscopia eletrônica de varredura a morfologia dos instares larvais (L1, L2 e L3) e do pupário de espécies de Sarcophagidae;

Descrever a região cefálica, o padrão do colar cefálico, os espiráculos anterior e posterior, o tegumento, os espinhos intersegmentares e os tubérculos circunspiraculares dos imaturos de Sarcophagidae;

Caracterizar, através do sequenciamento de DNA, um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) de espécies de Sarcophagidae coletadas no Brasil;

Avaliar a eficácia do *DNA barcoding* na identificação de espécies de Sarcophagidae coletadas em diferentes estados do Brasil.

3. Materiais e Métodos

3.1. Coleta e estabelecimento das colônias

Os dípteros muscoides da família Sarcophagidae foram coletados ativamente dentro de uma armadilha do tipo Shannon modificada com o auxílio de tubos *Falcon* (figura 3.1). As coletas foram realizadas nos estados do Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Amazonas e Amapá, utilizando diferentes iscas para atração das moscas. As espécies de Sarcophagidae foram identificadas através de chaves específicas para o grupo no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF) do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) (Carvalho e Mello-Patiu 2008; Buenaventura e Pape 2013). As espécies de interesse foram alocadas em gaiolas de madeira (30x30x30cm) para o estabelecimento das colônias (figura 3.2).



Figura 3.1 – Armadilha de tenda do tipo Shannon modificada utilizada para a captura das espécies estudadas.

As colônias foram mantidas no LEMEF, em estantes ventiladas reguladas a 27 ± 1 °C e 50 ± 10 % de umidade relativa do ar (UR) (figura 3.3). A dieta destas moscas consistia em uma solução açucarada em concentração de 50 %. Todas as gaiolas recebiam diariamente carne moída em estágio inicial de putrefação (figura 3.4), que além de servir como fonte proteica para os insetos, servia para que as fêmeas maturassem seus ovários e utilizassem a carne como substrato para a larviposição.



Figura 3.2 – Gaiola de madeira (30x30x30cm) telada utilizada para a criação em laboratório das espécies de díptero muscoides.



Figura 3.3 – Estante ventilada utilizada para a criação em laboratório de dípteros muscoides.



Figura 3.4 – Carne moída em estágio inicial de putrefação utilizada como substrato de postura e água e açúcar para a solução açucarada (50%) que compõe a dieta dos dípteros muscoides criados em condições de laboratório.

3.2. Desenvolvimento pós-embrionário, potencial biótico e longevidade dos adultos

Os experimentos de desenvolvimento pós-embrionário, potencial biótico e longevidade dos adultos foram realizados em estante ventilada a 27 ± 1 °C, 50 ± 10 % de UR e 12 horas de fotofase. Para a análise do desenvolvimento pós-embrionário, 200 larvas de primeiro instar (L1) recém-eclodidas foram divididas em quatro grupos com 50 larvas em cada, com o auxílio de um pincel número zero. Essas larvas foram depositadas em potes plásticos com 100g de carne moída em estágio inicial de putrefação. Estes potes foram acondicionados dentro de potes maiores contendo vermiculita no fundo (figura 3.5).



Figura 3.5 – Potes de plástico contendo carne moída em estágio inicial de putrefação (pote pequeno) e vermiculita (pote grande).

As larvas maduras L3 à medida que abandonavam a carne e caíam na vermiculita do pote maior, eram pesadas em balança de precisão. Após a pesagem elas foram individualizadas em tubos de ensaio contendo vermiculita para que fosse medida a duração do período de L3 até pupa e a duração do período pupal (figura 3.6). Após a emergência dos adultos, foi realizada a sexagem dos insetos.



Figura 3.6 – Tubo de ensaio contendo uma mosca individualizada para que seja realizada a sexagem.

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

Para avaliar a longevidade da espécie e o seu potencial biótico, foram observadas três gaiolas de madeira (30x30x30cm) contendo cada uma 15 casais.

Diariamente foi registrado o número de larvas depositadas em carne moída em estágio inicial de putrefação, bem como a mortalidade de machos e fêmeas.

As curvas de sobrevivência para os insetos machos e fêmeas foram representadas pelo modelo de distribuição de Weibull. Este modelo mostra se o desenvolvimento de artrópodes criados em laboratório pode ser comparável com o desenvolvimento daqueles criados na natureza (Sgrillo 1982). O teste do Qui Quadrado foi utilizado para verificar se as curvas de sobrevivência observadas se desviavam significativamente ou não da frequência com que ela era esperada. Caso as curvas de sobrevivência observadas não desviassem significativamente das curvas de sobrevivência esperadas, elas seguiriam o modelo de distribuição de Weibull.

3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As larvas das espécies provenientes da segunda geração das colônias foram eutanasiadas em água quente (75-80 °C) e lavadas em hidróxido de sódio 2 % por aproximadamente cinco minutos. Após esse passo, ocorreram dois métodos diferentes para o preparo das larvas para a visualização no microscópio eletrônico de varredura.

O primeiro método seguiu o protocolo tradicional de fixação com glutaraldeído e pós-fixação com tetróxido de ósmio (Aspoas 1991; Sukontason et al. 2003a, 2003b; Singh et al. 2012; Mendonça et al. 2013). A fixação foi feita em solução de glutaraldeído 2,5 % e tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Após a fixação, as amostras foram lavadas três vezes em cacodilato de sódio 0,1 M e, então, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % e mantidas em temperatura ambiente, no escuro, por 1 hora. Ao final da fase de pós-fixação, as amostras foram novamente lavadas com cacodilato de sódio 0,1 M.

A próxima etapa do processo consistiu em uma série alcoólica de desidratação (7,5; 15; 30; 50; 70; 90; e 100 %). O tempo em que as amostras permaneciam em cada uma das concentrações de etanol dependia do tamanho das

larvas (de 20 minutos até 2 horas), ou seja, quanto maior a larva, mais tempo ela ficava em cada uma das concentrações.

O segundo método de preparo das larvas seguiu o protocolo de fixação por etanol, sem haver a necessidade de uma pós-fixação (Alencar e Leite 1992; Szpila e Pape 2005; Szpila et al. 2012; Velásquez et al. 2013). Este método é extremamente simples e econômico, cuja primeira etapa consistiu em fixar as larvas em etanol 70 % por no mínimo 24h. Após esse passo, foi realizada a desidratação em série alcoólica crescente (80, 90 e 100 %).

Ao término da desidratação, independente do método utilizado, as amostras foram submetidas à secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂ super seco em aparelho de Balzers (Hayat 1970). Este passo é importante, pois a amostra precisa estar totalmente livre de qualquer umidade para poder manter suas estruturas intactas durante o processo de metalização.

Os pupários foram eutanasiados por congelamento em freezer -25 °C por aproximadamente 2 horas e posteriormente conservados em geladeira. Devido à rigidez de sua cutícula, os pupários não foram submetidos a nenhum processo de fixação, pós-fixação, desidratação e secagem.

As formas imaturas (larvas e pupários) foram montadas em suportes metálicos (*stubs*) e levados para o processo de metalização. Esta etapa consiste em cobrir as amostras com uma fina camada de ouro branco para que seja possível a visualização através do MEV.

Dez espécimes de cada estágio larval e dez pupários foram analisados no MEV Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ (figura 3.7). A terminologia utilizada na descrição da morfologia seguiu a estabelecida por Ishijima (1967), McAlpine et al. (1981) e Courtney et al. (2000).

A partir das micrografias obtidas foram analisados: o corpo dos imaturos, o padrão dos espinhos intersegmentares, o pseudocéfalo (antena, palpos maxilares e cristas orais), o padrão de espinhos do colar cefálico, os espiráculos (anteriores e posteriores) e os tubérculos circunspiraculares.



Figura 3.7 – Microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia Rudolf Barth do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

3.4. DNA *Barcoding*

Para a etapa de caracterização molecular, os espécimes foram eutanasiados por congelamento (cinco indivíduos de cada espécie) por aproximadamente 2 horas. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Epidemiologia e Sistemática Molecular (LESM) do IOC, FIOCRUZ.

3.4.1. Extração do DNA

A extração do DNA foi feita com o kit *Wizard*, seguindo as recomendações do fabricante para o isolamento do material genético contido no tecido animal. Três pernas de cada espécime foram utilizadas. Os microtubos foram colocados em nitrogênio líquido e, então, as pernas foram maceradas com o auxílio de pistilos estéreis. O próximo passo consistiu na adição de 300 μ L de solução de lise nuclear e de uma nova maceração.

No passo seguinte, foram adicionados 10 μ L de proteinase K para degradação das proteínas e os microtubos foram mantidos no *multi-block* a 56 °C durante 30 minutos. Ao término deste tempo, foram adicionados 100 μ L de Solução de precipitação proteica e, em seguida, os microtubos foram submetidos à

centrifugação a 14.000 RPM por 6 minutos à temperatura ambiente. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo contendo 300 µL de isopropanol para lavagem.

Uma nova centrifugação a 14.000 RPM e em temperatura ambiente por 12 minutos foi realizada. Ao final do processo, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ao microtubo 300 µL de etanol 70 %. Os microtubos foram delicadamente agitados por 5 minutos e então submetidos a uma nova centrifugação a 14.000 RPM e em temperatura ambiente por 2 minutos.

Após este processo, o etanol foi removido dos microtubos e estes foram colocados no *multi-block* a 56 °C por aproximadamente 15 minutos, até que o etanol fosse totalmente evaporado. Depois foi adicionada a solução de hidratação de DNA: 50 µL para as amostras pequenas e 70 µL para as amostras grandes.

3.4.2. Amplificação do DNA

A amplificação enzimática *in vitro* do DNA extraído foi efetuada pelo método da PCR, sigla em inglês para reação em cadeia da polimerase (Mullis et al. 1986). Foram testados dois pares de *primers* para a amplificação de um segmento do gene mitocondrial COI: o par descrito por Nelson et al. (2007) LCO 1490-L (5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTG-3') e HCO 2198-L (5'-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3') e o par descrito por Mendonça (2014) COI-CallF (5'-CHAATCATAAAGATATTGGTAC-3') e COI-CallR (5'-KTTGRTATAAAATWGGRTCTCC-3').

O volume final de 50 µL da reação de PCR consistiu em: 30,8 µL de H₂O destilada e autoclavada, 5 µL de tampão 10x, 3 µL de MgCl₂ (solução 50 mM), 5 µL de dNTP (solução 2,5 mM), 3 µL de *primer forward*, 3 µL de *primer reverse*, 0,2 µL de *Taq DNA polymerase* (solução 5 µ/mL) e 2 µL de DNA.

As amostras foram colocadas nos termocicladores *Mastercycler Eppendorf* e *Applied Biosystem 970* programados para a seguinte ciclagem: 94 °C por 2 minutos,

seguida de 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, e 72 °C por 2 minutos, e ainda uma extensão final de 5 minutos a 72 °C.

3.4.3. Purificação do DNA

A purificação dos produtos da PCR foi feita com PEG (Phospho-Ethylene-Glycol), seguindo um protocolo *in house* disponibilizado em <http://labs.mcdb.lsa.umich.edu/labs/olsen/files/PCR.pdf>. Foram adicionados 45 µL de PEG 20% NaCl 2,5M aos produtos da reação de PCR. Após misturar bem a solução, o líquido foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e incubado a 37 °C por 15 minutos.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 1400 RPM por 15 minutos. Ao final deste processo, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de etanol 80 % e então, os microtubos foram mantidos em repouso por 2 minutos. Após este passo, ocorreu uma nova centrifugação, a 1400 RPM, por 5 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado. Então, estes passos foram repetidos: adição de etanol 80% e repouso de 2 minutos, centrifugação por 5 minutos e descarte do sobrenadante.

Os microtubos foram mantidos em um *multi-block* a 50°C para que ocorresse a evaporação de todo etanol. O último passo foi eluir o precipitado através da adição de 20 µL de H₂O autoclavada.

3.4.4. Reação de sequenciamento e alinhamento

As reações de sequenciamento foram realizadas para ambas as fitas de DNA, utilizando o kit *ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, com os mesmos *primers* usados na amplificação. Foi feito um *mix* com o *primer forward* e um *mix* com o *primer reverse*, separadamente. Cada reação de 3 µL era composta de 0,37 µL de solução tampão; 0,25 µL de *primer* 3,2 mM; 0,25 µL de *Big Dye*; e 2,13

μL de H_2O destilada e autoclavada. Foram adicionados no mix final 2 μL de DNA, o volume final da reação foi de 5 μL .

As amostras foram colocadas em um termociclador programado para 30 ciclos de 96 °C durante 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Os produtos da reação de sequenciamento foram entregues à Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA/PDTIS – FIOCRUZ. Lá eles foram purificados, através da precipitação com isopropanol e etanol, para remoção dos di-deoxinucleotídeos excedentes. Os produtos purificados foram re-suspendidos em formamida *Hi-Di* desnaturados a 95 °C e analisados em um sequenciador automático de 48 capilares *ABI 3730*, pertencente à plataforma.

A edição das sequências das fitas senso e anti-senso de cada amostra e a geração da sequência consenso de cada indivíduo foi feita utilizando o programa *Geneious* versão 4. O alinhamento e as análises de todas as sequências dos dípteros muscoides foram feitos no programa *MEGA* versão 6 (Tamura et al. 2011).

As árvores foram construídas seguindo o modelo de *Neighbor-Joining*. A matriz de distância escolhida foi a de Kimura 2-parâmetros (*K2-p*) (Saitou e Nei 1987). A confiabilidade das árvores construídas foi testada com 1000 replicações de *bootstrap*.

4. Resultados

Ao longo do trabalho foram coletadas as seguintes espécies de dípteros muscoides da família Sarcophagidae: *Ravinia belforti* Prado e Fonseca, 1932, *Helicobia aurescens* Townsend 1927, *Oxysarcodexia terminalis* Wiedemann, 1830, *Oxysarcodexia thornax* Walker, 1849, *Oxysarcodexia amorosa* Schiner 1868, *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* Fabricius, 1794, *Malacophagomyia filamenta* Dodge, 1964, *Peckia (Peckia) pexata* Wulp, 1895, *Peckia (Peckia) chrysostoma* Wiedemann, 1830, *Peckia (Pattonella) intermutans* Walker, 1861, *Peckia (Sarcodexia) lambens* Wiedemann, 1830, *Peckia (Euboettcheria) anguilla* Curran e Walley, 1934 e *Peckia (Euboettcheria) collusor* Curran e Walley 1934.

Uma espécie de Sarcophagidae não identificada por nosso grupo também foi coletada no Rio de Janeiro. Esta espécie foi enviada para a Dra. Cátia Antunes de Mello-Patiu, especialista em Sarcophagidae e pesquisadora do Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro, MNRJ.

Em uma observação preliminar, foi diagnosticado que apesar de apresentar algumas diferenças em relação à genitália do macho, a espécie seria identificada como uma variação morfológica de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. Estas diferenças foram mais notáveis no surstilo, no pregonito e na juxta (Fig. 4.1).

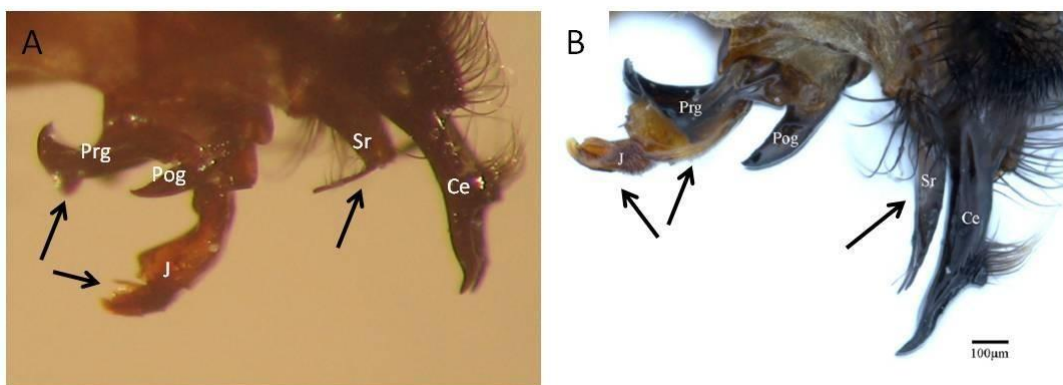


Figura 4.1 – Estrutura das genitálias da variação morfológica (A) e de *Peckia (Euboettcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae) (B) retirada de Buenaventura e Pape 2013. As setas indicam as diferenças entre as duas genitálias. Pregonito (Prg), pósgonito (Pog), juxta (J), surstilo (Sr) e cerco (Ce).

4.1. Desenvolvimento pós-embrionário e potencial biótico de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) sob condições de laboratório.

O valor do teste chi-quadrado mostrou uma boa concordância entre os resultados obtidos e os resultados esperados. O valor de Qui-quadrado para machos foi de 0,3914 e para fêmeas foi de 0,0526, ambos não significantes, o que faz com que as curvas de sobrevivência sigam o modelo de distribuição de Weibull (Fig. 4.2 e Fig. 4.3).

O estudo de bionomia apresentou uma viabilidade larval de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* de 84 % (tabela 4.1). O estágio larval compreende o tempo que a neolarva (L1) leva até se tornar uma larva madura (L3). O tempo médio do estágio larval foi de $6,61 \pm 1,78$ dias, com variação de 3 a 10 dias. O estágio de L1 até pupa durou em média $9,87 \pm 2,52$ dias, com mínimo de 5 e máximo de 17 dias (tabela 4.2).

Tabela 4.1: Viabilidade dos estágios imaturos de *Peckia (Eubottcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	VIABILIDADE (%)
ESTÁGIO LARVAL	84
ESTÁGIO PUPAL	91,6
NEOLARVA A ADULTO	77

Tabela 4.2: Duração em dias dos estágios imaturos de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	DURAÇÃO (DIAS)	
	MÉDIA \pm DP	INTERVALO DE VARIAÇÃO
ESTÁGIO LARVAL	$6,61 \pm 1,78$	3 - 10
ESTÁGIO L1-PUPA	$9,87 \pm 2,52$	5 - 17
ESTÁGIO L3-PUPA	$3,26 \pm 1,59$	2 - 11
ESTÁGIO PUPAL	$13,47 \pm 0,70$	12 - 15
NEOLARVA A ADULTO	$22,62 \pm 1,94$	19 - 27

DP, desvio padrão.

As larvas maduras L3 abandonaram a dieta e demoraram em média $3,26 \pm 1,59$ dias para iniciarem o processo de pupação. O menor tempo que uma larva madura levou para iniciar o processo de pupação foi de dois dias. Outras demoraram até 11 dias para empupar (tabela 4.2).

O peso médio das L3 maduras que abandonaram a dieta foi de $131,17 \pm 17,81$ mg, com mínimo de 57 mg e máximo de 159 mg. Larvas maduras que originaram adultos machos apresentaram um peso maior do que as L3 que originaram fêmeas. A média do peso das L3 que originaram adultos machos foi de $141,01 \pm 12,57$ mg (variação de 118 a 159 mg) e das L3 que originaram fêmeas foi de $121,96 \pm 12,76$ mg (variação de 98 a 157 mg) (tabela 4.3).

Tabela 4.3: Peso (mg) de larvas L3 maduras de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) mantidas em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).

CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS	PESO (mg)	
	MÉDIA \pm DP	INTERVALO DE VARIAÇÃO
L3 (FÊMEAS)	$121,96 \pm 12,76$	98 – 157
L3 (MACHOS)	$141,01 \pm 12,57$	118 – 159
LARVA MADURA L3 (GERAL)	$131,17 \pm 17,81$	57 – 159

DP, desvio padrão.

A viabilidade pupal foi de 91,6 % (tabela 4.1). O período pupal médio durou $13,47 \pm 0,70$ dias, com um período mínimo de 12 dias e um período máximo de 15 dias (tabela 4.2). A porcentagem sexual de machos e fêmeas emergidos dos pupários foi, respectivamente, de 49 e 51%, com razão sexual de 0,51.

O período total de desenvolvimento de *P. (E.) anguilla*, de L1 recém eclodida até adulto recém emergido, variou de 19 a 27 dias, com uma média de $22,62 \pm 1,94$ dias (tabela 4.2) e uma viabilidade total de 77 % (tabela 4.1).

A longevidade média dos adultos machos foi de $24,89 \pm 7,84$ dias, com a primeira morte ocorrendo no 11° dia e a última morte ocorrendo no 40° dia (Fig. 4.2). A longevidade média das fêmeas foi de $32,6 \pm 7,75$ dias, com as mortes ocorrendo do 17° ao 45° dia (Fig. 4.3). Ao final do experimento, foram depositadas em carne moída em estágio inicial de decomposição 1326 larvas, do 9° ao 29° dia. O número de larvas depositadas por fêmea variou de 0,2 no 29° dia a 3,7 no 13° dia (Fig. 4.4).

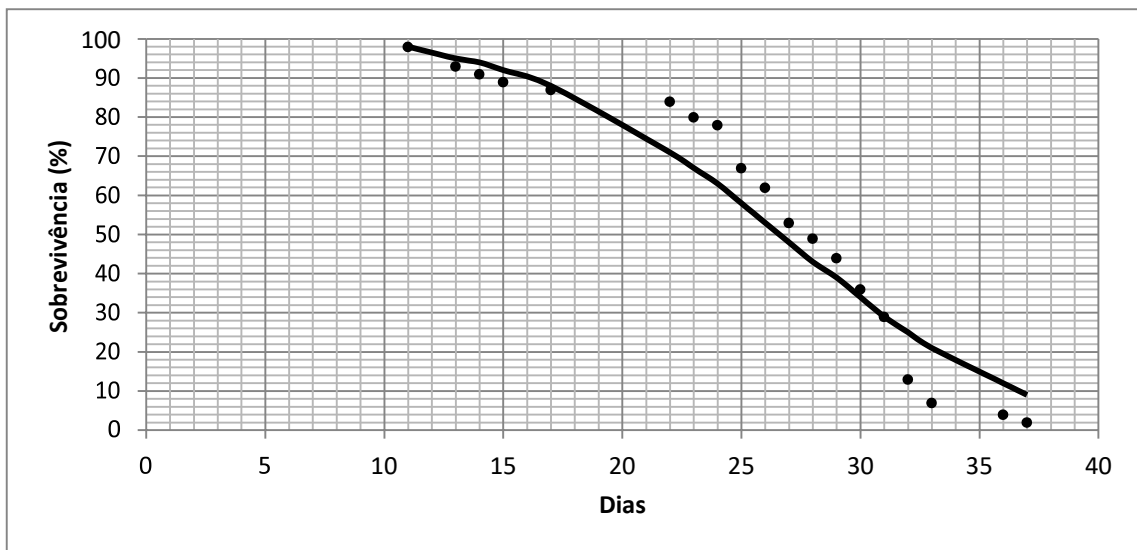


Figura 4.2 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull com os resultados observados (pontos) e os resultados esperados (linha) para adultos machos de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).

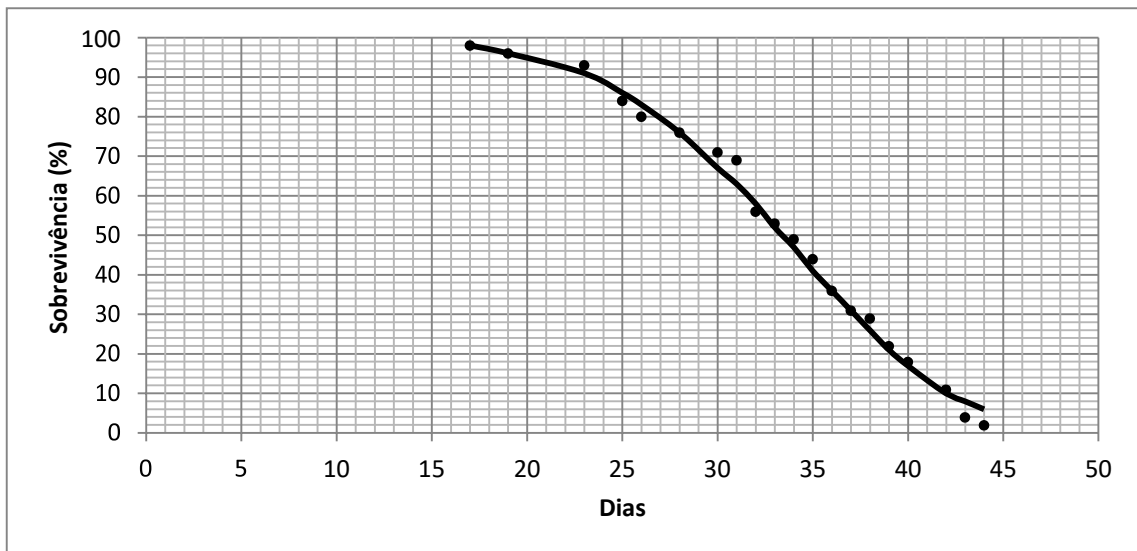


Figura 4.3 – Curva de sobrevivência seguindo o modelo de distribuição de Weibull com os resultados observados (pontos) e os resultados esperados (linha) para adultos fêmeas de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).

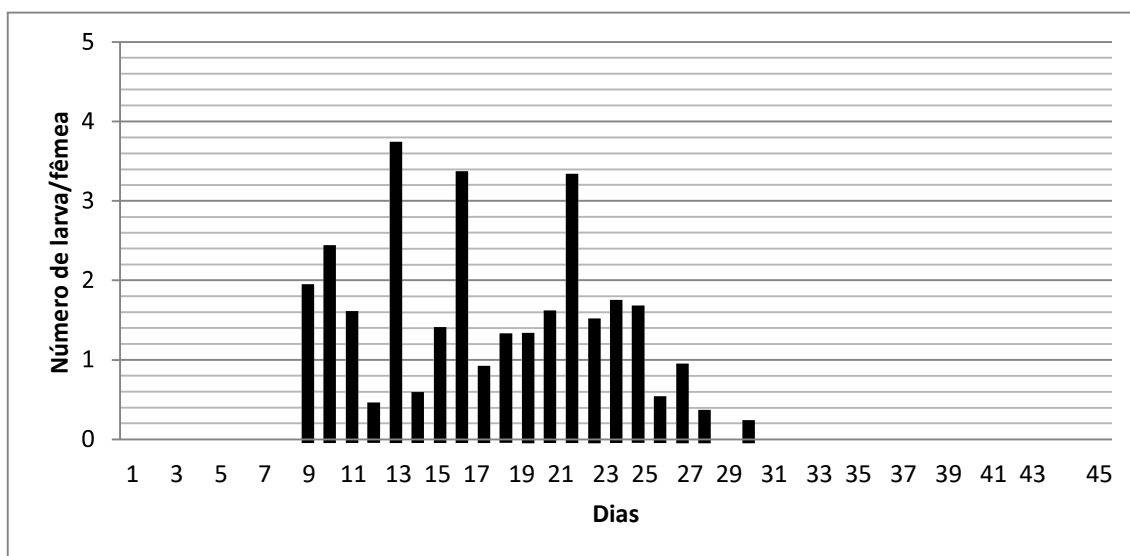


Figura 4.4 – Número de larvas depositadas em carne moída em estágio inicial de decomposição dividido pelo número de fêmeas de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) mantidos em condições de laboratório (27 ± 1 °C, 50 ± 10 % UR e 12 horas de fotofase).

4.2. Caracterização morfológica de imaturos de dípteros muscoides através da microscopia eletrônica de varredura

Foram obtidas no total 261 micrografias de quatro espécies de dípteros muscóides da família Sarcophagidae coletadas no campus da FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. As espécies *Ravinia belforti* e *Peckia (Pattonella) intermutans* foram fixadas utilizando o método de fixação com glutaraldeído e pós-fixação com tetróxido de ósmio. As espécies *Peckia (Euboettcheria) anguilla* e a variação morfológica de *Peckia (Euboettcheria) collusor* foram fixadas em etanol 70 %, sem qualquer processo de pós-fixação.

A morfologia geral das larvas dos sarcófagídeos analisados segue o padrão vermiforme típico de larvas de dípteros muscoides, com coloração amarelo palha. A região anterior é mais pontiaguda que a região posterior. O corpo cilíndrico da larva apresenta um segmento cefálico (pseudocéfalo), três segmentos torácicos (t1-t3), sete segmentos abdominais (a1-a7) e um segmento anal, totalizando 12 segmentos (Figuras 4.5A, 4.8A, 4.17A, 4.20A e 4.26A).

O espiráculo posterior de todas as espécies analisadas se encontra internalizado na região posterior durante todos os instares larvais. Larvas de primeiro e segundo instar apresentam duas aberturas espiraculares em cada um dos dois peritremas incompletos que compõem o espiráculo posterior. O espiráculo anterior, localizado no primeiro segmento torácico (t1), está ausente apenas em larvas de primeiro instar, sendo facilmente visível em larvas de segundo e terceiro instar, bem como nos pupários. As larvas de terceiro instar e os pupários das espécies estudadas apresentam três aberturas espiraculares em cada um dos peritremas incompletos presentes na placa espiracular internalizada na região posterior.

Nas sessões a seguir, estão as principais características das formas imaturas de todas as quatro espécies estudadas. O quadro 4.1 mostra um comparativo das principais características destas espécies analisadas neste estudo.

4.2.1. *Ravinia belforti*

4.2.1.1. Larva de primeiro instar – L1

Na região cefálica se encontra o pseudocéfalo. Ele é dividido em dois lóbulos, nos quais estão localizadas as antenas, os palpos maxilares e as cristas orais (Fig. 4.5B). Foi observada a presença de ganchos maxilares apenas nas amostras de primeiro instar (Fig. 4.6A). Os espinhos que separam a região cefálica do primeiro segmento torácico, conhecidos como espinhos do colar cefálico, são espinhos dentiformes pequenos, achatados e dispostos em grupos de pontas triplas ou quádruplas (Fig. 4.6B). O corpo da larva apresenta um tegumento enrugado com os segmentos divididos por espinhos menores, achatados e com pontas simples, apontados sempre para a região posterior. A região posterior é mais robusta e nela está localizado o espiráculo posterior, com a placa espiracular internalizada. Esta região apresenta um número maior de espinhos e os tubérculos circunspiraculares ainda não estão bem desenvolvidos (Fig. 4.7).

4.2.1.2. Larva de segundo instar – L2

O corpo da larva L2 de *R. belforti* é similar à larva L1, porém apresenta um tamanho maior (Fig. 4.8A). A região cefálica é mais desenvolvida. Nesta região, as antenas em forma de cúpula, as cristas orais e o palpo maxilar estão claramente visíveis. Os espinhos do colar cefálico se tornam mais definidos, achatados e com pontas duplas, triplas ou quádruplas (Fig. 4.8B e Fig. 4.9A). Ganchos maxilares se encontraram retraídos em todas as amostras analisadas. O espiráculo anterior apresenta um número variado de ramificações espiraculares (16-22). As ramificações espiraculares estão dispostas ao longo do espiráculo em fileiras irregulares, geralmente num padrão de fileiras duplas (Fig. 4.9B). Os espinhos dos segmentos torácicos são de ponta simples (Fig. 4.10A). No segmento anal, o espiráculo posterior apresenta um par de peritremas incompletos, com duas aberturas espiraculares cada um. A placa espiracular está internalizada na região anal, que por sua vez se encontra rodeada por tubérculos circunspiraculares mais desenvolvidos e alongados. Estes tubérculos estão dispostos em quatro trios, ao redor da cavidade espiracular, totalizando 12 tubérculos (Fig. 4.10B).

4.2.1.3. Larva de terceiro instar – L3

As larvas de terceiro instar apresentam uma morfologia similar às larvas L2, porém são mais pesadas e maiores. Além disso, apresentam estruturas completamente desenvolvidas e espinhos em maior quantidade (Fig. 4.11A). O pseudocéfalo apresenta as antenas, cristas orais e os palpos maxilares totalmente desenvolvidos (Fig. 4.11B). Os espinhos dentiformes do colar cefálico estão mais visíveis e bem desenvolvidos (com pontas que variam de 1 a 4), ficando mais grossos e densos à medida que se aproximam do primeiro segmento torácico (Fig. 4.12A). O espiráculo anterior, além de estar mais desenvolvido e com as ramificações mais ornamentadas, sofreu uma modificação, em relação ao formato do espiráculo de L2 (Fig. 4.12B). Em L3, as ramificações espiraculares seguem uma fileira regular até o meio do espiráculo. Nesta região, as ramificações formam fileiras

irregulares e posteriormente, seguem até a outra extremidade do espiráculo anterior novamente como fileiras regulares. Estas fileiras irregulares apenas no meio do espiráculo são formadas por apenas uma ou duas ramificações, o que dá uma impressão de quase dividir o espiráculo em dois, num formato semelhante a um coração. Os espinhos intersegmentares são de ponta simples (Fig. 4.13A). O tegumento entre os segmentos também apresenta espinhos de ponta simples. A placa espiracular, na região posterior, está internalizada assim como em L1 e L2. Os dois peritremas possuem três aberturas espiraculares cada um, circundadas incompletamente. O arranjo das aberturas espiraculares dispostas no peritrema revelou que as aberturas eram grossas, longas e orientadas verticalmente. A distância entre os peritremas é curta, o que dificulta a visualização da cicatriz anal em algumas amostras. Os tubérculos circunspiraculares estão totalmente desenvolvidos e alongados (Fig. 4.13B).

4.2.1.4. Pupário

O pupário de *R. belforti* apresenta morfologia similar aos pupários de outras espécies de Sarcophagidae (Fig.4.14A). O segmento cefálico é retraído, deixando os espiráculos anteriores como a extremidade mais anterior do corpo (Fig. 4.14B e Fig. 4.15B). A morfologia geral lembra a morfologia da larva de terceiro instar. Os espinhos intersegmentares são robustos, bem como na larva L3 e apresentam pontas simples (Fig. 4.15A). O tegumento apresenta menos espinhos que da larva L3, porém as rugas ainda estão presentes. O espiráculo posterior é profundamente internalizado, mantendo as três aberturas espiraculares da larva L3 (Fig. 4.16).

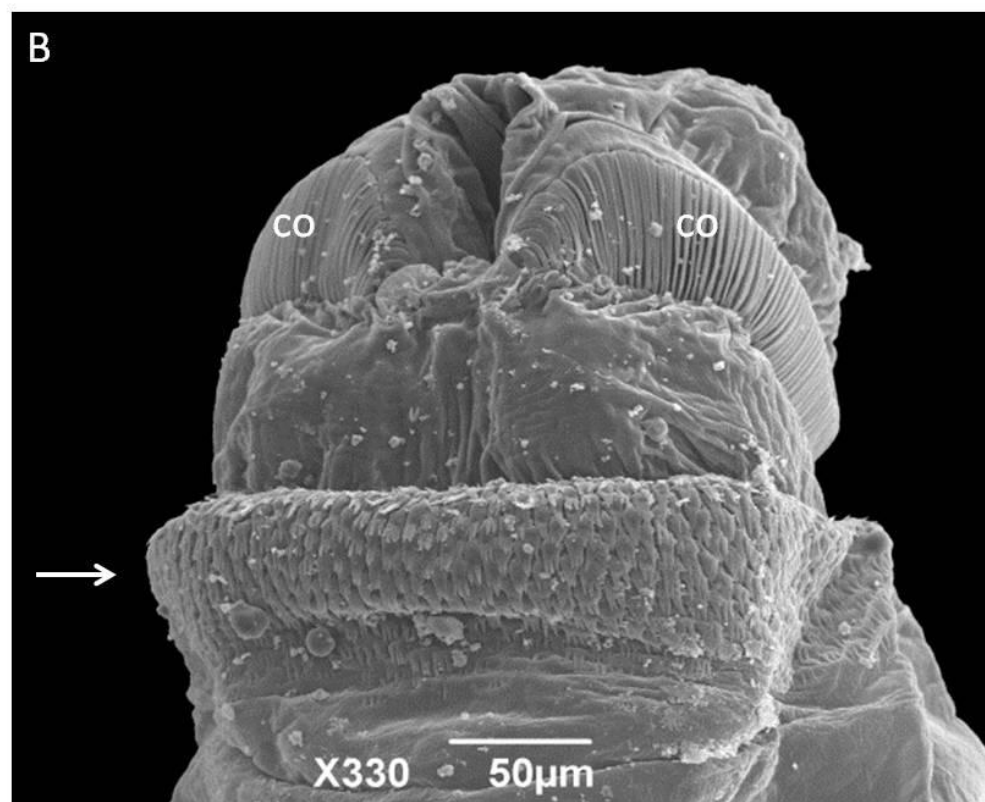
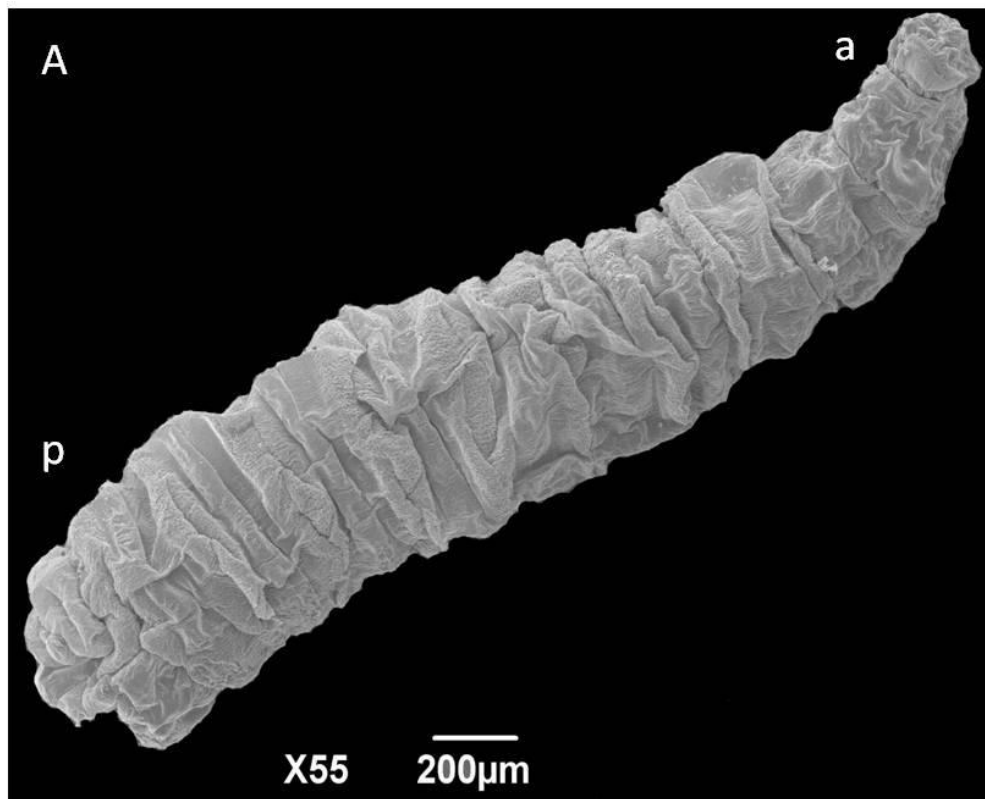


Figura 4.5 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Ravinia belforti*. A – Visão geral do corpo da larva com a região anterior (a) e posterior (p). B – Pseudocéfalo com cristas orais (co) e colar cefálico (seta).

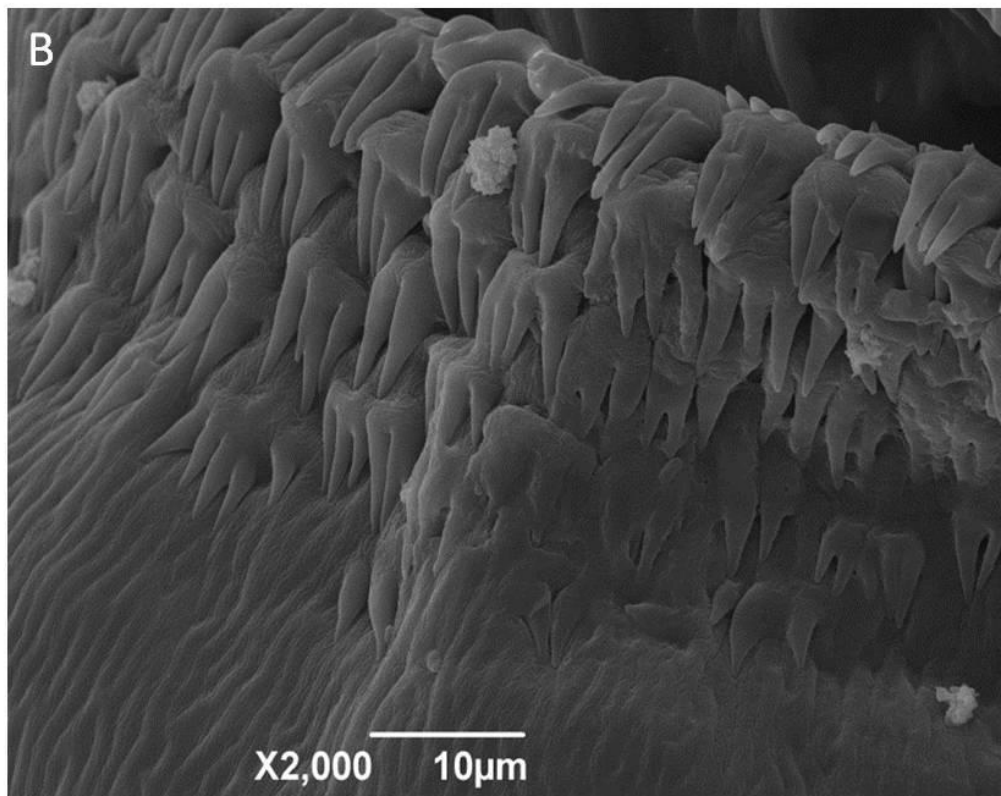
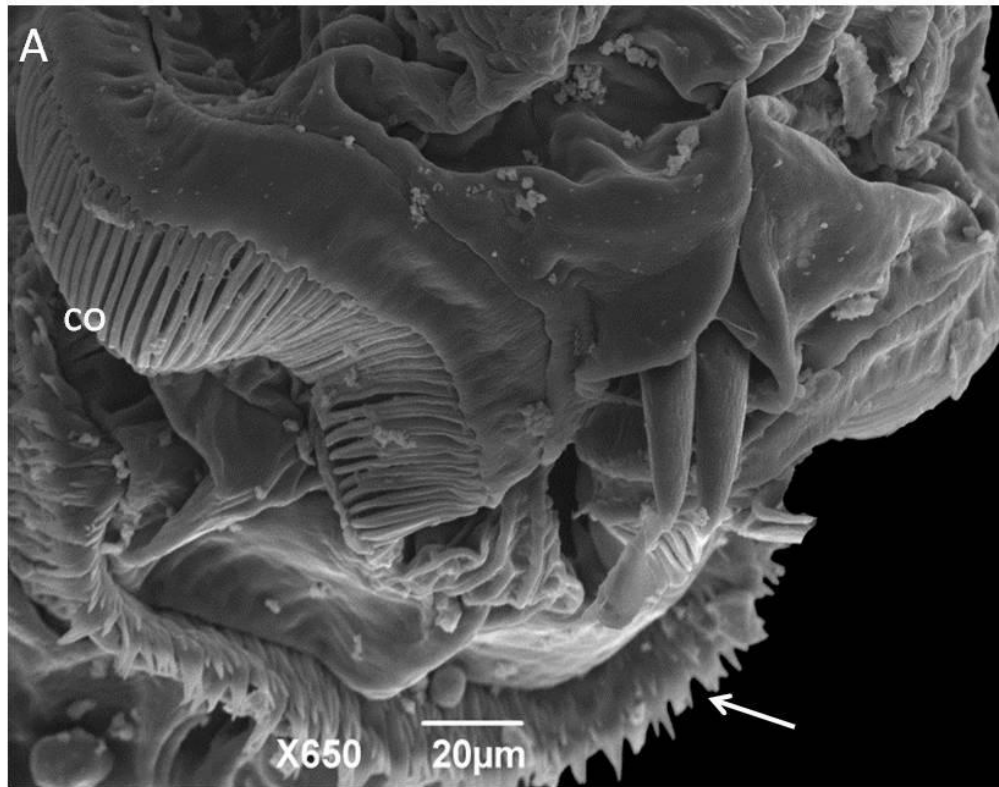


Figura 4.6 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Ravinia belforti*. A – Vista frontal do pseudocéfalo com ganchos maxilares, cristas oriais (co) e espinhos do colar cefálico (seta). B – Detalhe dos espinhos do colar cefálico com pontas duplas, triplas e quádruplas.

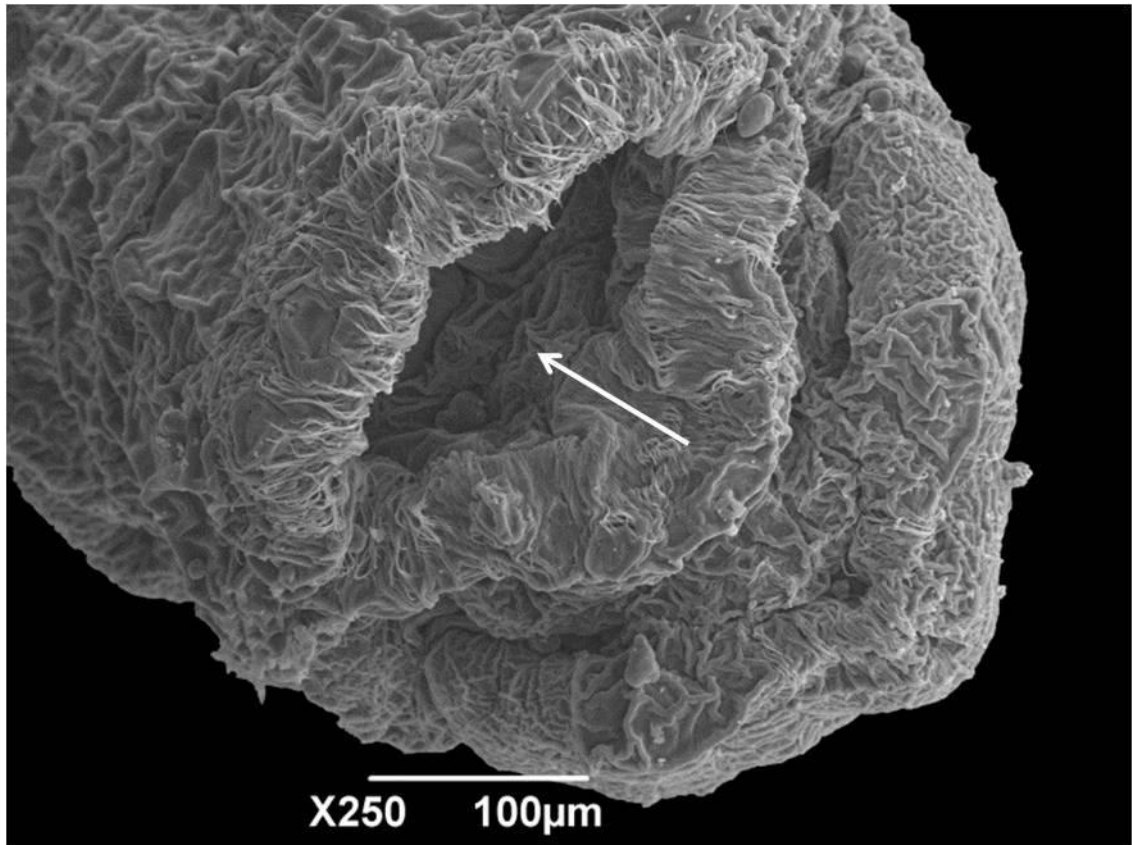


Figura 4.7 – Micrografia eletrônica de varredura da região posterior de uma larva de primeiro instar de *Ravinia belforti*. A seta indica o espiráculo posterior internalizado na cavidade anal.

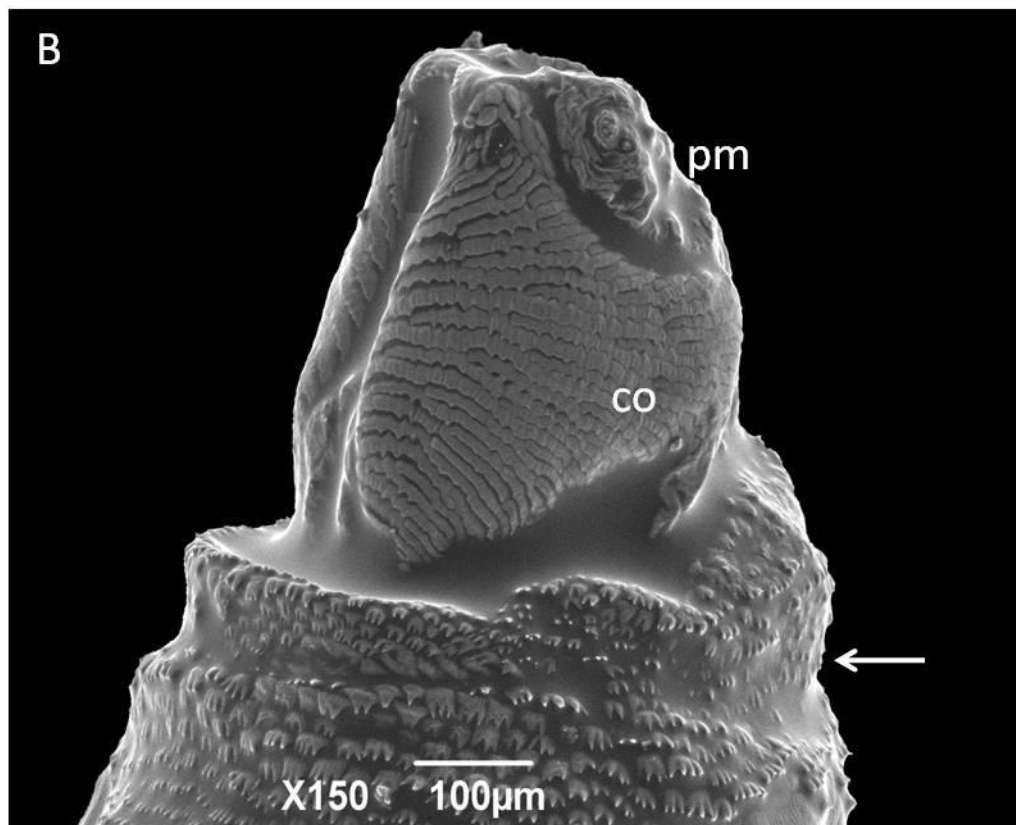
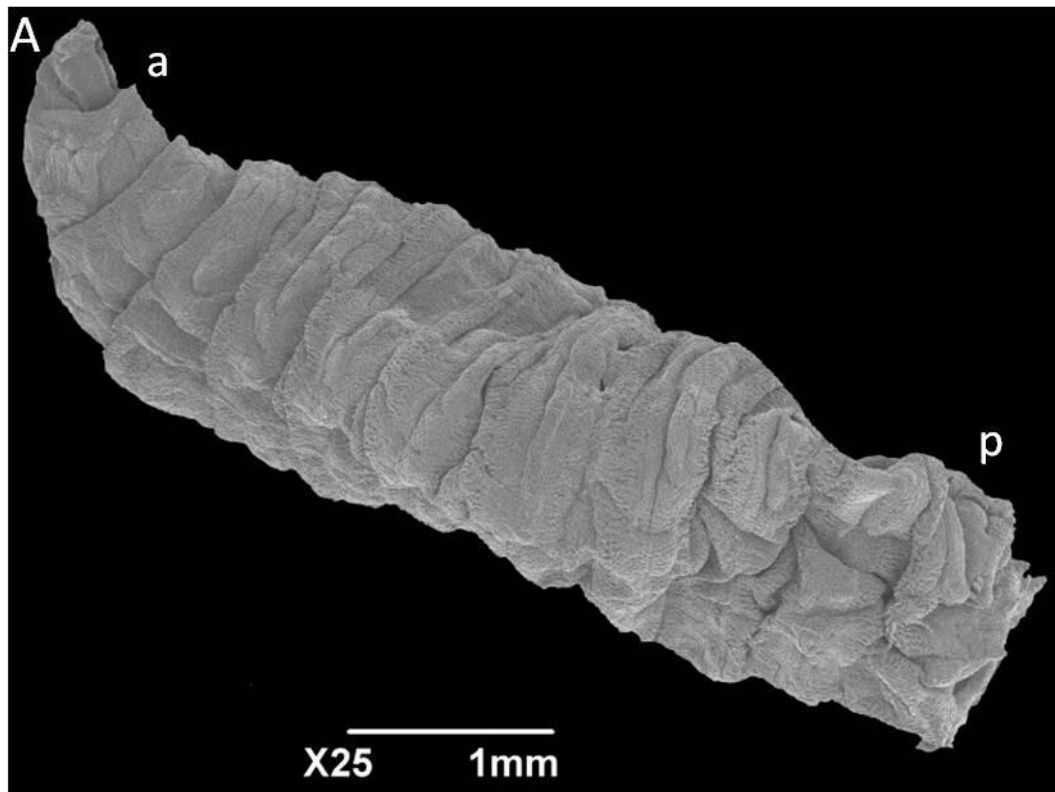


Figura 4.8 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Ravinia belforti*. A – Larva de corpo inteiro. Região anterior (a) e posterior (p). B – Região anterior com os palpos maxilares (pm), as cristas orais (co) e os espinhos do colar cefálico (seta). Os ganchos maxilares se encontram retraídos.

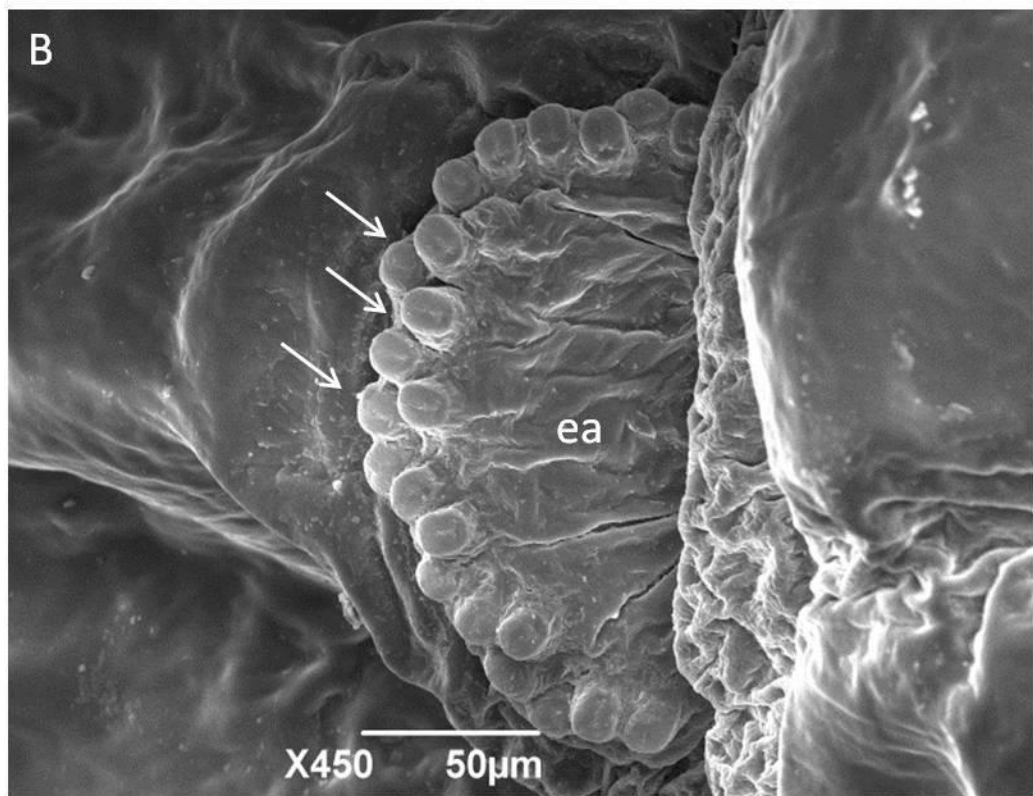
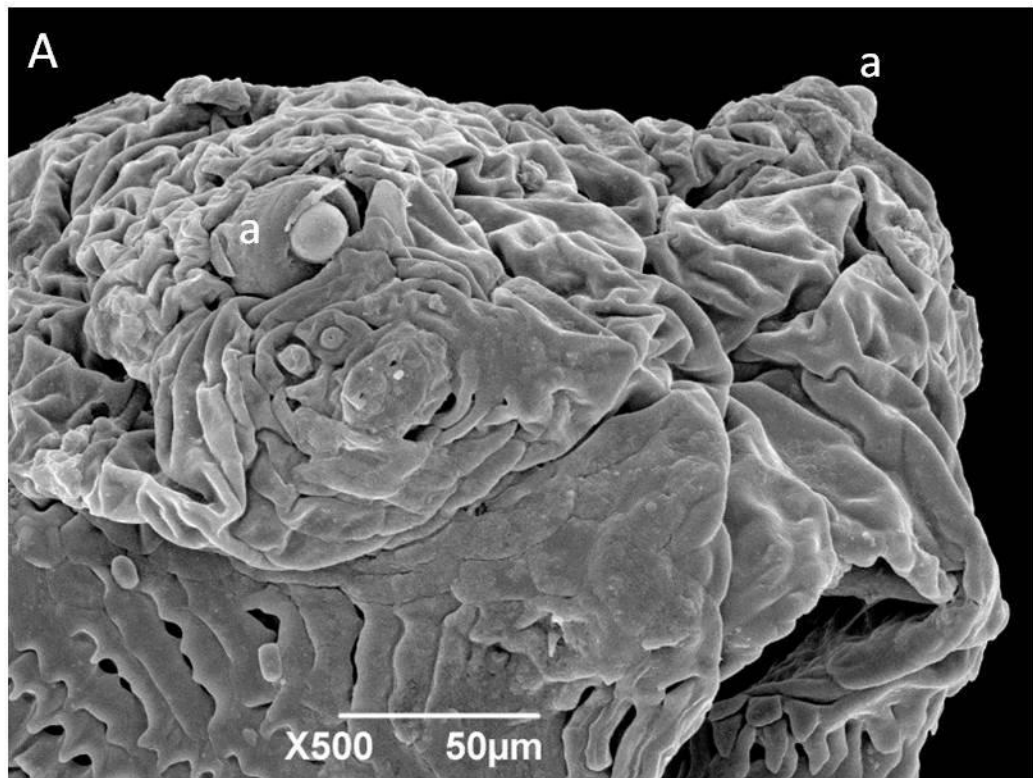


Figura 4.9 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Ravinia belforti*. A – Detalhe do pseudocéfalo com o par de antenas (a) e ganchos maxilares retraídos. B – Espiráculo anterior (ea) com as papilas (setas) dispostas em fileiras irregulares.

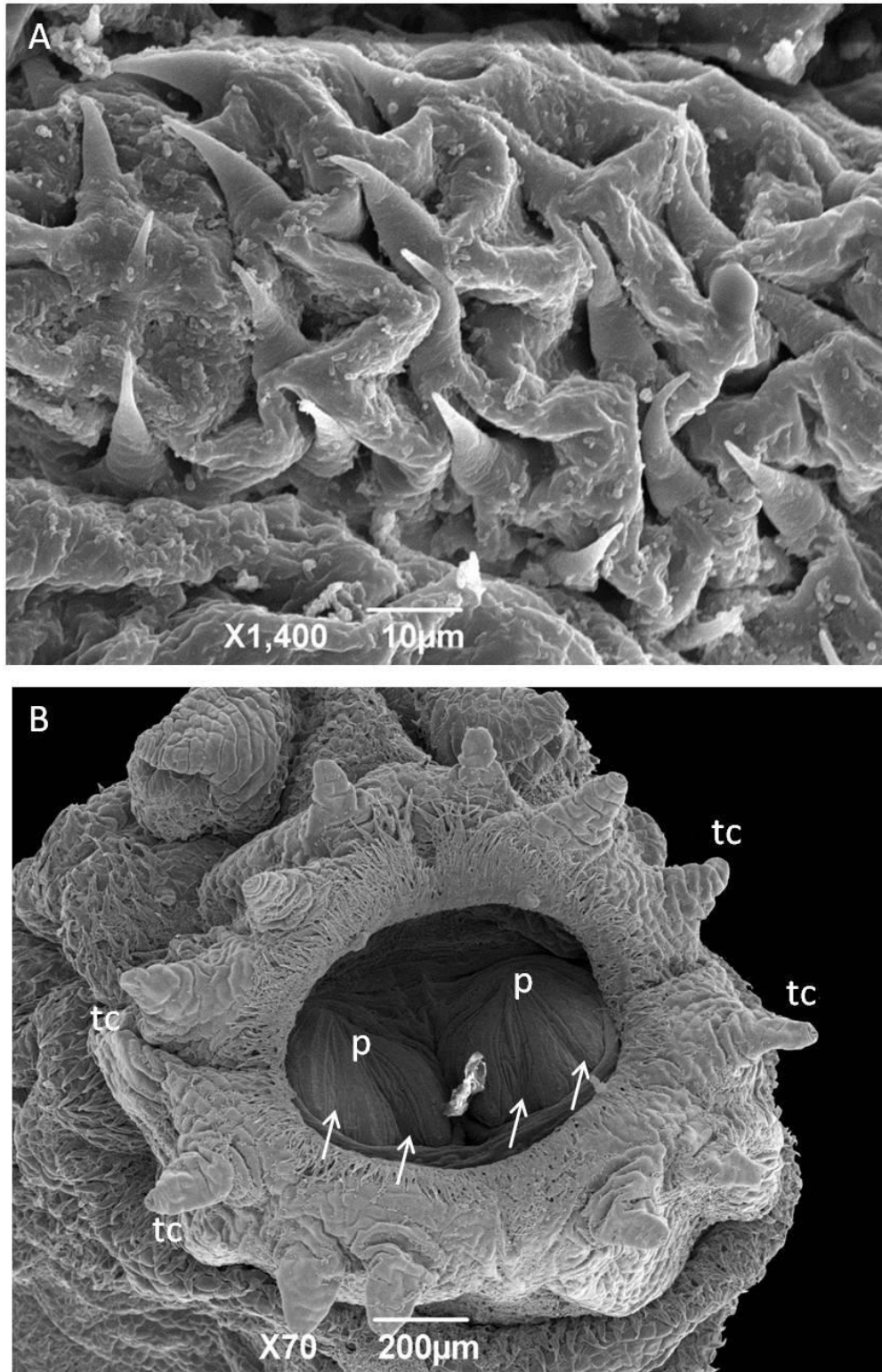


Figura 4.10 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Ravinia belforti*. A – Espinhos intersegmentares torácicos. B – Região posterior rodeada por tubérculos circunspiraculares (tc). Espiráculo posterior internalizado, com duas aberturas espiraculares (setas) em cada peritrema (p).

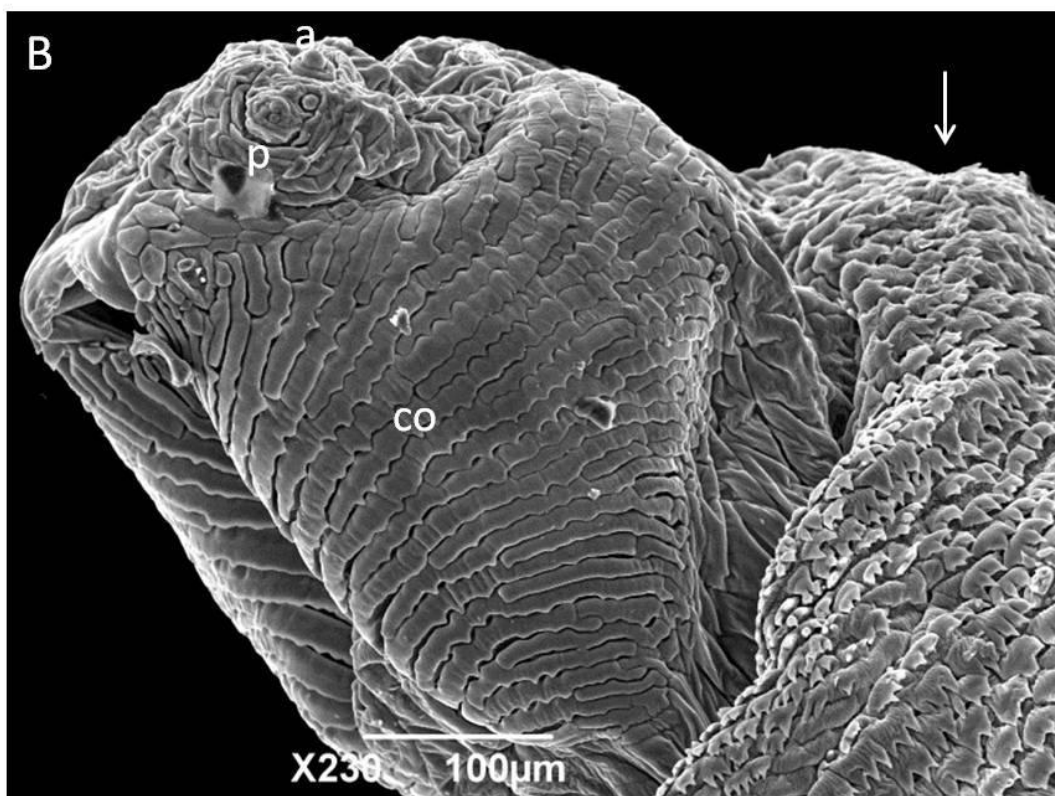
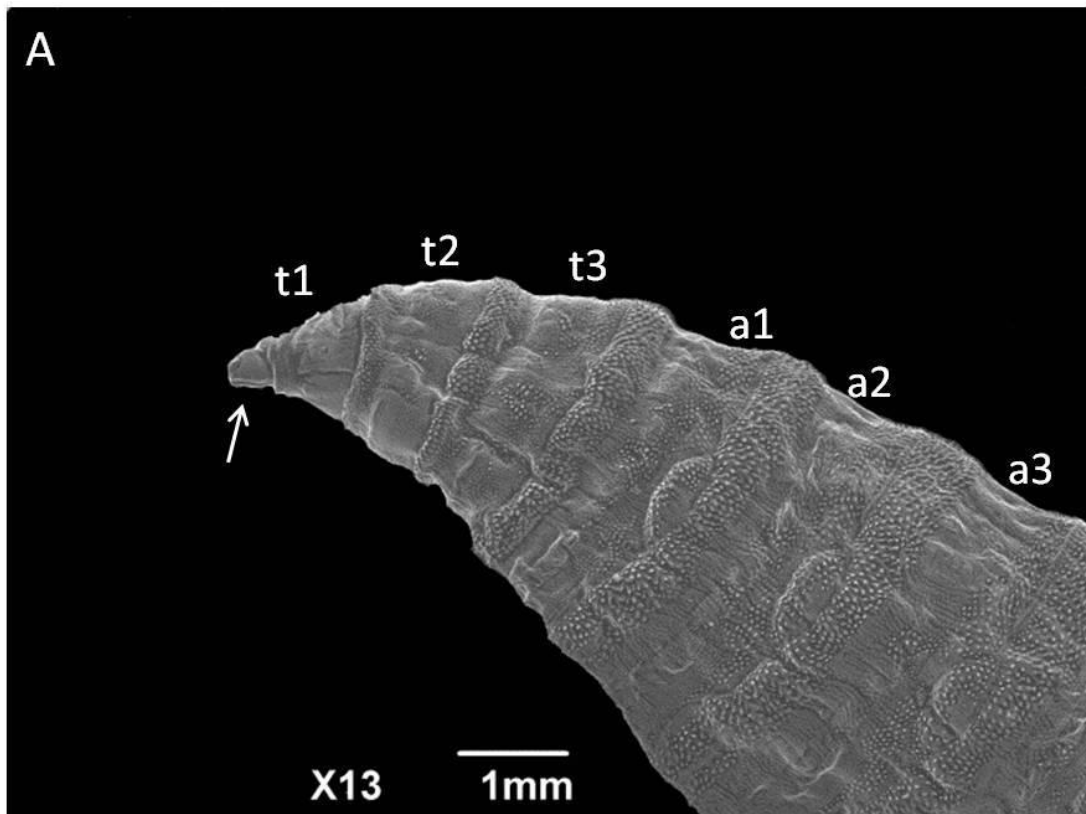


Figura 4.11 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Ravinia belforti*. A – Visão de alguns segmentos da região anterior: pseudocéfalo (seta), segmentos torácicos (t1, t2 e t3) e três segmentos abdominais (a1, a2 e a3). B – Detalhe da região cefálica com antena (a), papilas (p), crista oral (co) e espinhos do colar cefálico (seta). Ganchos maxilares retraídos.

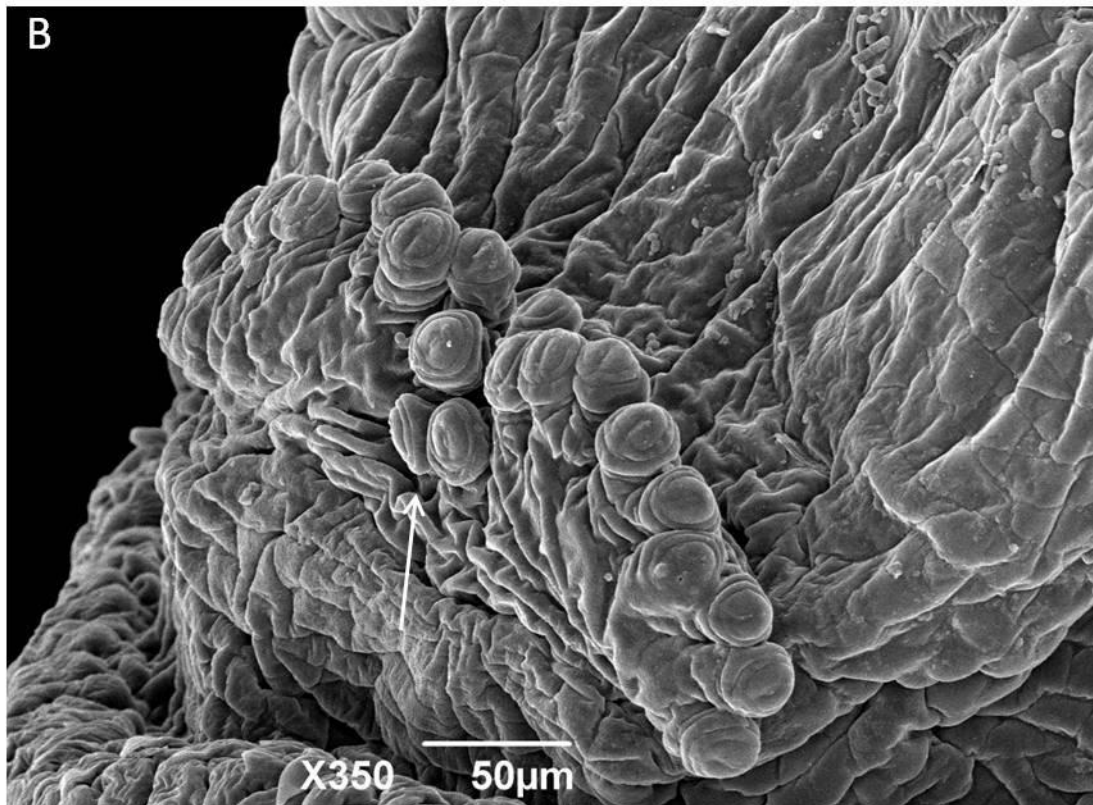
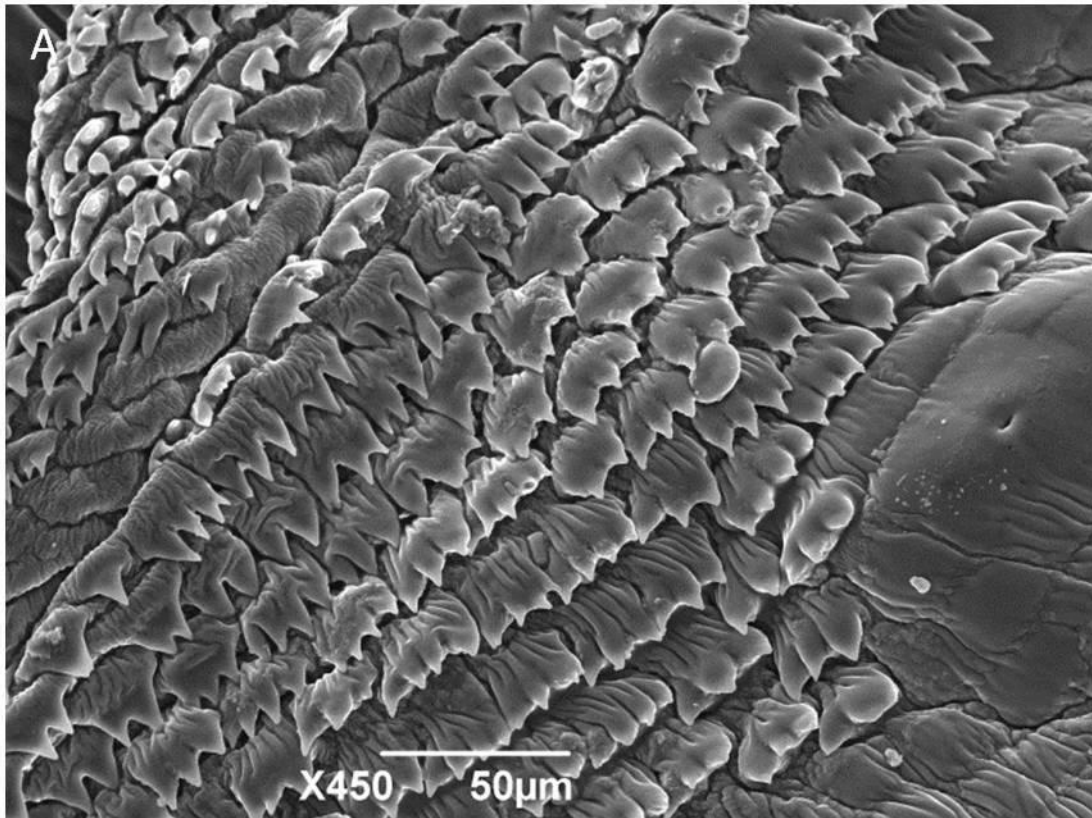


Figura 4.12 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Ravinia belforti*. A – Espinhos do colar cefálico. B – Seta indicando a irregularidade das papilas no meio do espiráculo anterior.

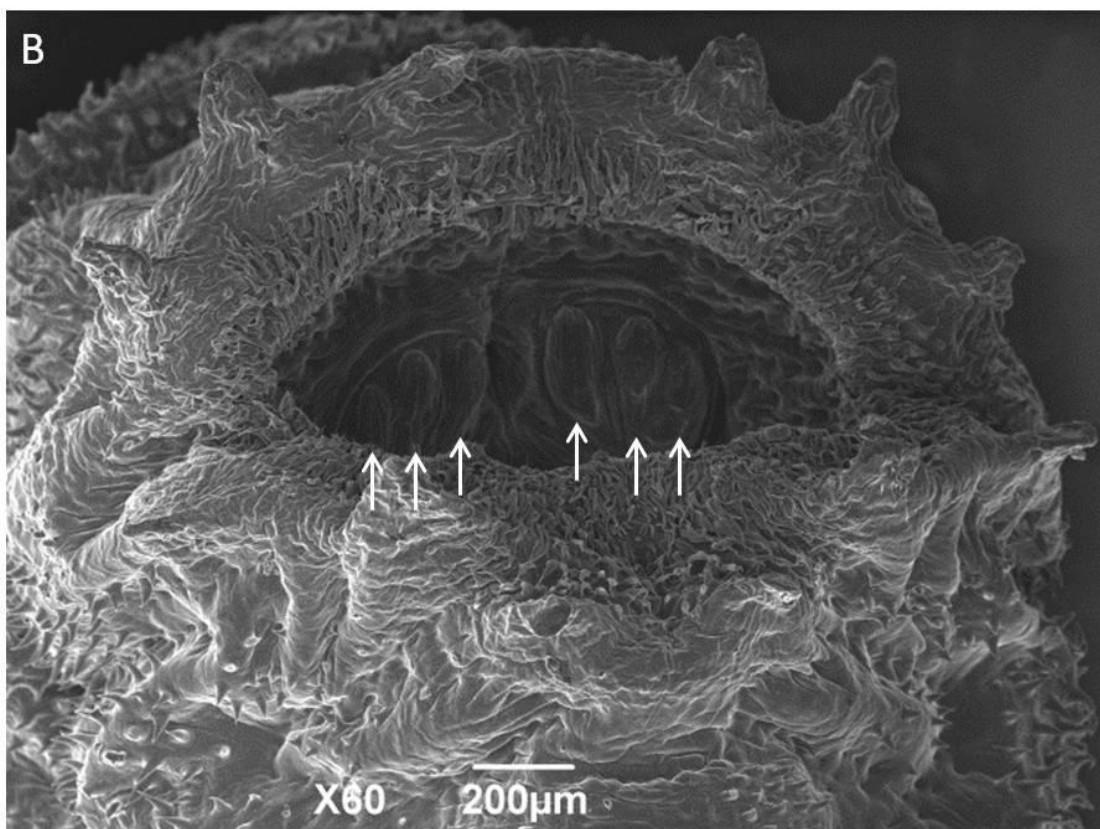
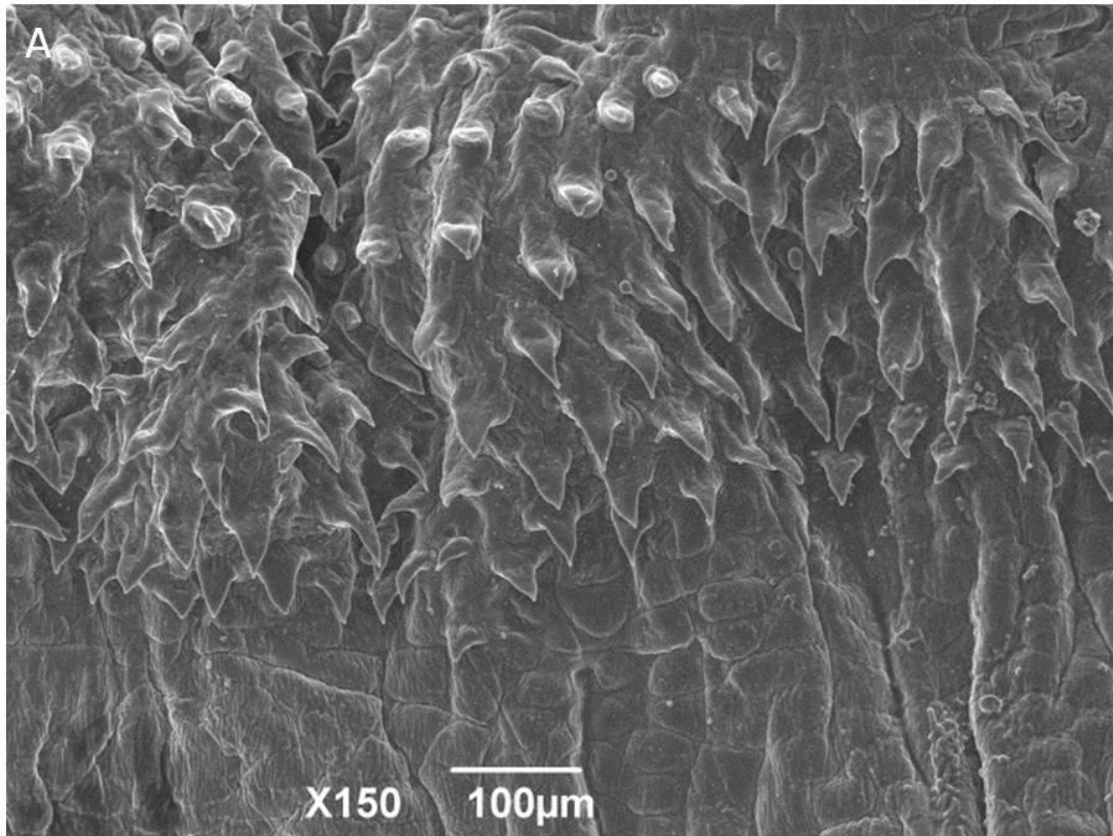


Figura 4.13 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Ravinia belforti*. A – Espinhos do intersegmento torácico. B – Região posterior com as setas indicando as três aberturas espiraculares em cada um dos peritremas.

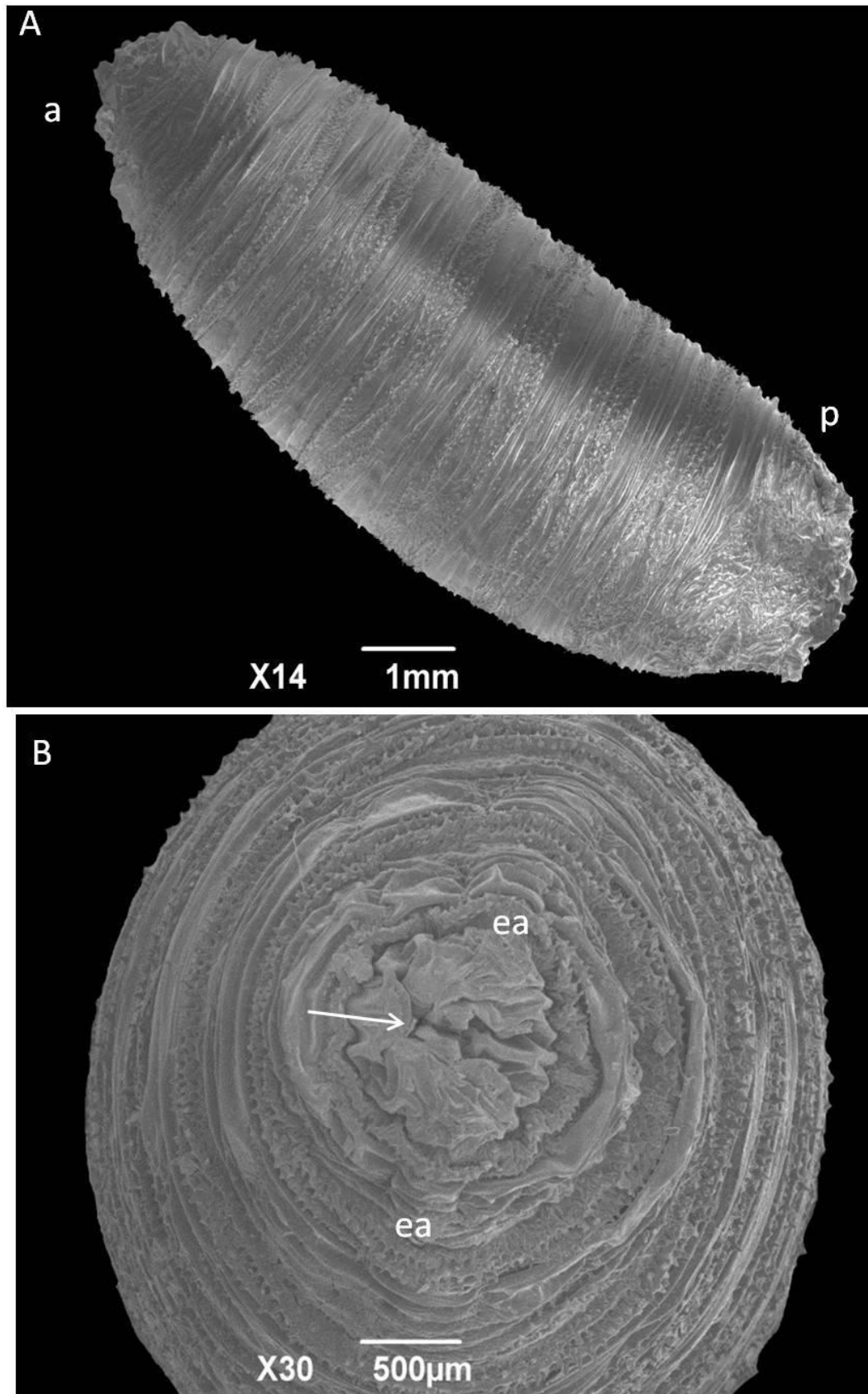


Figura 4.14 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Ravinia belforti*. A – Vista geral do pupário. Região anterior (a) e posterior (p). B – Vista frontal da região anterior com o pseudocéfalo retraído (seta) e os espiráculos anteriores (ea).

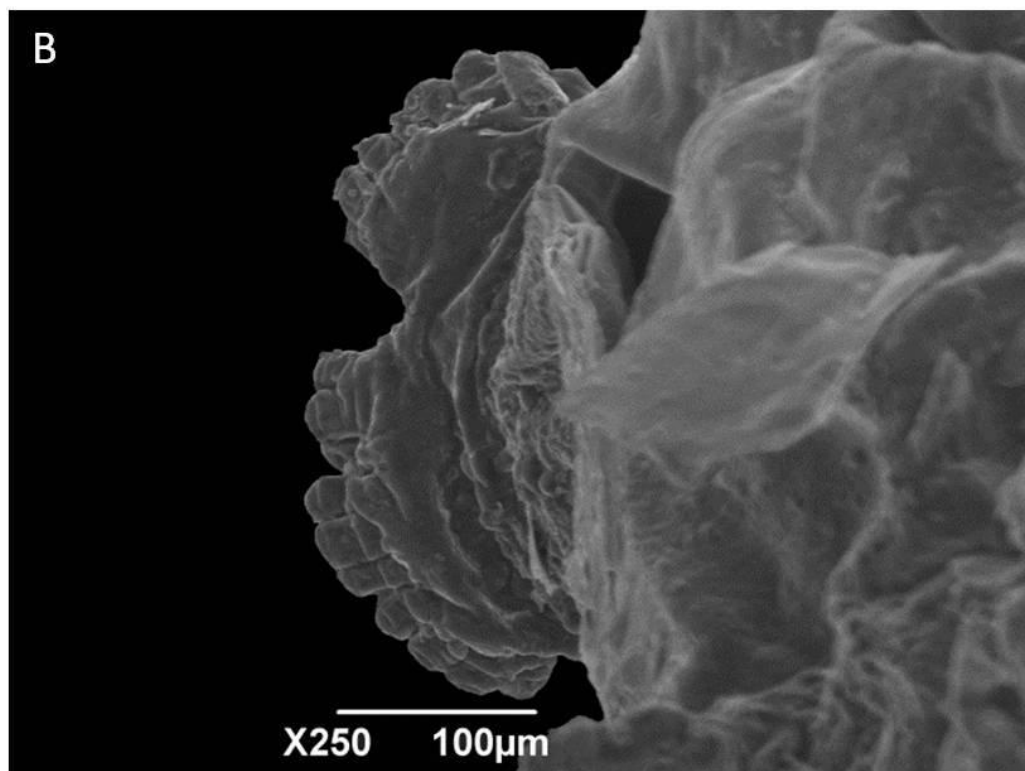
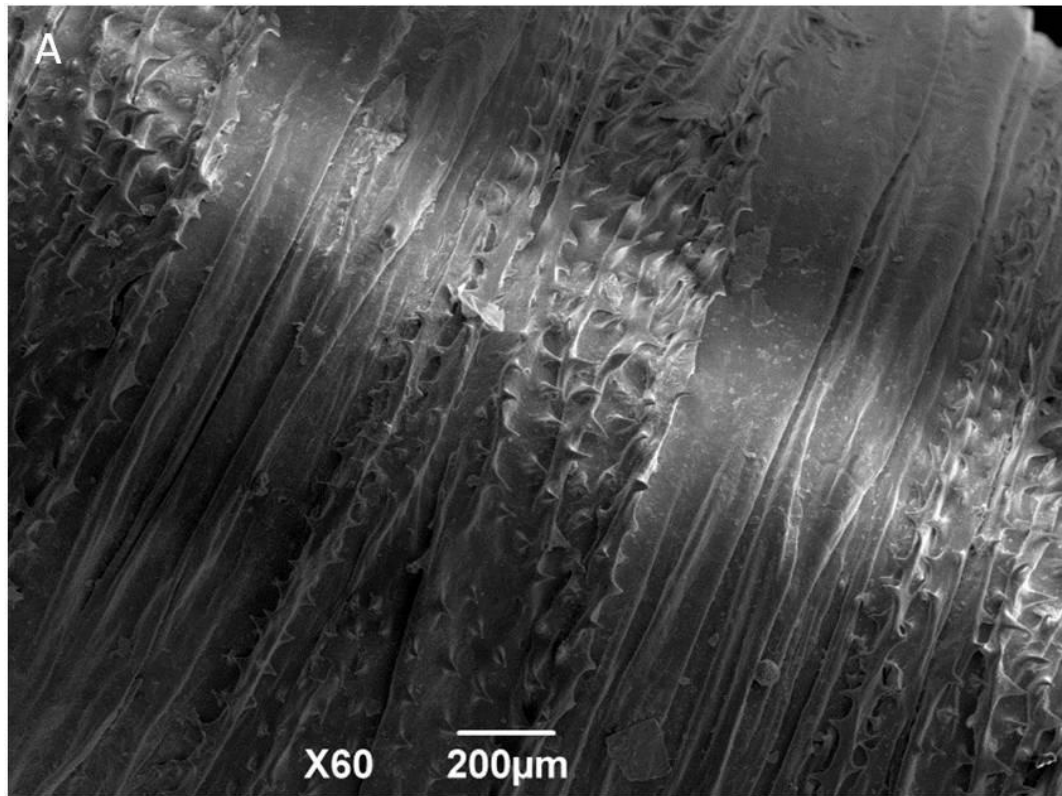


Figura 4.15 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Ravinia belforti*. A – Espinhos intersegmentais. B – Espiráculo anterior.

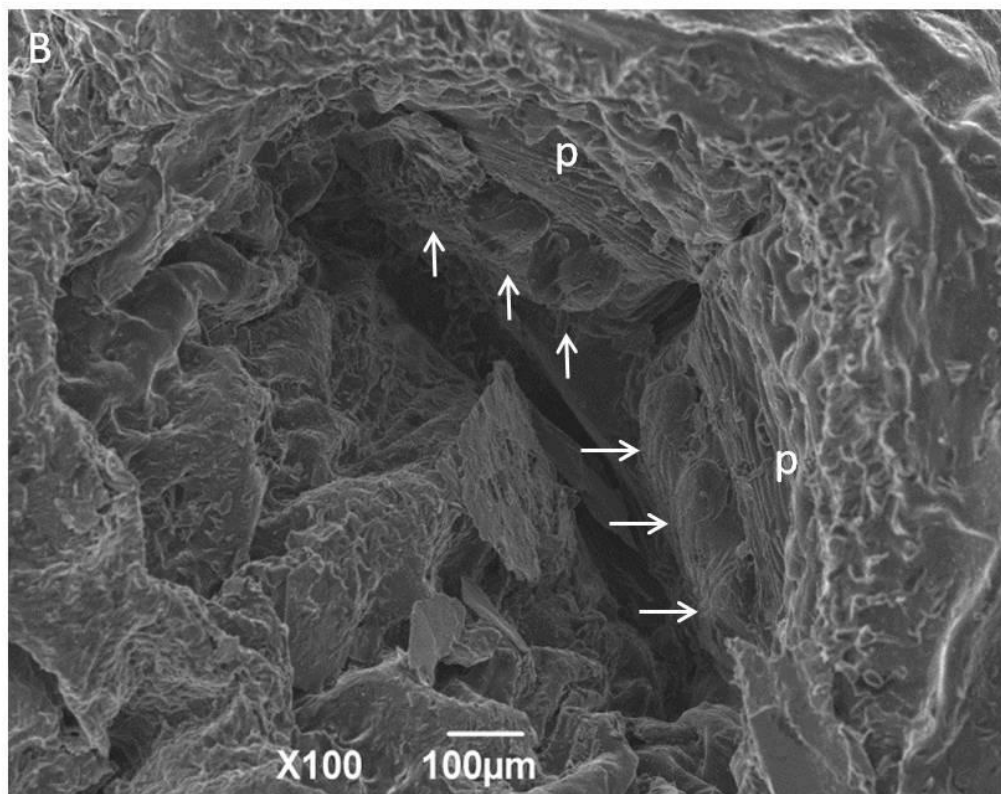
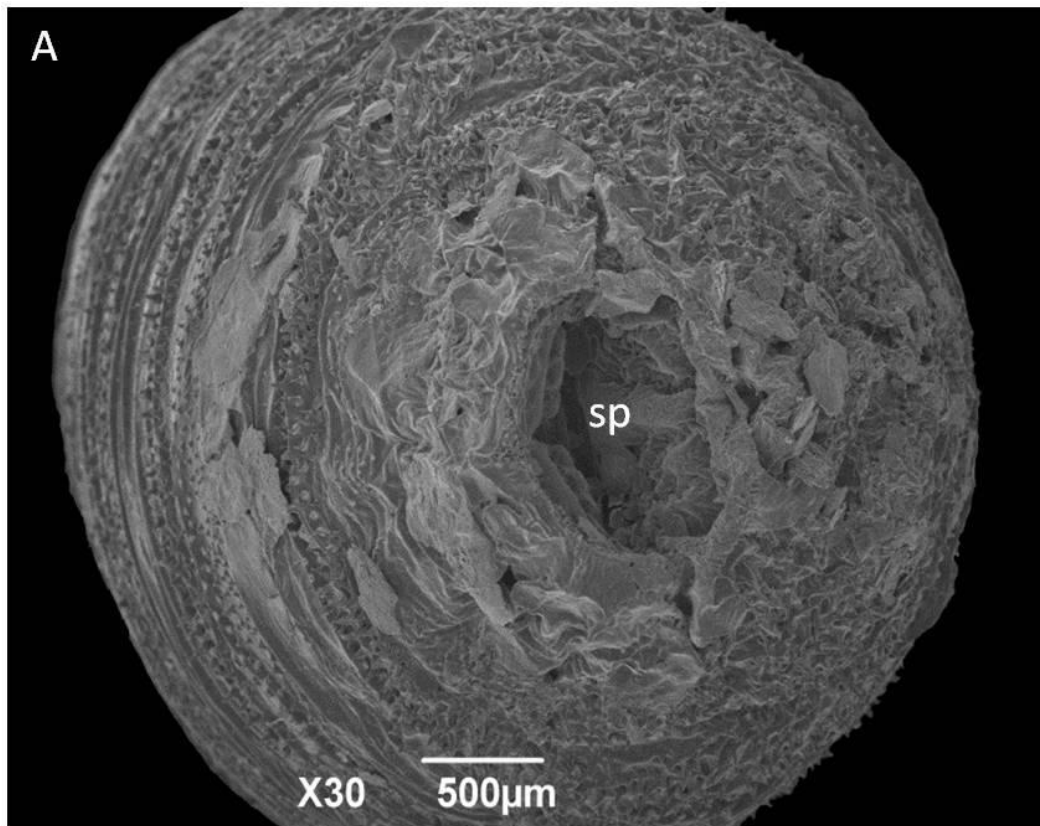


Figura 4.16 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Ravinia belforti*. A – Vista frontal da região posterior com a placa espiracular internalizada (sp). B – Detalhe do espiráculo posterior com o par de peritremas (p) e as três aberturas espiraculares em cada um deles (setas).

4.2.2. *Peckia (Pattonella) intermutans*

4.2.2.1. Larva de primeiro instar – L1

Os 12 segmentos da larva de primeiro instar são delimitados por espinhos pequenos e estreitos (Fig. 4.17A). A região cefálica apresenta antenas, ganchos, palpos e cristas orais ainda em desenvolvimento (Fig. 4.17B e 4.18A). Os espinhos do colar cefálico são filiformes, ligeiramente alongados e muito semelhantes com os espinhos intersegmentais ao longo do corpo da larva (Fig. 4.18B). Os espinhos intersegmentares estão orientados para a região posterior da larva, com exceção dos espinhos dos últimos segmentos abdominais, com orientação para a região posterior e também, para a região anterior, em um padrão que se repete ao longo dos instares (Fig.4.19A). A região posterior apresenta o espiráculo posterior internalizado na cavidade anal, com um par de peritremas e duas aberturas espiraculares em cada um. Os tubérculos circunspiraculares ainda não são facilmente observados (Fig.4.19B).

4.2.2.2. Larva de segundo instar – L2

A larva de segundo instar apresenta uma morfologia semelhante à larva L1, porém o tamanho e o peso cresceram consideravelmente (Fig.4.20A). O pseudocéfalo já se encontra mais desenvolvido e as papilas maxilares e antenas já são facilmente observadas. O colar cefálico mantém o padrão observado em larvas L1, com alongados espinhos de ponta única e apontados para a região posterior (Fig. 4.20B). No primeiro segmento torácico pode ser visualizado o espiráculo anterior (Fig.4.21A). Ao redor deste espiráculo, as papilas espiraculares estão dispostas em fileiras irregulares em alguns exemplares ou em fileiras regulares em outros. O número de papilas variou de 17 a 35, sendo que quanto mais papilas o espiráculo possuía, mais irregular era sua conformação. Os espinhos intersegmentares neste instar se diferenciam dos espinhos do colar cefálico por apresentarem um aspecto mais dentiforme, sendo mais grossos e curtos e com o

mesmo padrão de orientação do primeiro instar. A região posterior apresenta tubérculos circunspiraculares mais desenvolvidos e alongados na maioria dos espécimes analisados. O padrão de quatro trios ao redor do espiráculo posterior foi observado. Os dois peritremas incompletos apresentam duas aberturas espiraculares cada um (Fig. 4.21B).

4.2.2.3. Larva de terceiro instar – L3

As larvas maduras L3 de *P. (P.) intermutans* mantêm a mesma morfologia dos instares anteriores, porém são mais robustas e maiores. Todas as estruturas sensoriais da região cefálica estão completamente desenvolvidas (Fig. 4.22A). O colar cefálico é densamente composto por fileiras de espinhos dentiformes robustos, ligeiramente achatados e em sua grande maioria, de pontas únicas (Fig. 4.22B). Neste instar foi observado o maior número de papilas do espiráculo anterior (Fig. 4.23A). As papilas estão totalmente desenvolvidas e são mais ornamentadas que nas larvas L2, além disso, foram observados sempre em fileiras irregulares ao redor do espiráculo anterior. Os espinhos intersegmentais são mais grossos e compactados, semelhantes aos espinhos do colar cefálico (Fig. 4.23B). O espiráculo posterior está circundado por tubérculos alongados e bem desenvolvidos (Fig. 4.24A). Cada um dos dois peritremas incompletos da larva de terceiro instar apresentam três aberturas espiraculares mais finas e alongadas do que as observadas nos instares anteriores (Fig. 4.24B).

4.2.2.4. Pupário

O pupário apresenta morfologia semelhante à larva L3, bem como aos outros pupários da família Sarcophagidae (Fig. 4.25A). O pseudocéfalo e o primeiro segmento torácico se encontram retraídos (Fig. 4.25B). O espiráculo anterior segue o mesmo padrão observado no terceiro instar, com fileiras irregulares e elevado número de papilas espiraculares (Fig. 4.26A). O padrão dos espinhos

intersegmentares segue o observado nas larvas L3. O tegumento da pupa é enrugado e os espinhos intersegmentares formam faixas mais estreitas do que nos instares anteriores. O espiráculo posterior se encontra profundamente internalizado na cavidade anal e três aberturas espiraculares são observadas em cada peritrema (Fig. 4.26B).

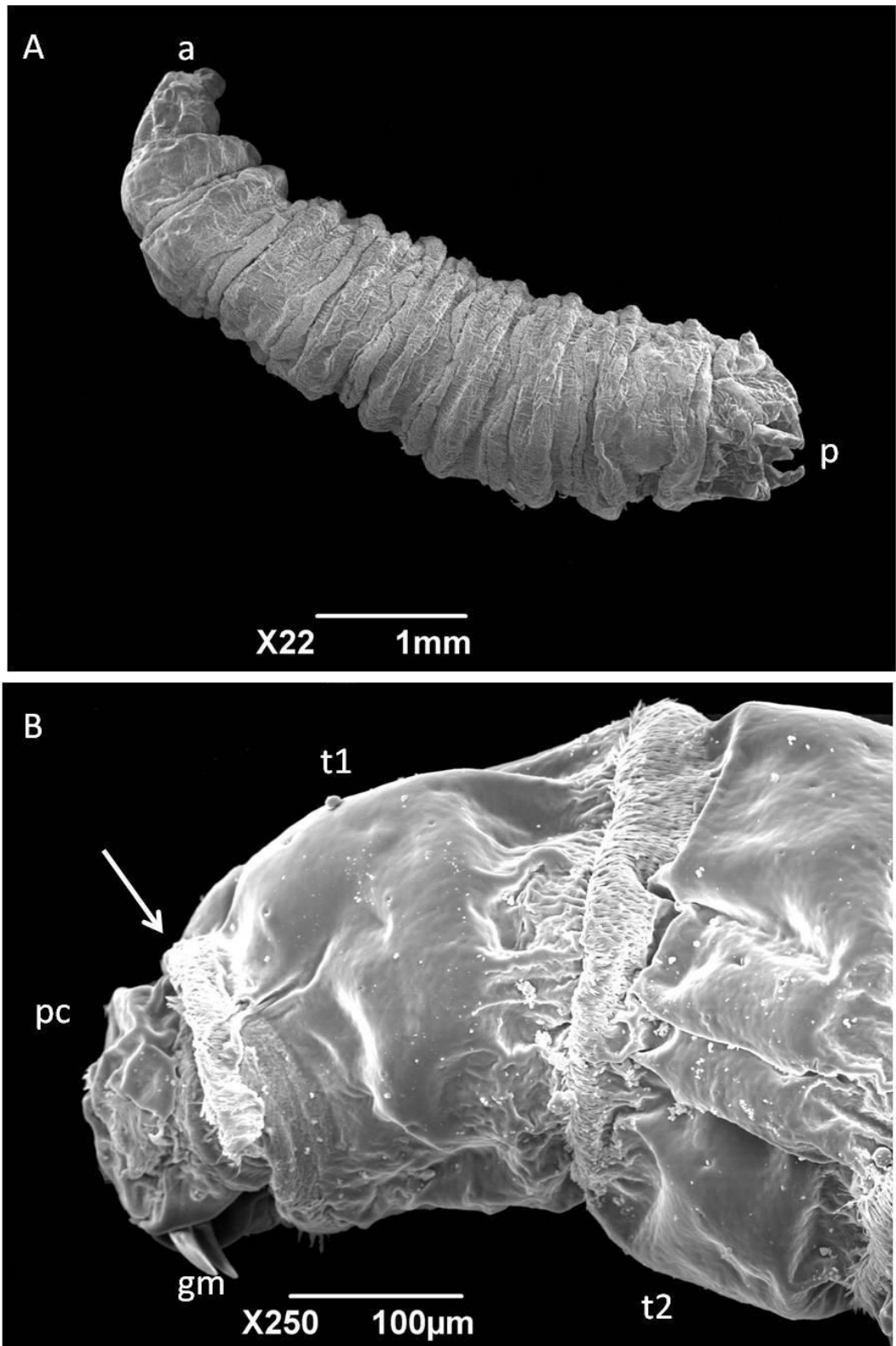


Figura 4.17 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – Corpo inteiro da larva. Região anterior (a) e região posterior (p). B – Região anterior, mostrando o pseudocéfalo (pc), os ganchos maxilares (gm), o colar céfálico (seta) e o primeiro (t1) e segundo (t2) segmento torácico.

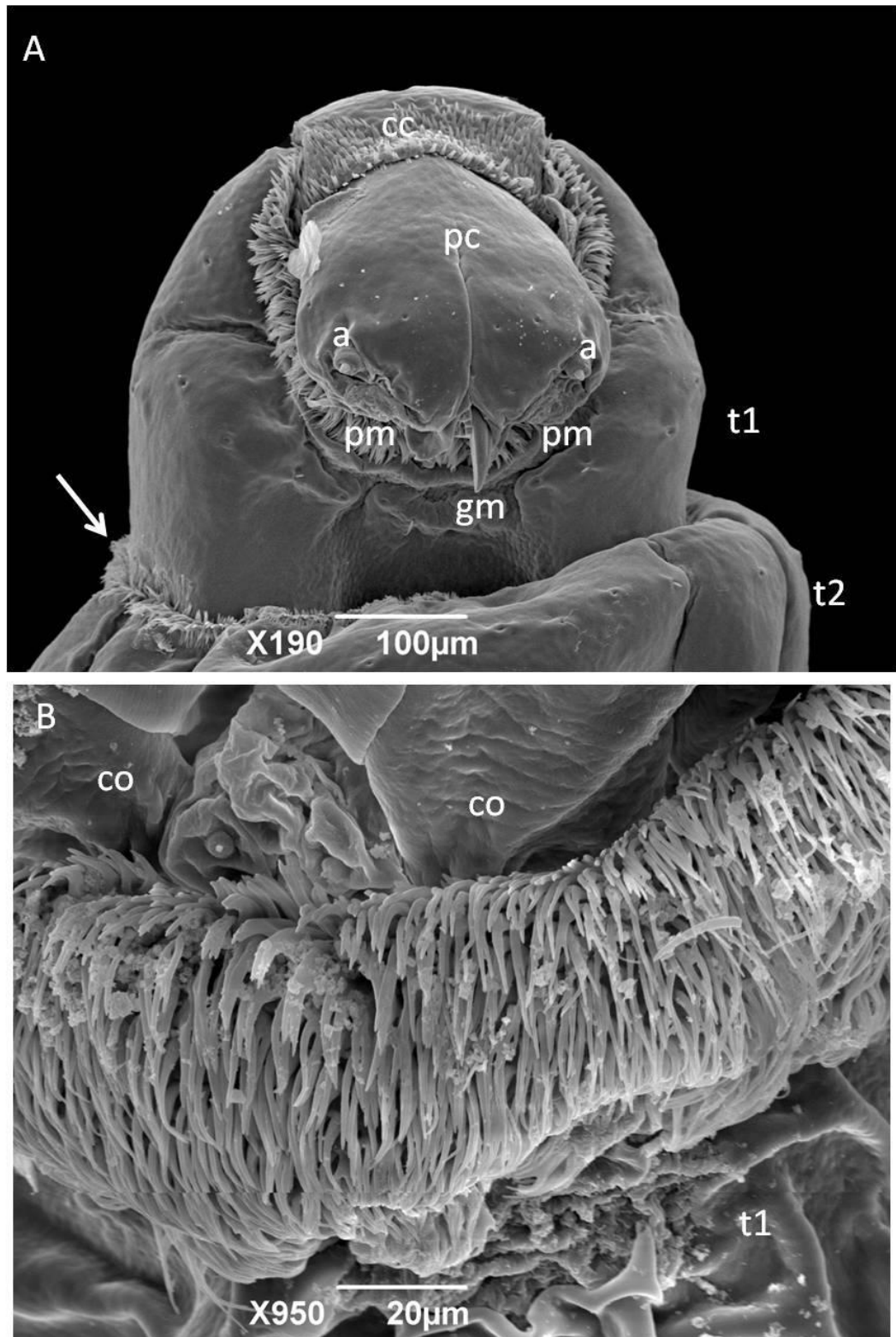


Figura 4.18 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans*. A – Pseudocéfalo (pc) dividido em dois lóbulos, com um par de antenas (a) e de papilas maxilares (pm). Colar cefálico (cc); primeiro (t1) e segundo (t2) segmento torácico; ganchos maxilares (gm); e espinhos intersegmentares (seta). B – Detalhe dos espinhos do colar cefálico dividindo as cristas orais (co) do primeiro segmento torácico (t1).

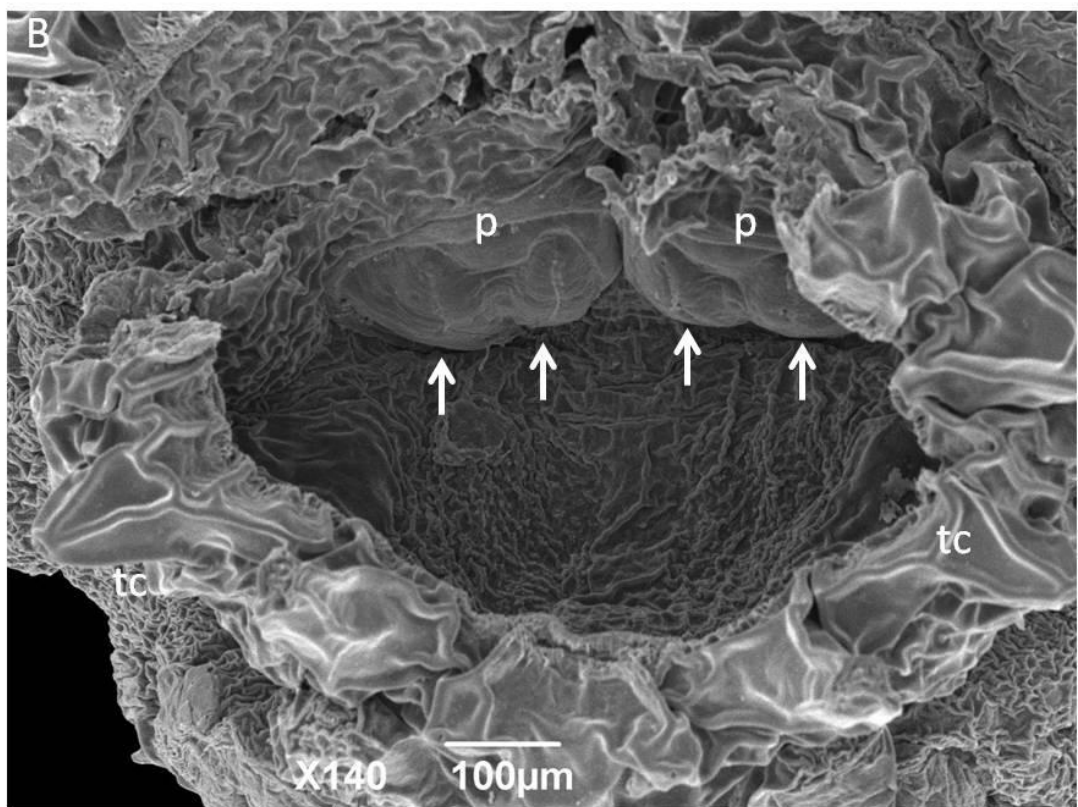
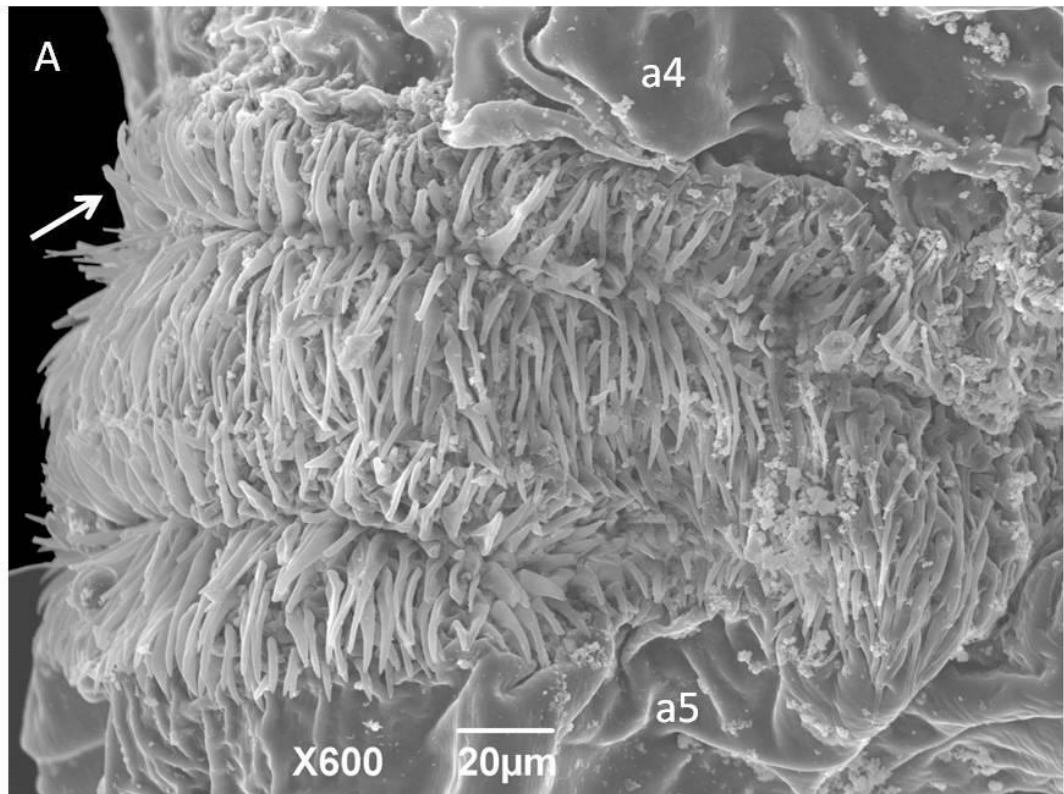


Figura 4.19 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans*. A – Espinhos intersegmentares dividindo o quarto segmento abdominal (a4) do quinto (a5). A seta indica a orientação de alguns espinhos para a região anterior. B - Região posterior rodeada de tubérculos (tc) ainda em desenvolvimento e peritremas (p) com duas aberturas espiraculares (setas).

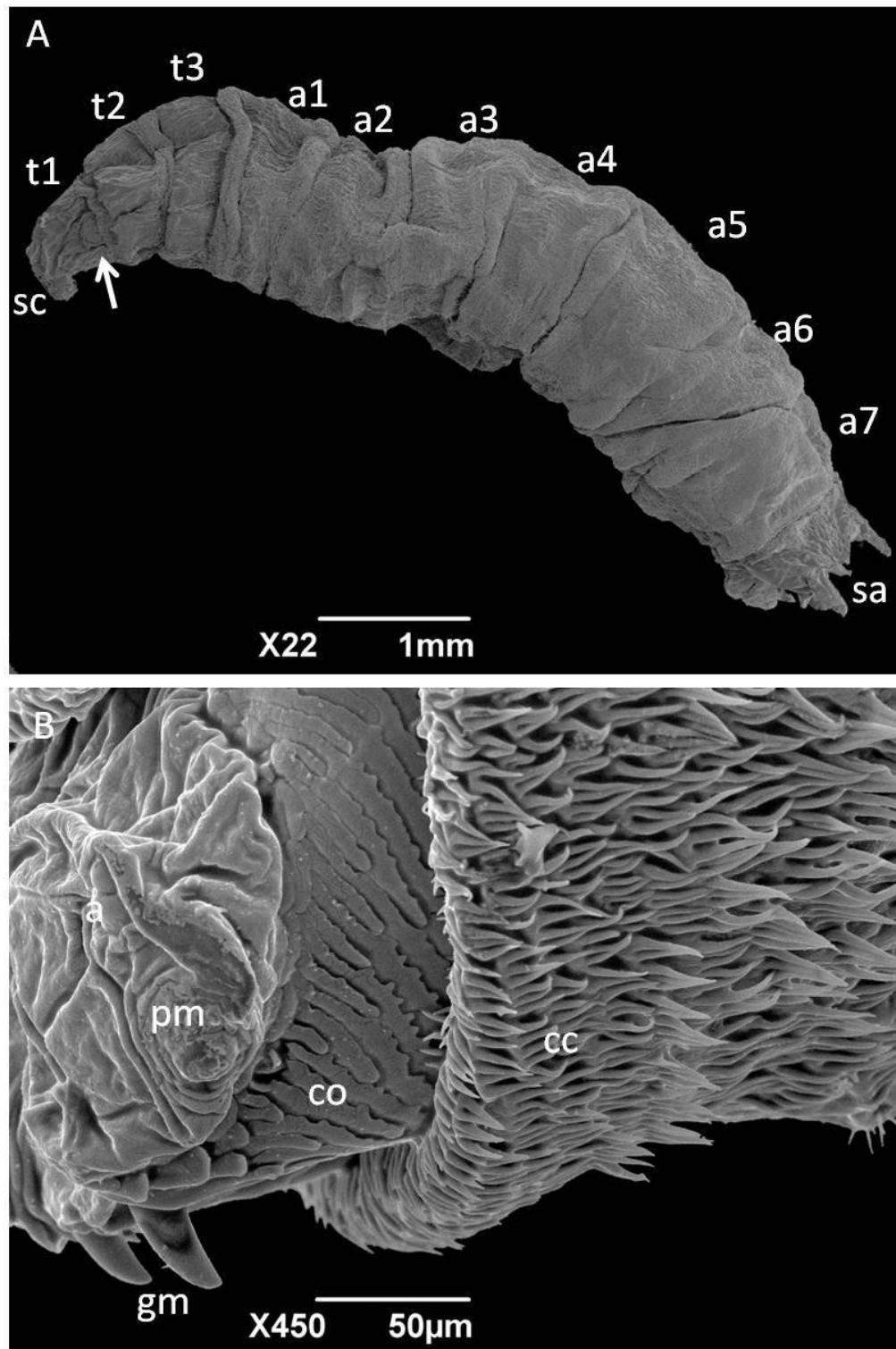


Figura 4.20 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans*. A – Larva de corpo inteiro com os 12 segmentos: segmento cefálico (sc), segmentos torácicos (t1-t3), segmentos abdominais (a1-a7) e segmento anal (sa). A seta indica o espiráculo anterior. B – Região anterior: antena (a); papilas maxilares (pm), ganchos maxilares (gm), crista oral (co) e espinhos do collar cefálico (cc).

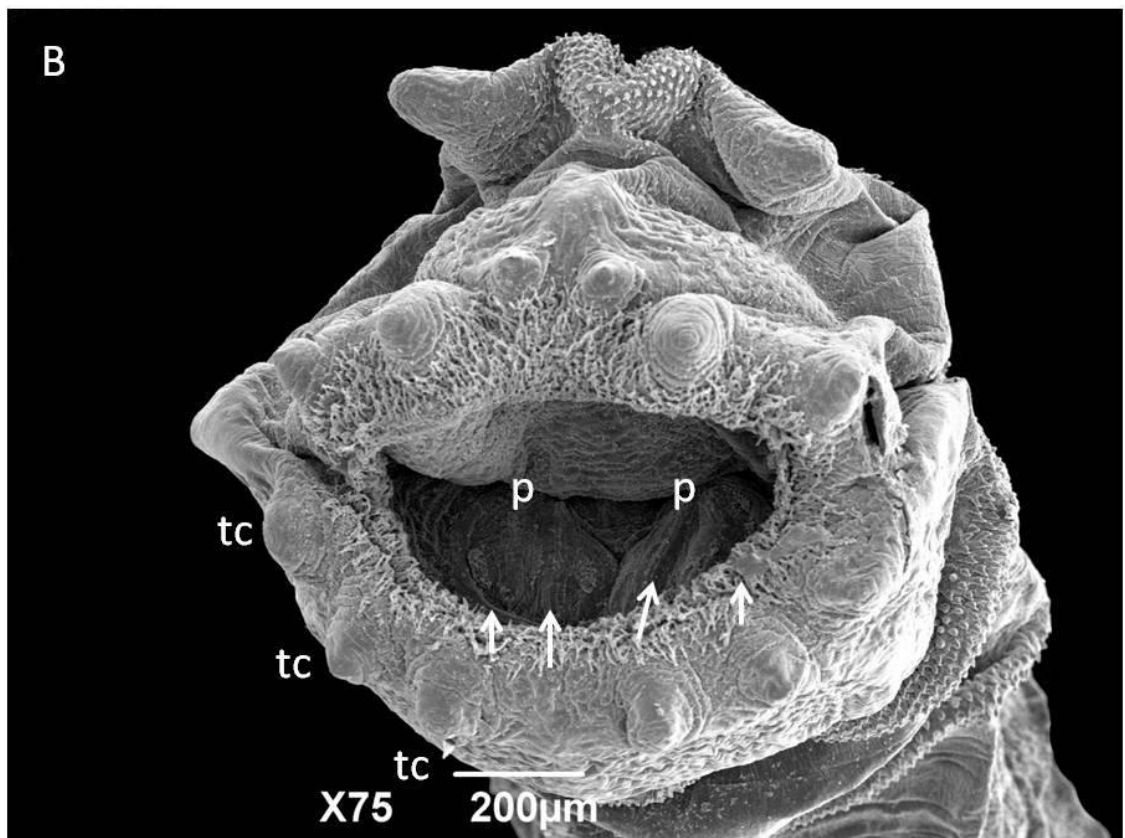
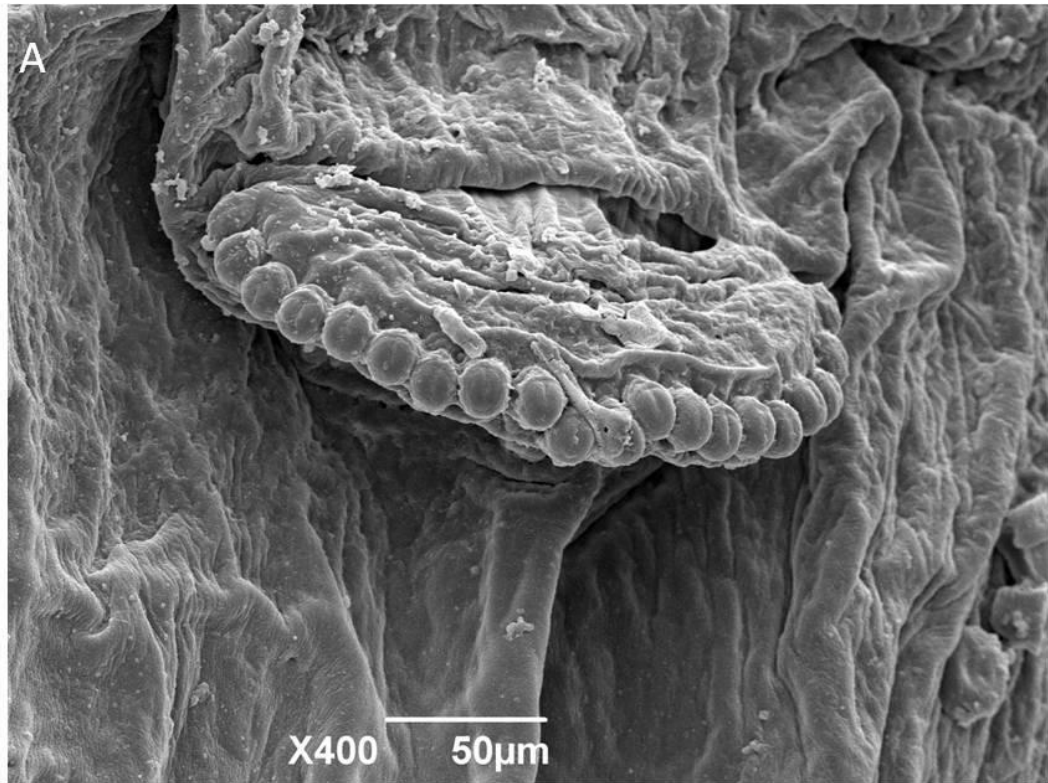


Figura 4.21 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A - Espiráculo anterior com fileiras regulares de papilas. B – Espiráculo posterior circundado com os tubérculos circunspiraculares (tc) e duas aberturas (setas) em casa peritreme (p).

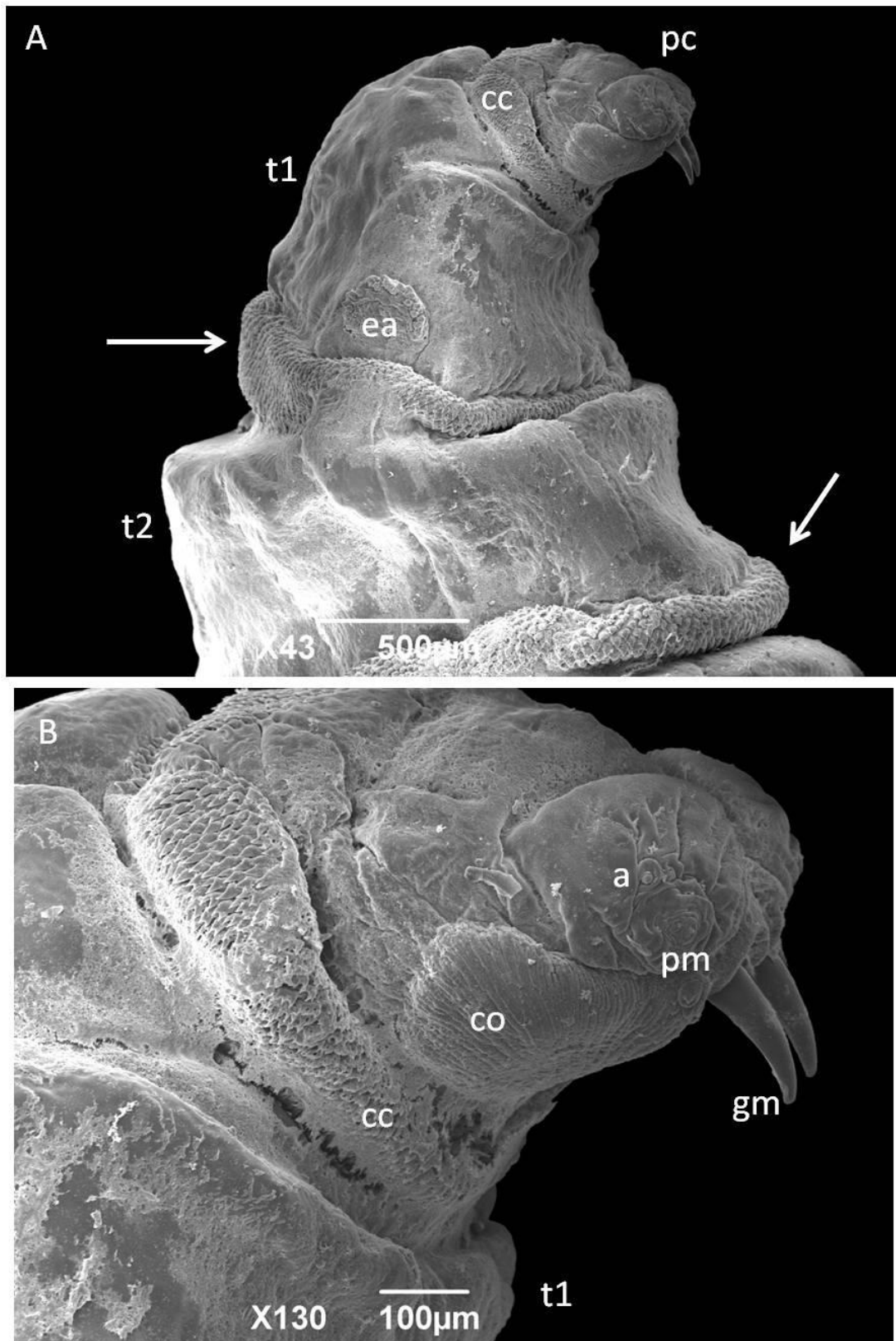


Figura 4.22 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans*. A – Região anterior: pseudocéfalo (pc); colar céfálico (cc); primeiro segmento torácico (t1); espiráculo anterior (ea); espinhos intersegmentares (setas); e segundo segmento torácico (t2). B – Detalhe do pseudocéfalo: antena (a); papilas maxilares (pm), ganchos maxilares (gm), crista oral (co); colar céfálico (cc) e primeiro segmento torácico (t1).

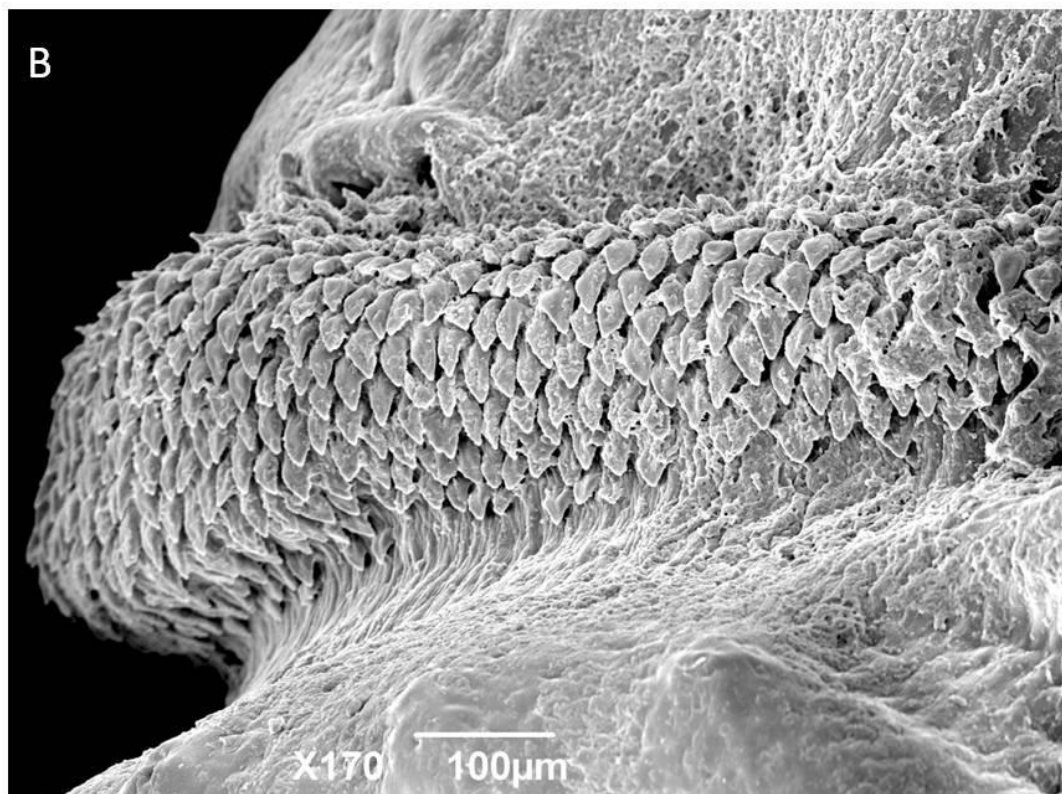
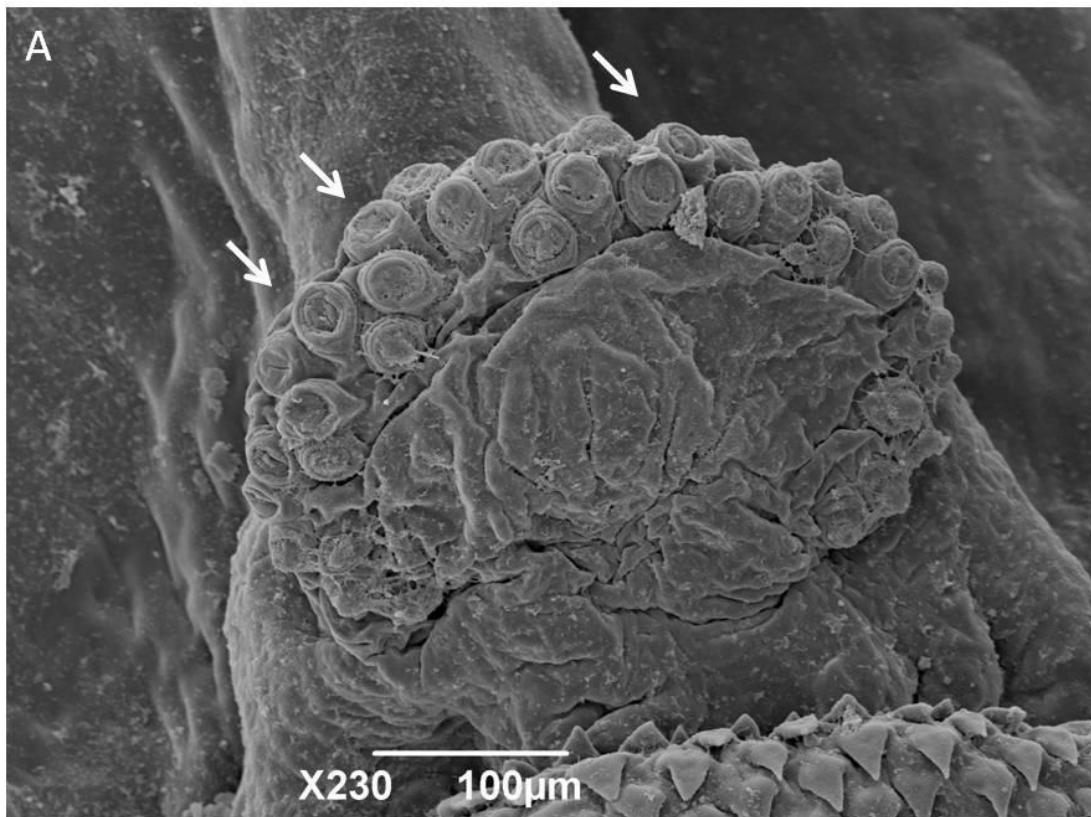


Figura 4.23 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – Espiráculo anterior com papilas dispostas em fileiras irregulares (setas). B – Detalhe dos espinhos intersegmentares.

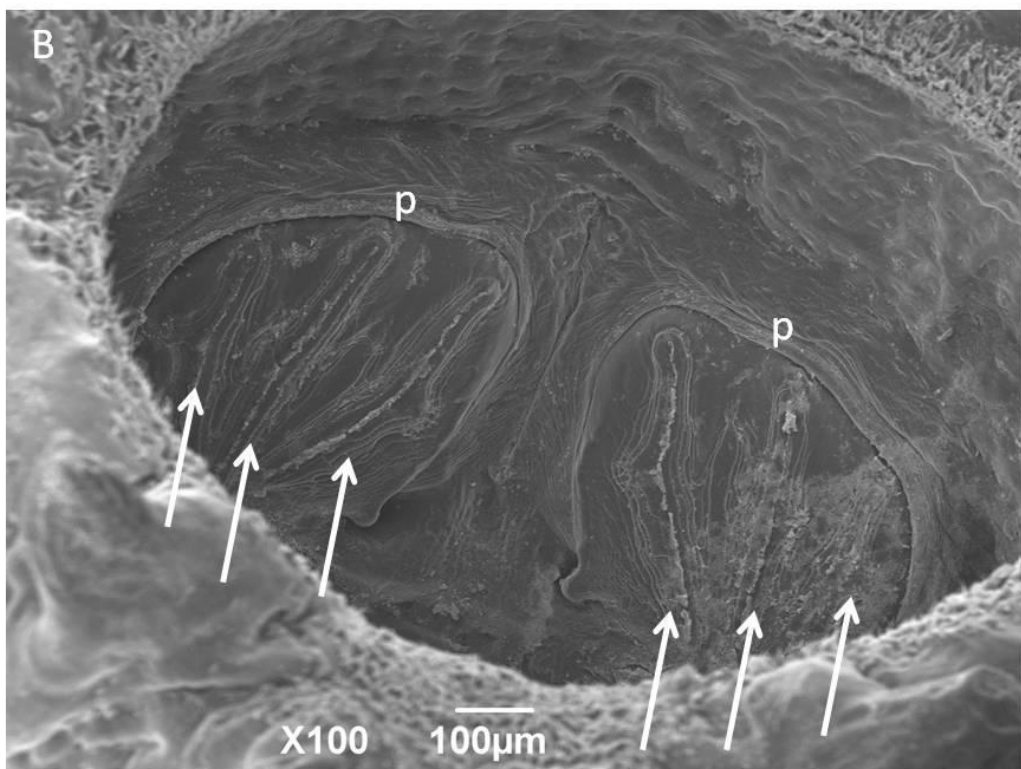
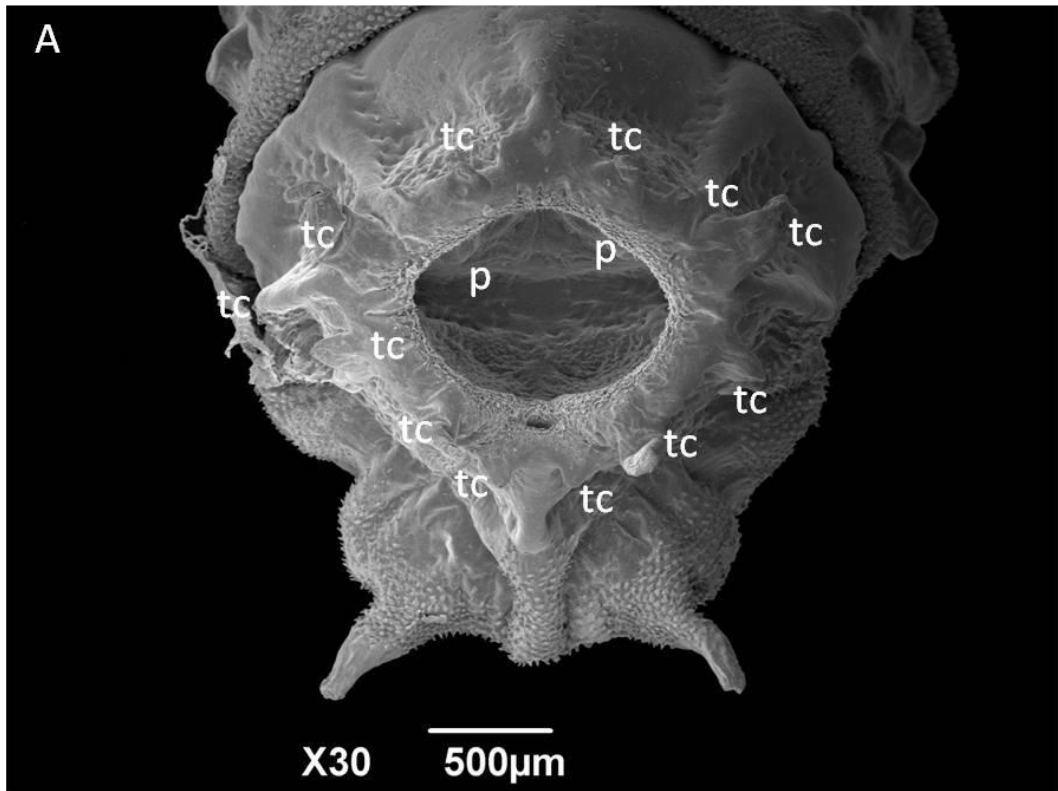


Figura 4.24 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans*. A – Região posterior com o par de peritremas (p) na placa espiracular internalizada e rodeada por tubérculos circunspiraculares (tc). B – Detalhe do par de peritremas (p) do espiráculo posterior, com três aberturas espiraculares cada um (setas).

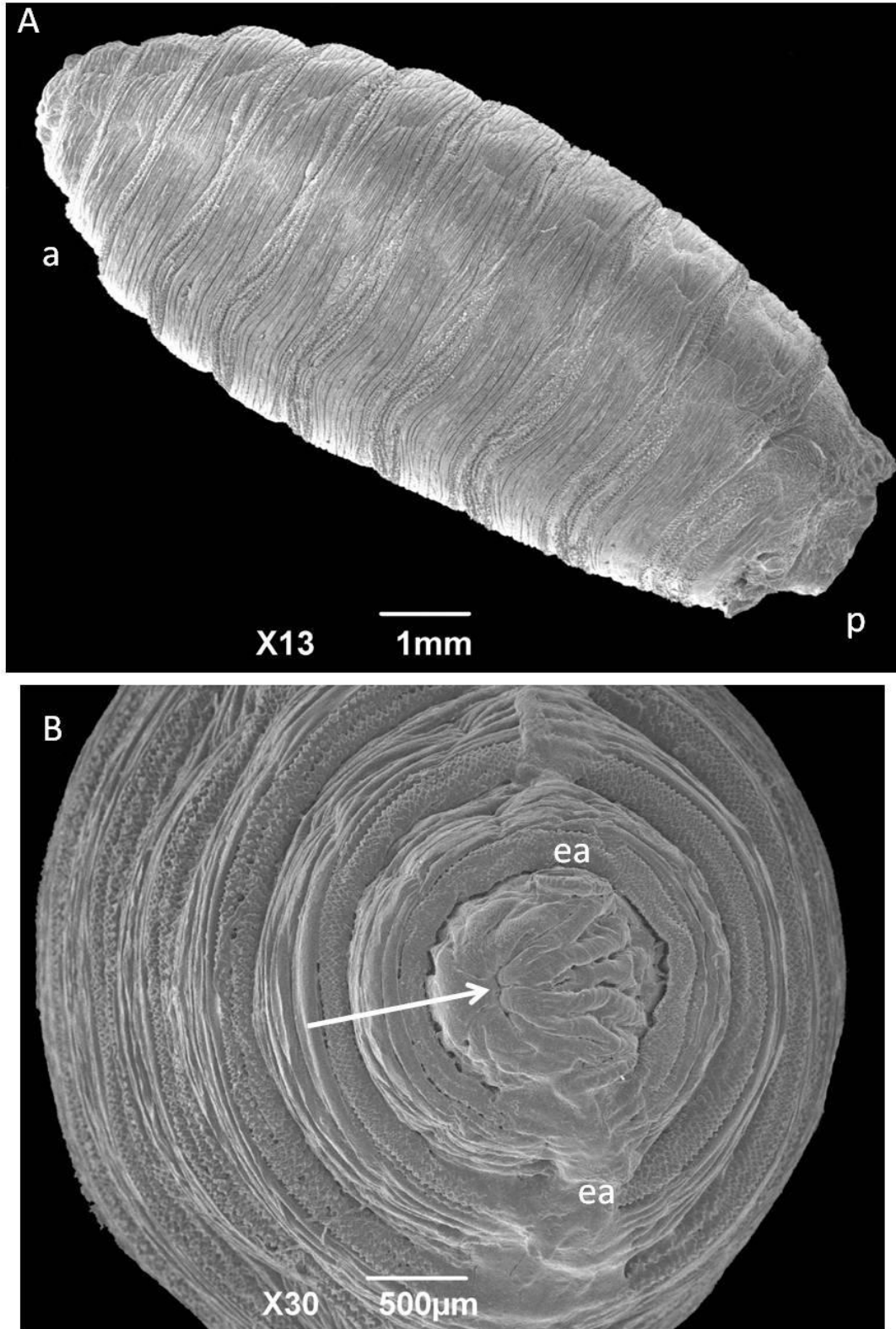


Figura 4.25 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – visão geral do pupário: região anterior (a) e região posterior (p). B – Vista frontal da região anterior, com o pseudocéfalo retraído (seta) e os espiráculos anteriores (ea).

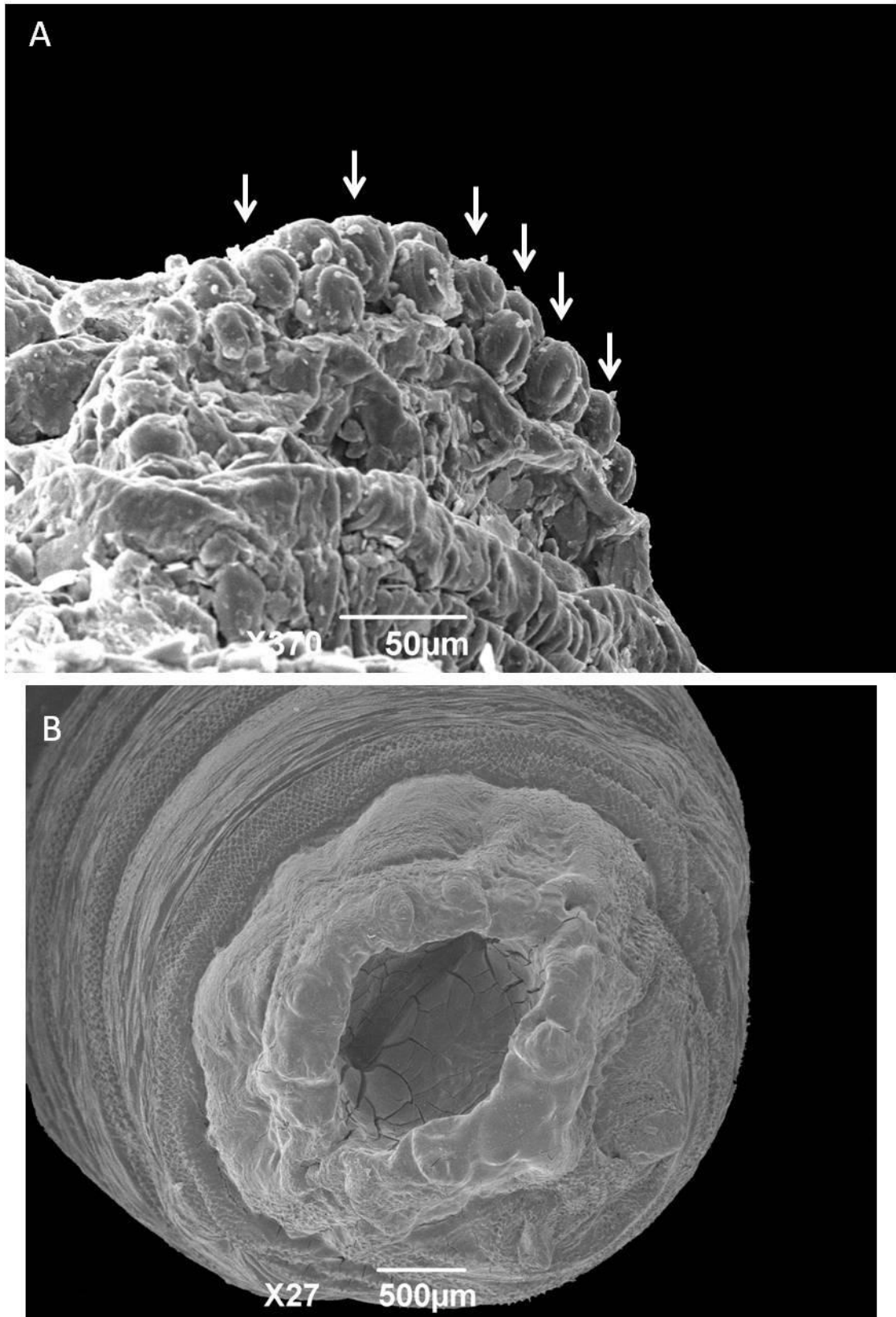


Figura 4.26 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário *Peckia (Pattonella) intermutans*. A – Espiráculo anterior com as papilas dispostas em fileiras irregulares (setas). B – Vista frontal da região posterior com o espiráculo posterior internalizado.

4.2.3. *Peckia (Euboettcheria) anguilla*

4.2.3.1. Larva de primeiro instar – L1

A larva vermiforme apresenta, ao longo de seus 12 segmentos, a região anterior mais estreita do que a região posterior (Fig. 4.27A). Os lóbulos no qual o pseudocéfalo está dividido apresentam um par de antenas e de palpos maxilares (Fig. 4.27B). A região cefálica ainda é pouco desenvolvida e suas estruturas não são claramente visíveis. Ganchos maxilares foram observados em todos os exemplares, assim como um estreito colar cefálico, com espinhos filiformes de pontas simples. Essa característica de espinhos também está presente nos espinhos intersegmentares. Os espinhos intersegmentares dos segmentos torácicos apontam para a região posterior, enquanto que os espinhos intersegmentares dos segmentos abdominais apontam para a região anterior e para a região posterior (Fig.4.28). O espiráculo posterior, localizado na extremidade posterior, encontra-se internalizado e em cada peritrema incompleto foram observadas duas aberturas espiraculares. Os tubérculos circunspiraculares ainda não estão totalmente desenvolvidos e facilmente visíveis nas larvas de primeiro instar (Fig. 4.29).

4.2.3.2. Larva de segundo instar – L2

A larva L2 de *P. (E.) anguilla* é similar à L1, porém maior e mais pesada. O pseudocéfalo está bem desenvolvido e os órgãos sensoriais são facilmente observados. As antenas possuem um formato de cúpula e os ganchos maxilares estão bem desenvolvidos (Fig. 4.30). Os espinhos do colar cefálico apresentam pontas simples ou duplas e estão mais densos e grossos do que no instar anterior, adquirindo um padrão dentiforme (Fig. 4.31A). No primeiro segmento torácico, pode ser observado o espiráculo anterior. Este apresenta um número de papilas que varia de 14-17 e estão dispostas no espiráculo em uma única fileira (Fig. 4.31B). Os espinhos intersegmentares são de ponta simples. Os espinhos dos segmentos torácicos são orientados para a região posterior, enquanto que os espinhos dos

segmentos abdominais são orientados para a região anterior e para a região posterior. À medida que se aproxima da extremidade posterior, o tegumento da larva se torna mais espinhoso, com espinhos espalhados ao longo do segmento anal. O espiráculo posterior se encontra internalizado na cavidade anal e seus dois peritremas apresentam duas aberturas espiraculares cada (Fig. 4.32A). Os tubérculos circunspiraculares estão mais desenvolvidos e são facilmente visualizados no segundo instar. Eles estão dispostos ao redor da cavidade anal formando quatro trios de tubérculos, num total de 12 tubérculos curtos (Fig. 4.32B).

4.2.3.3. Larva de terceiro instar – L3

As larvas L3 apresentam corpo robusto e estruturas completamente desenvolvidas, além de maior quantidade de espinhos. Na região cefálica, é possível visualizar as antenas, as cristas orais e os palpos maxilares, todos bem desenvolvidos (Fig. 4.33). Os espinhos dentiformes do colar cefálico são em sua maioria de ponta simples e densamente dispostos ao redor do pseudocéfalo (Fig. 4.34A). O espiráculo anterior encontra-se bem desenvolvido, com as papilas bem ornamentadas e dispostas em uma única fileira regular (Fig. 4.34B). Os espinhos dos segmentos torácicos são grossos e achatados, com pontas simples ou duplas, enquanto que os espinhos dos segmentos abdominais possuem pontas simples e não estão densamente dispostos, como os torácicos. A orientação dos espinhos, tanto do segmento torácico como do segmento abdominal, segue o mesmo padrão visto nos instares anteriores (Fig. 4.35). O segmento anal possui uma maior quantidade de espinhos, todos bem desenvolvidos. A placa espiracular está internalizada e cada peritrema incompleto apresenta três aberturas espiraculares estreitas e orientadas verticalmente. Os tubérculos circunspiraculares estão dispostos ao redor do espiráculo posterior, são mais desenvolvidos do que no segundo instar e apresentam um tamanho de médio a pequeno (Fig. 4.36).

4.2.3.4. Pupário

O pupário apresenta uma morfologia similar à larva de terceiro instar. O segmento cefálico e o primeiro segmento torácico estão retraídos, com os espiráculos anteriores no topo da extremidade anterior (Fig. 4.37). Os espinhos dos segmentos torácicos e abdominais seguem o mesmo padrão observado nas larvas L3, sendo os espinhos dos segmentos torácicos mais achatados e densamente dispostos (Fig. 4.38). O espiráculo posterior está internalizado na região posterior e o pupário mantém as três aberturas espiraculares, como observadas em larvas de terceiro instar (Fig. 4.39).

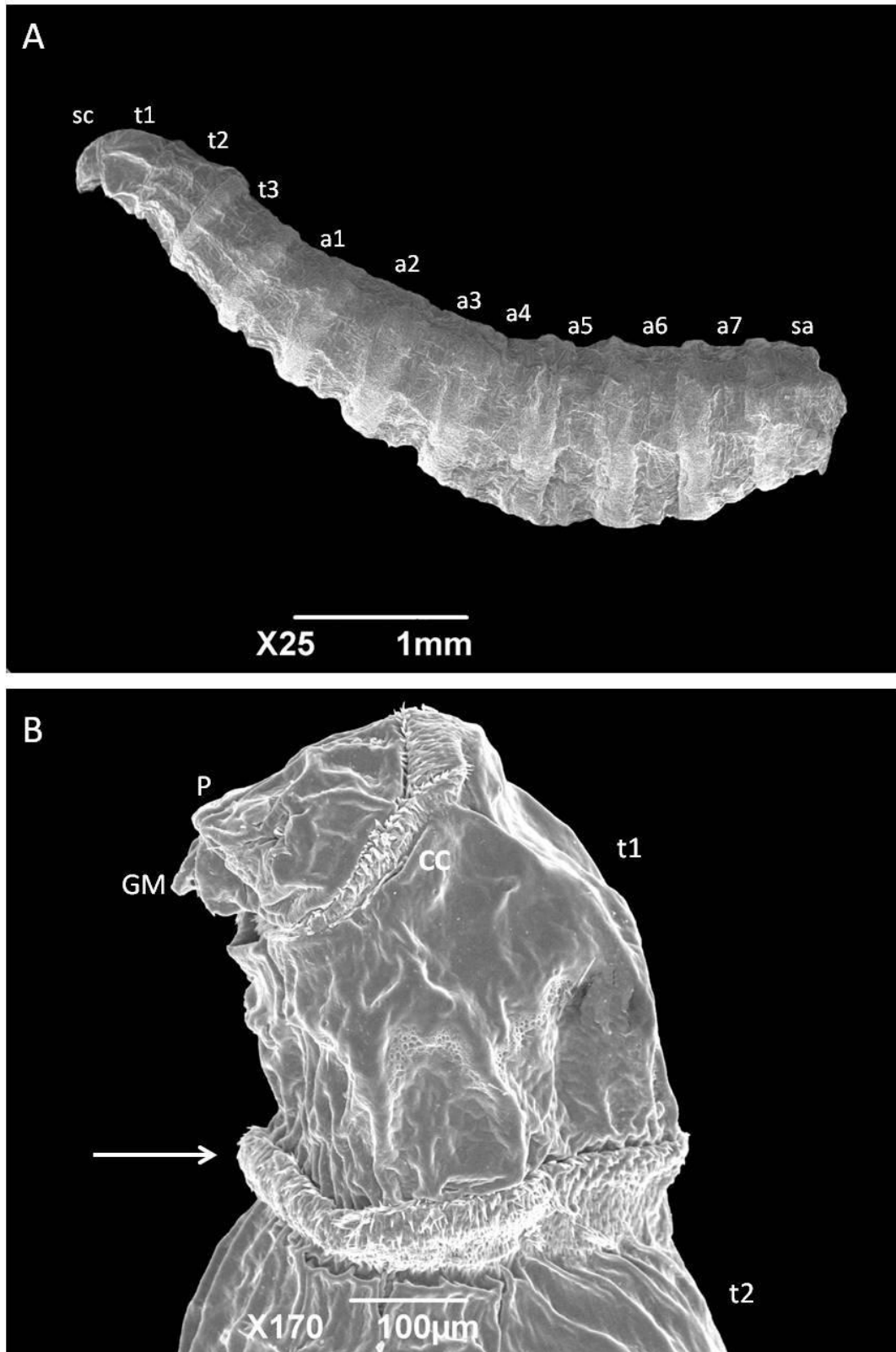


Figura 4.27 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*. A – Larva de corpo inteiro: segmento cefálico (sc); segmentos torácicos (t1-t3); segmentos abdominais (a1-a7) e segmento anal (sa). B – Região anterior com ganchos maxilares (gm), palpo (p), colar cefálico (cc) e primeiro (t1) e segundo (t2) segmentos torácicos divididos por espinhos intersegmentares (seta).

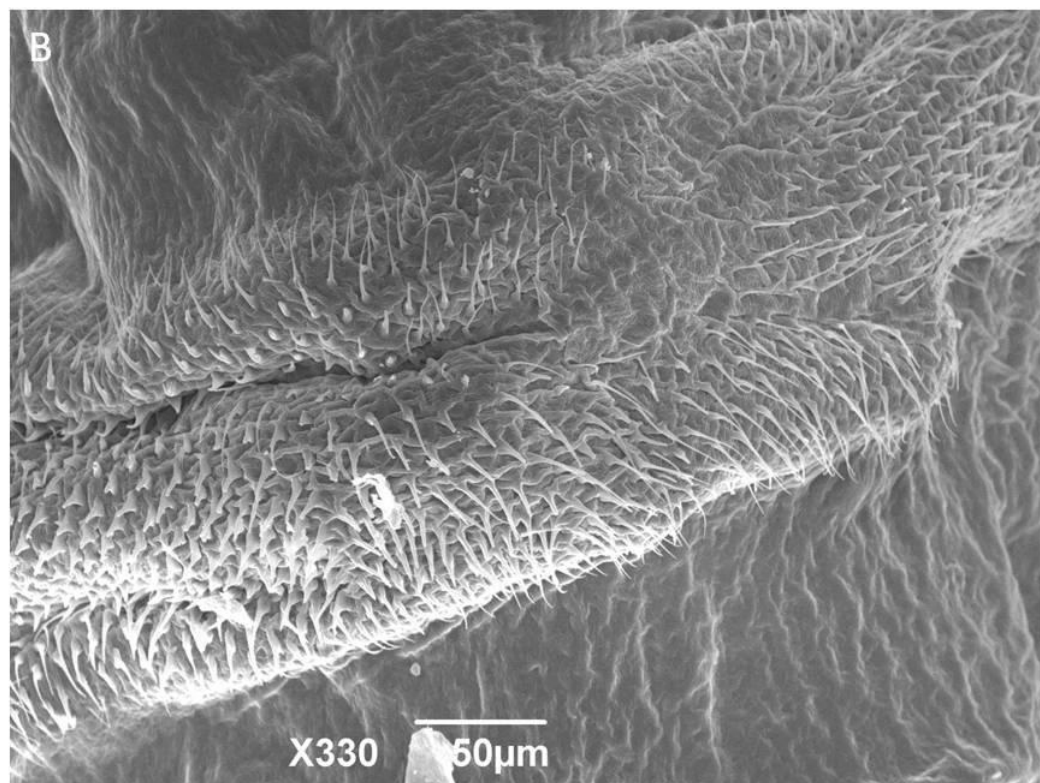
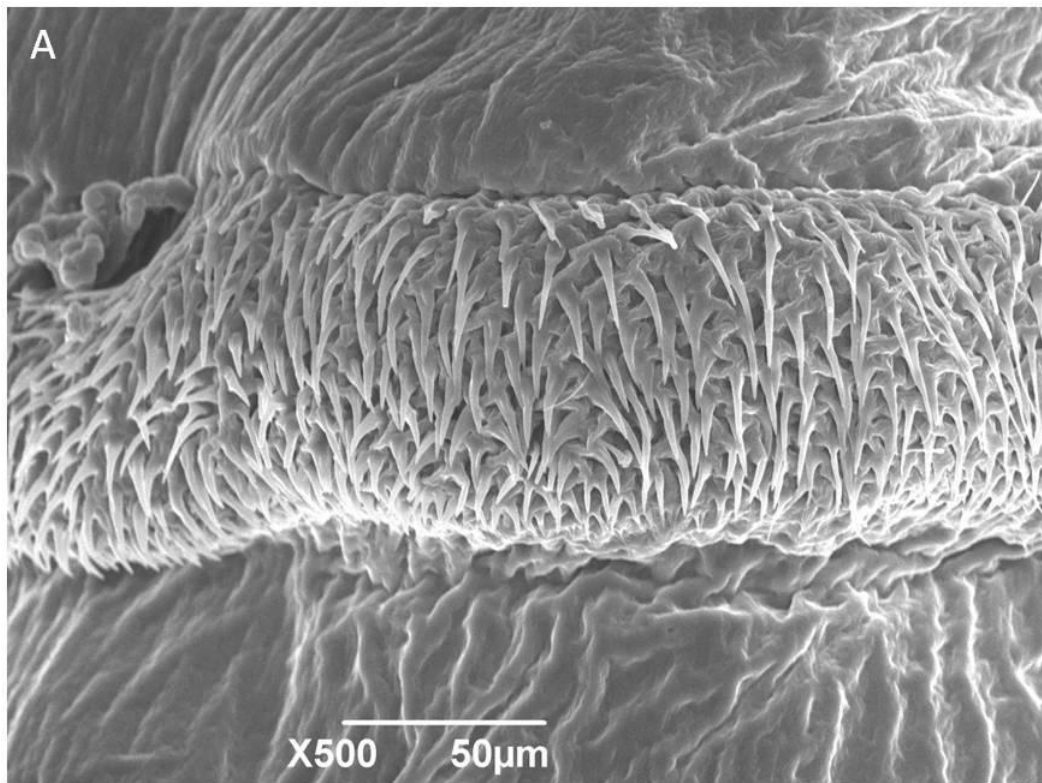


Figura 4.28 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Espinhos intersegmentares torácicos orientados para a região posterior. B – Espinhos intersegmentares abdominais orientados para a região anterior e para a região posterior.

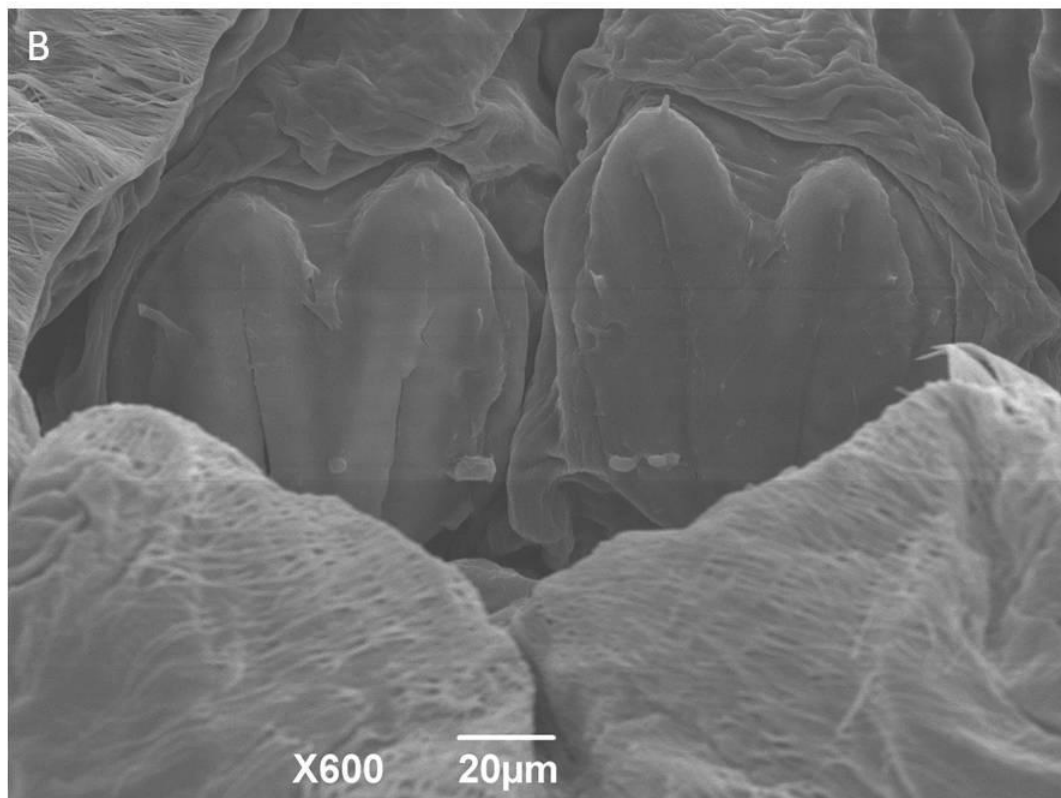
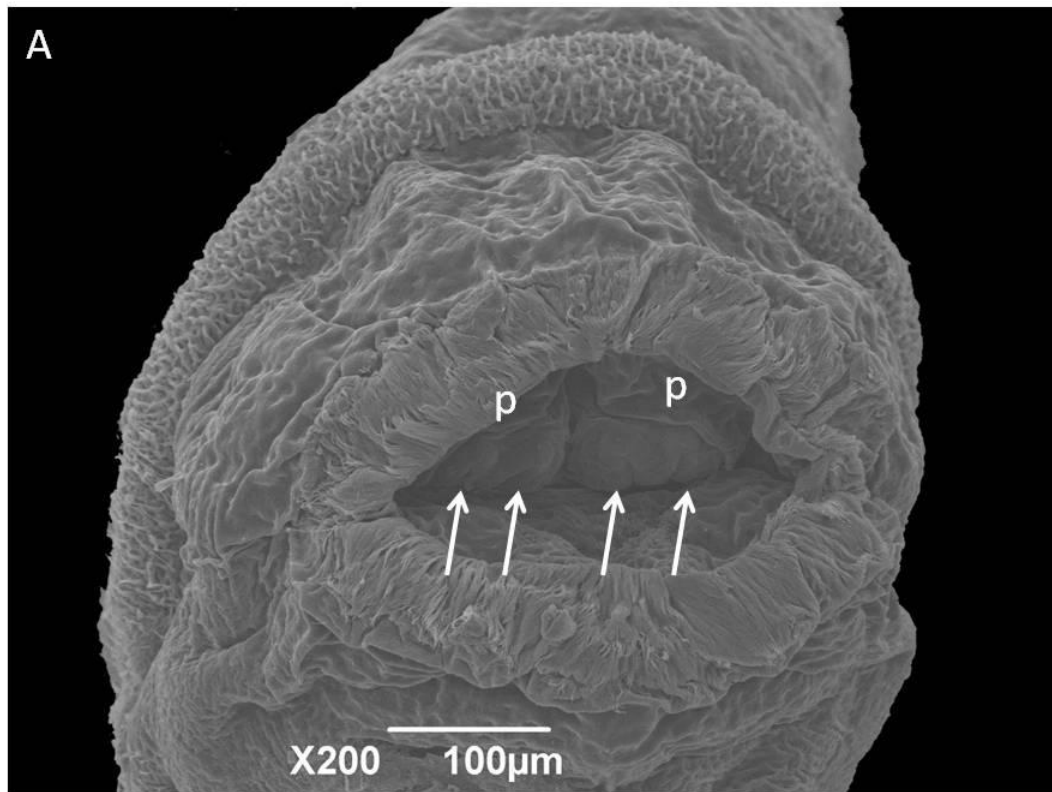


Figura 4.29 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Vista frontal da região posterior com o espiráculo internalizado e o par de peritremas (p) com duas aberturas em cada um (setas). B – Detalhe dos peritremas com as duas aberturas espiraculares.

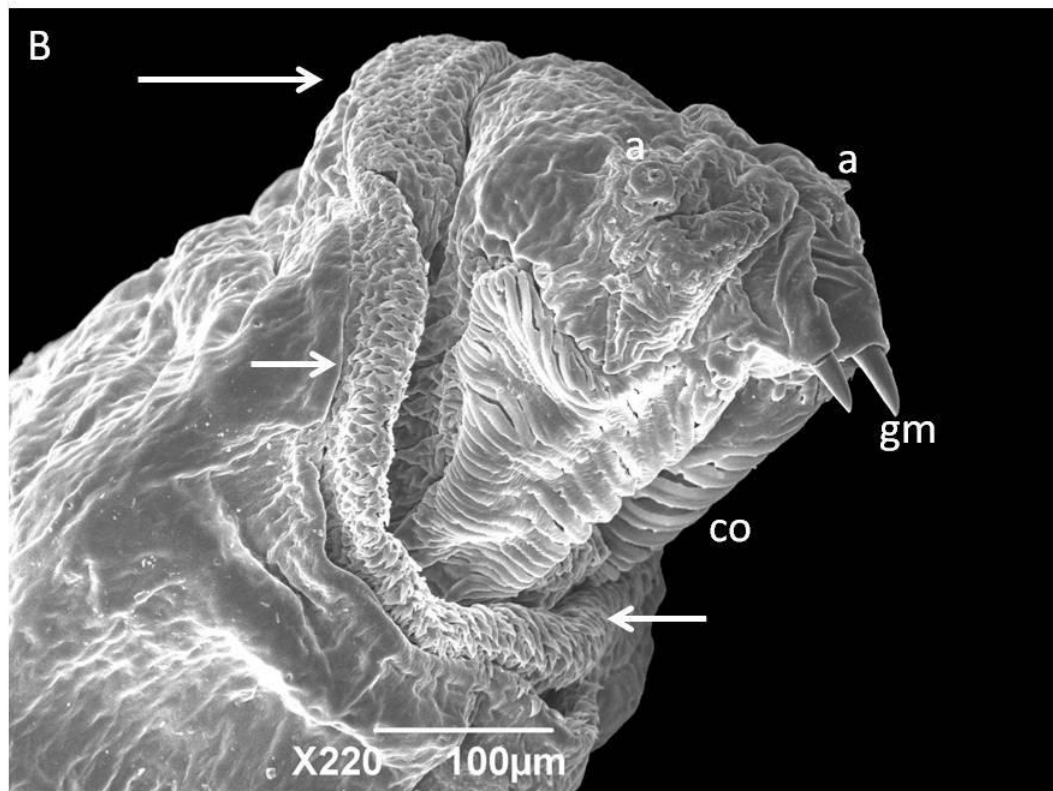
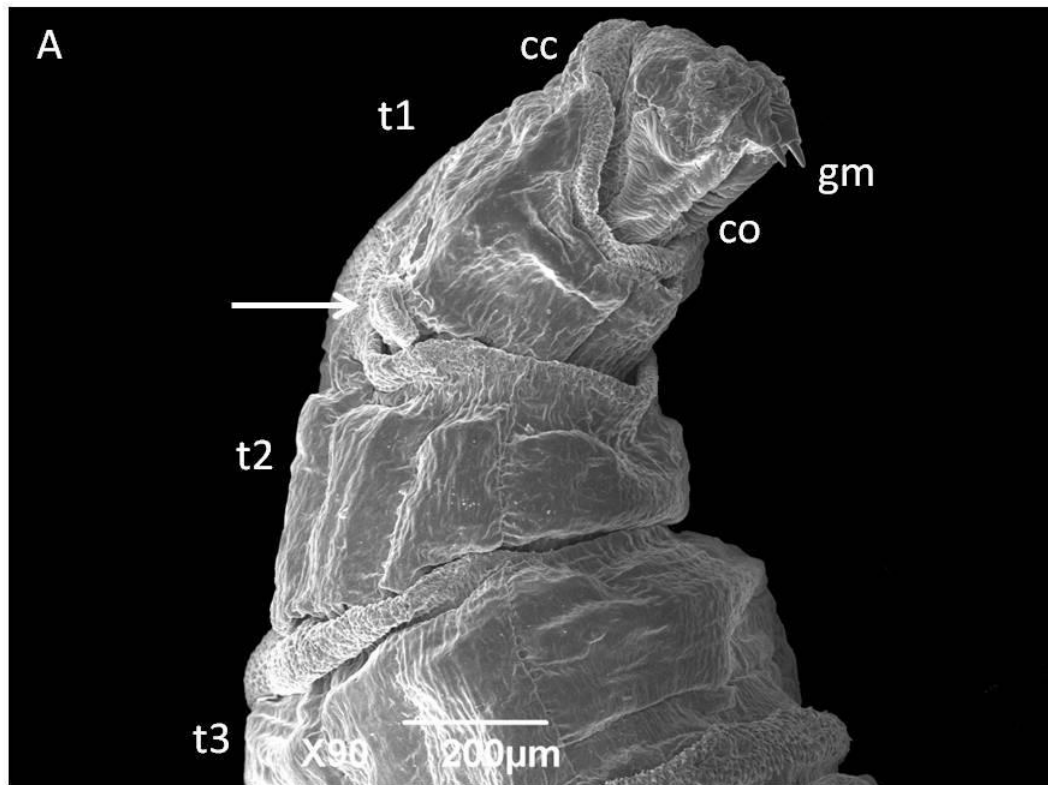


Figura 4.30 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*. A – Região anterior: pseudocéfalo com ganchos maxilares (gm), crista oral (co) e colar cefálico (cc). A seta indica o espiráculo anterior no primeiro segmento torácico (t1). B – Detalhe do pseudocéfalo com o par de antenas (a), ganchos (gm), cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (setas).

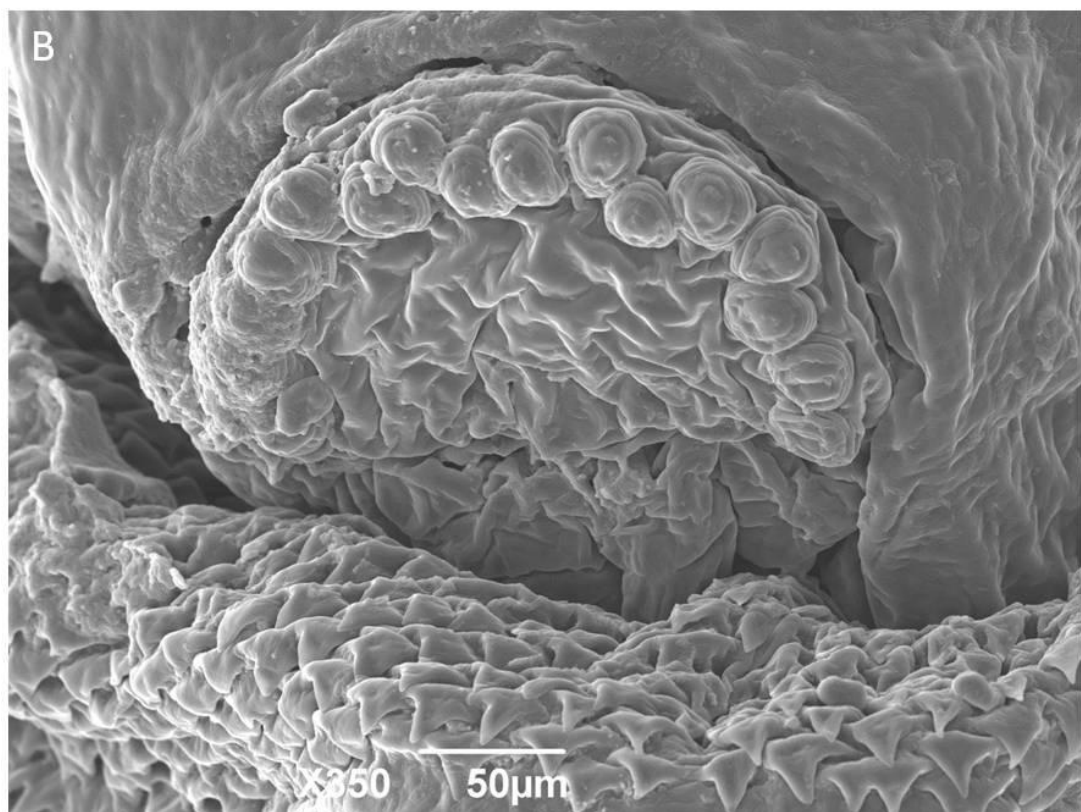
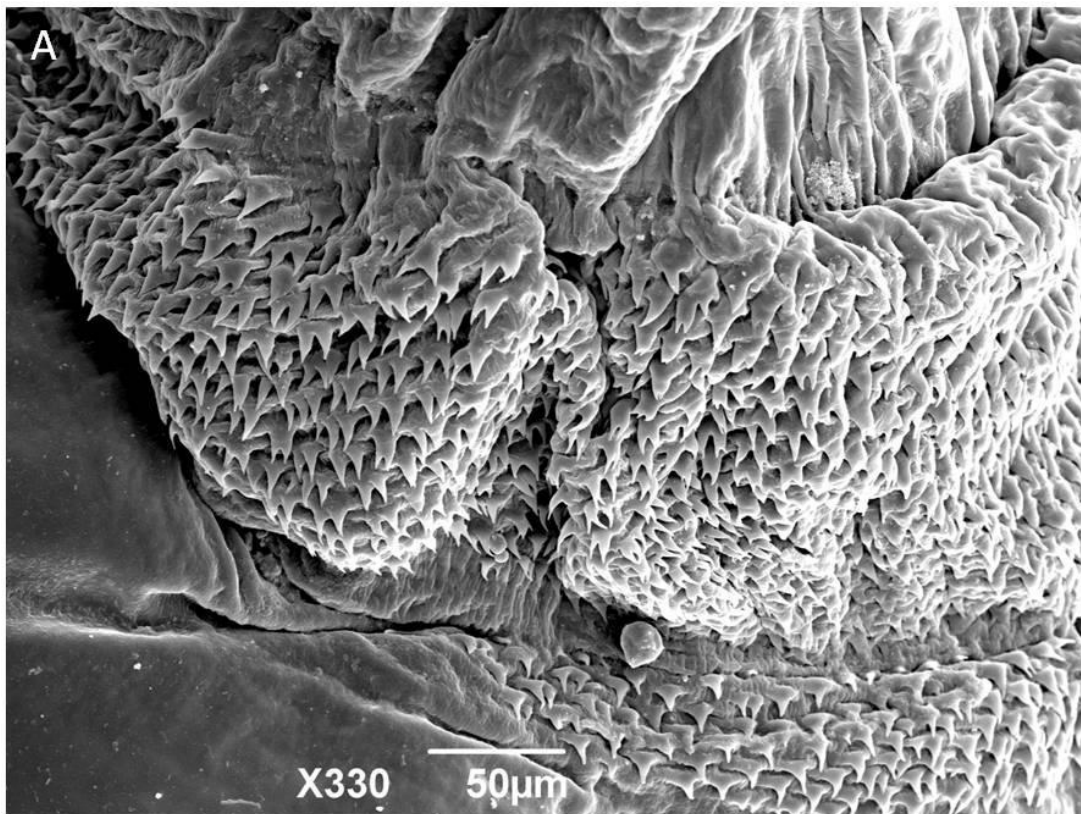


Figura 4.31 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*. A – Espinhos do colar cefálico com pontas simples ou duplas. B – espiráculo anterior com 17 papilas espiraculares.

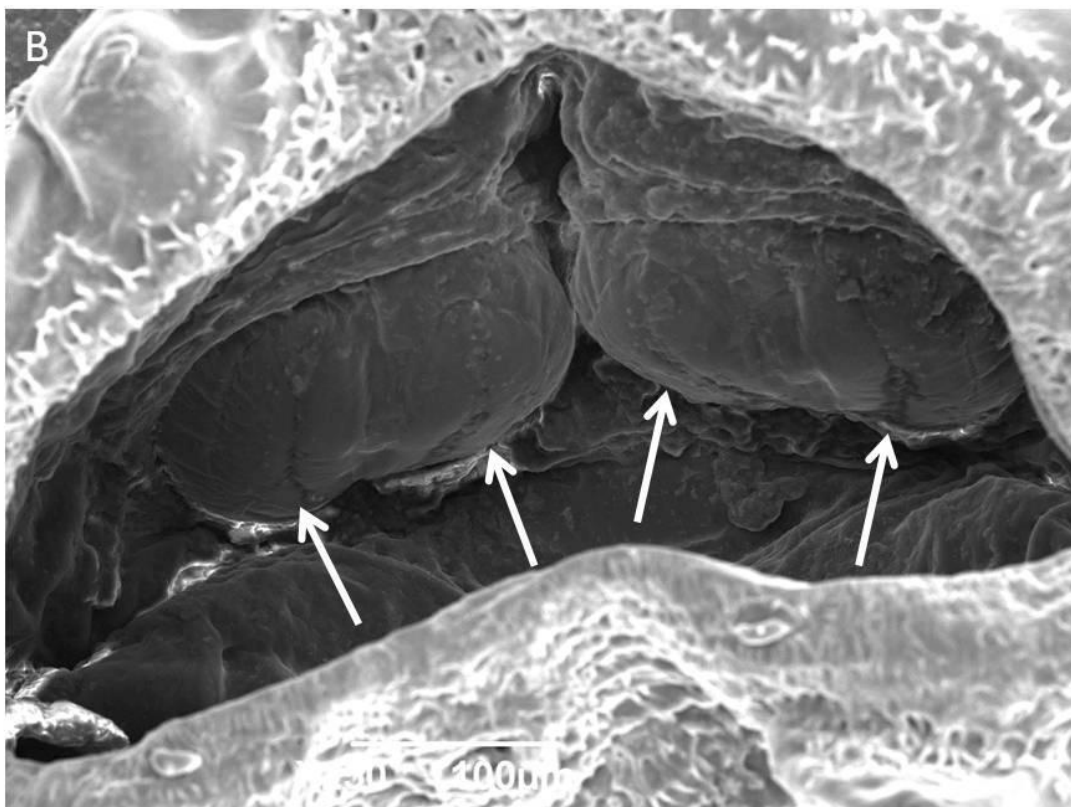
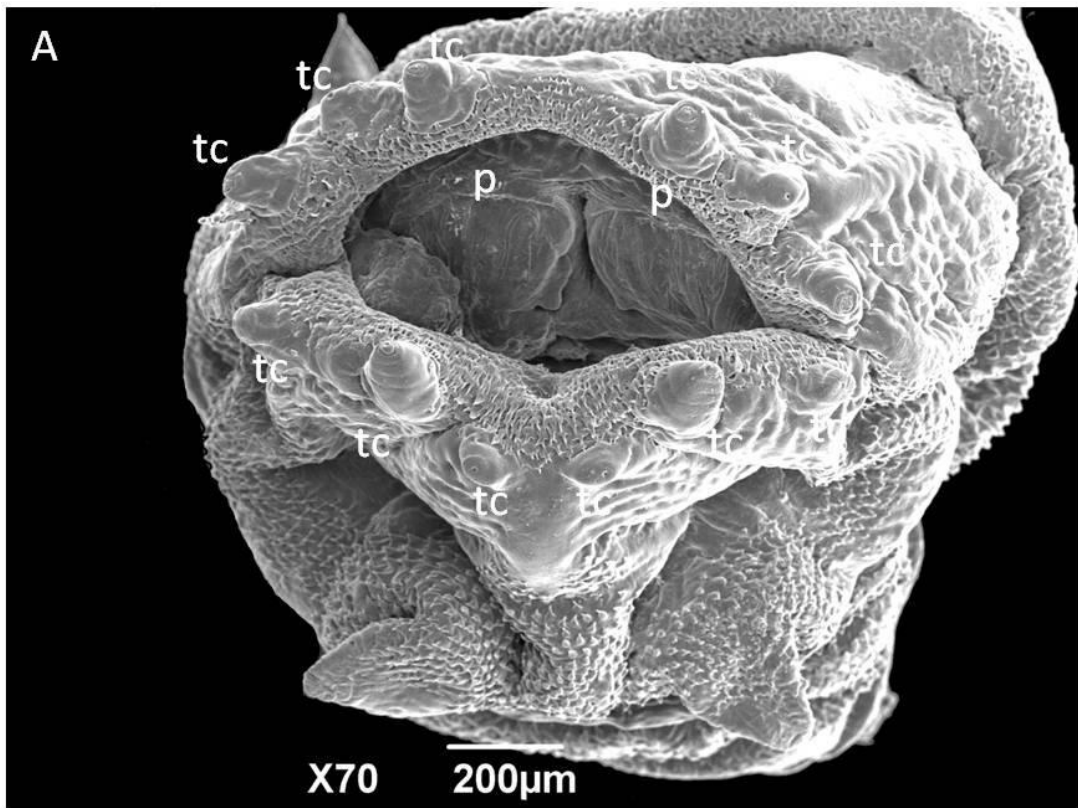


Figura 4.32 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*. A – Região posterior com o par de peritremas (p) que compõem o espiráculo posterior rodeados pelos tubérculos circunspiraculares (tc). B – Detalhe dos peritremas com duas aberturas espiraculares em cada um (setas).

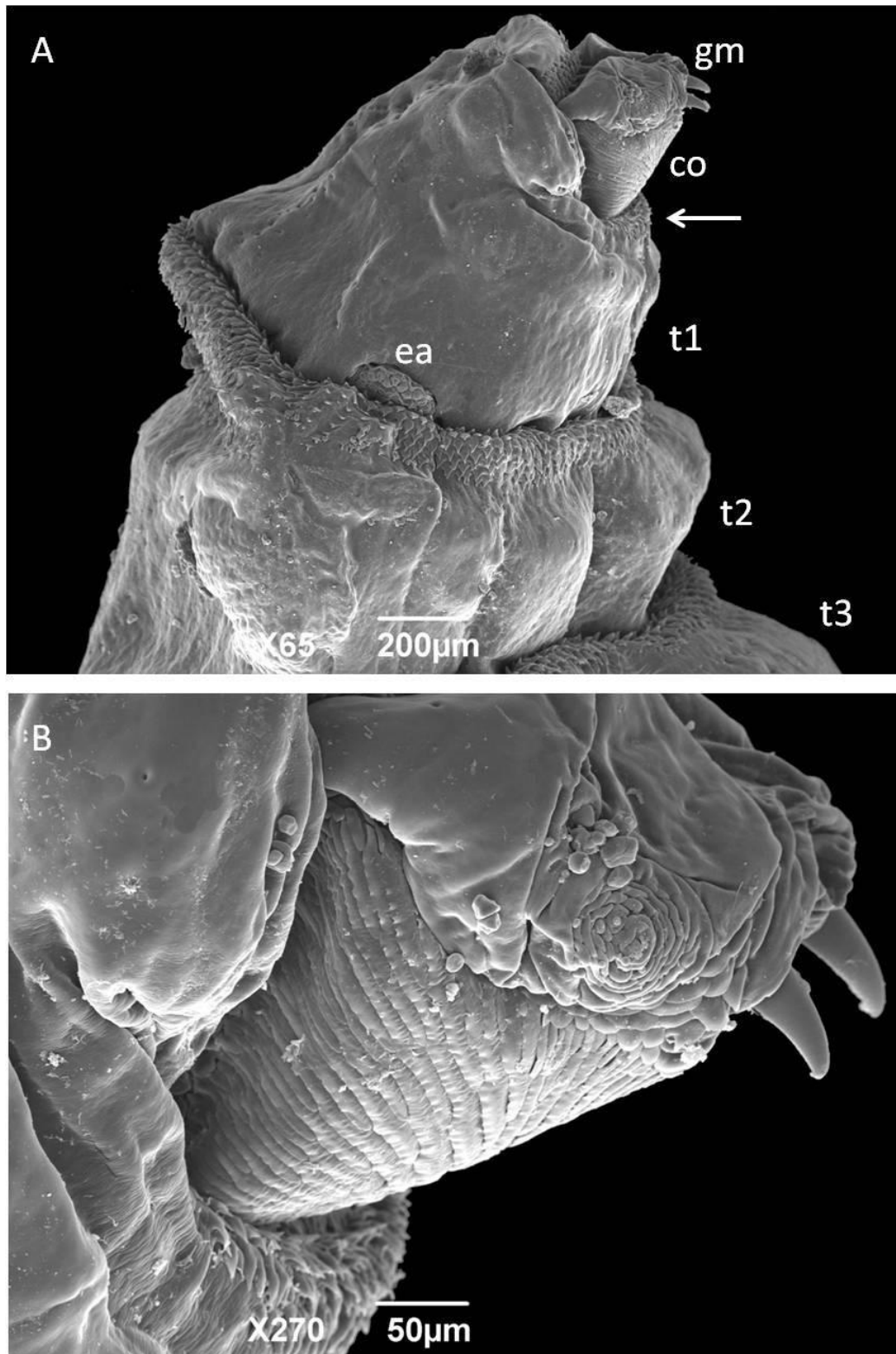


Figura 4.33 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Região anterior com ganchos (gm), cristas orais (co), colar cefálico (seta), espiráculo anterior (ea) e os três segmentos torácico (t1-t3). B – Pseudocéfalo.

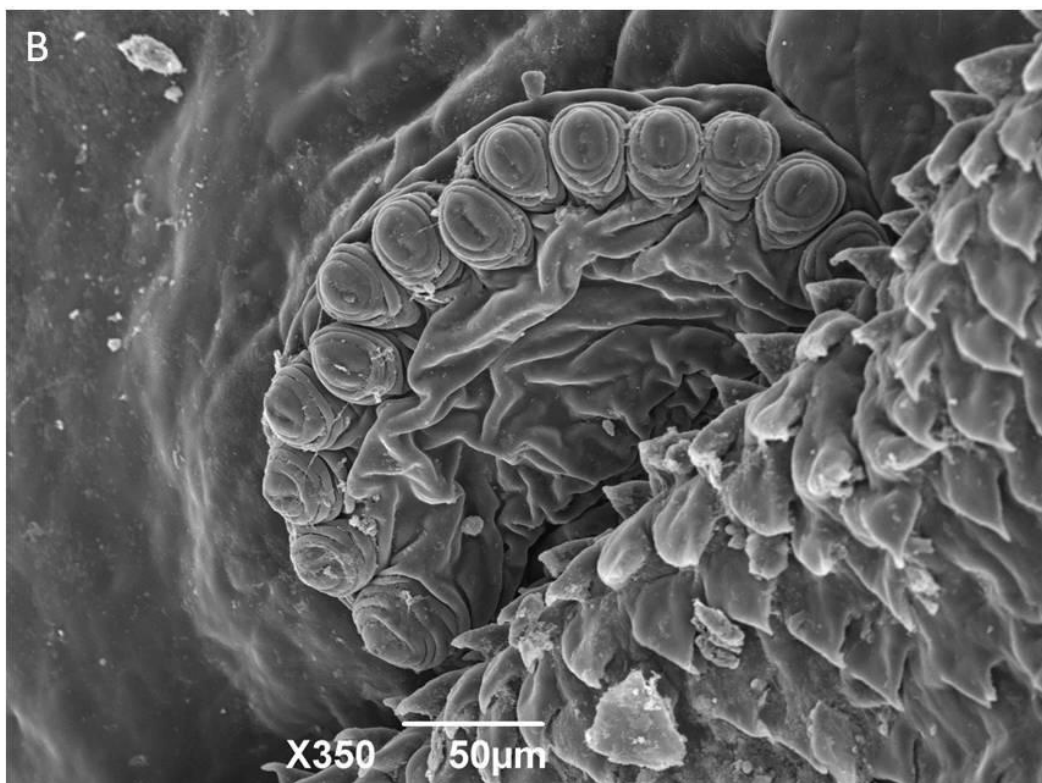
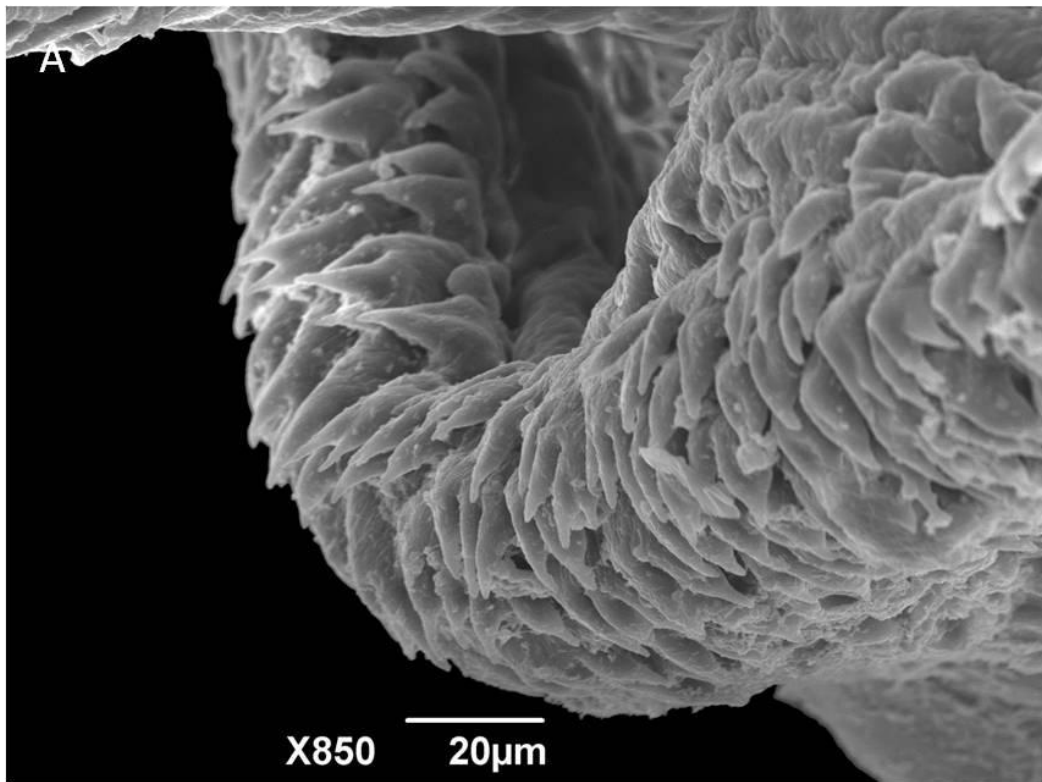


Figura 4.34 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*. A – Espinhos do colar cefálico. B – Espiráculo anterior com 14 papilas espiraculares.

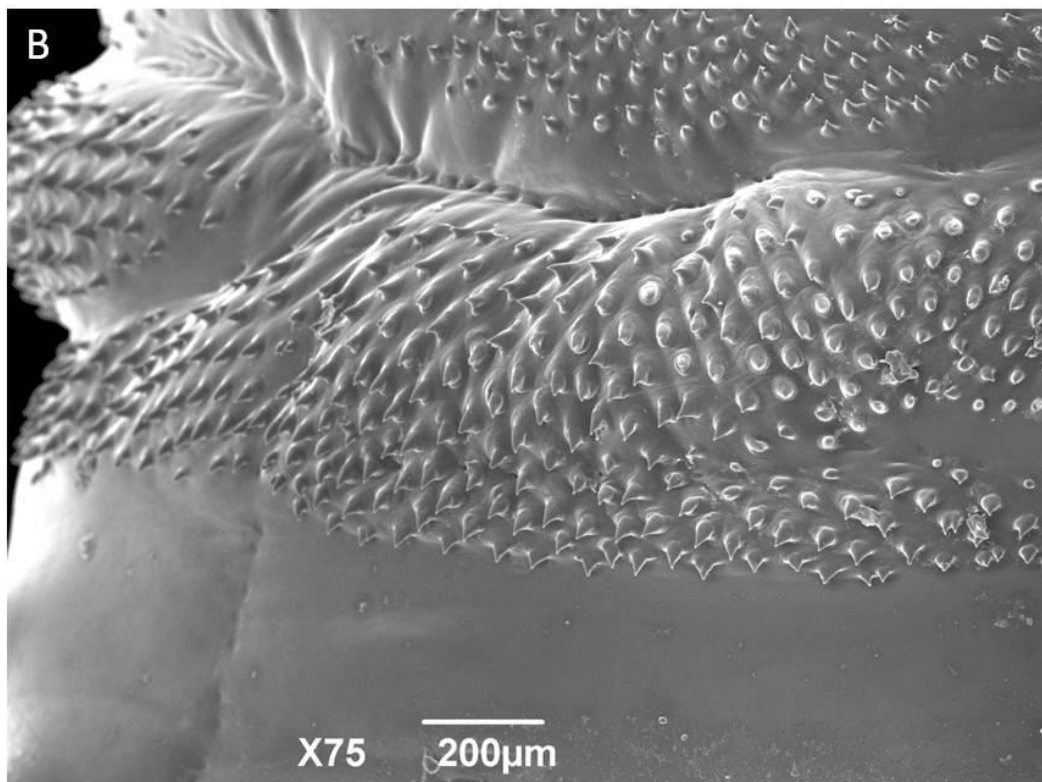
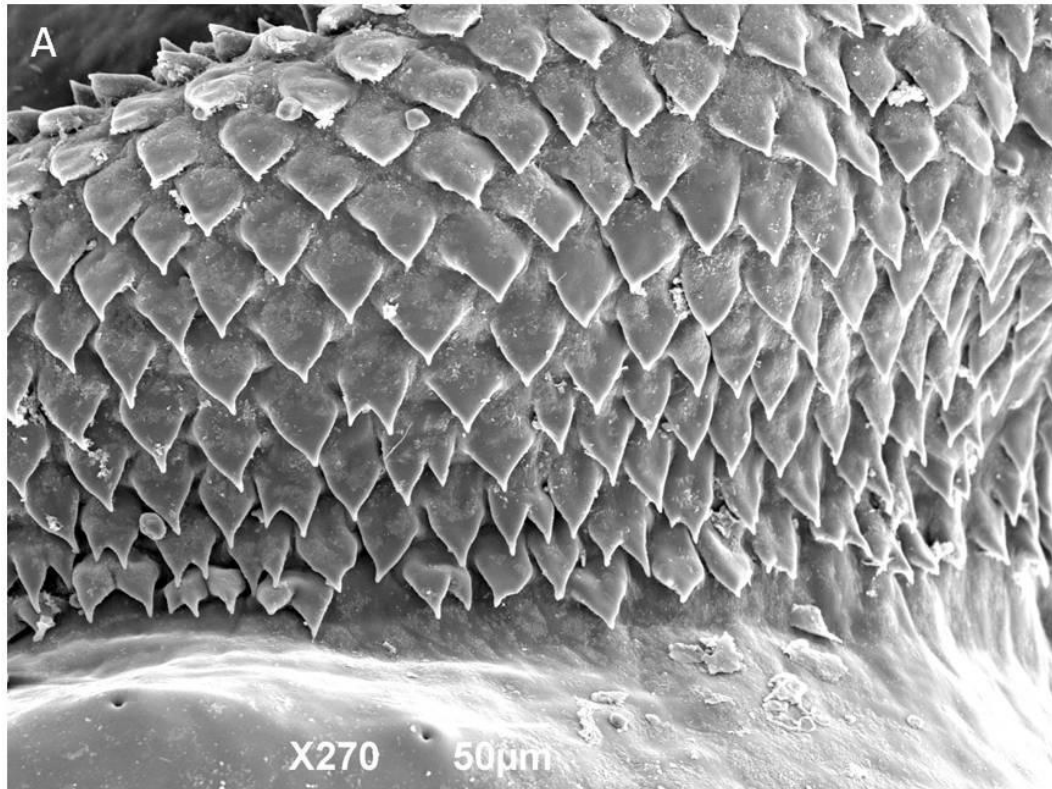


Figura 4.35 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Espinhos intersegmentares torácicos orientados para a região posterior. B – Espinhos intersegmentares abdominais orientados para ambas as regiões.

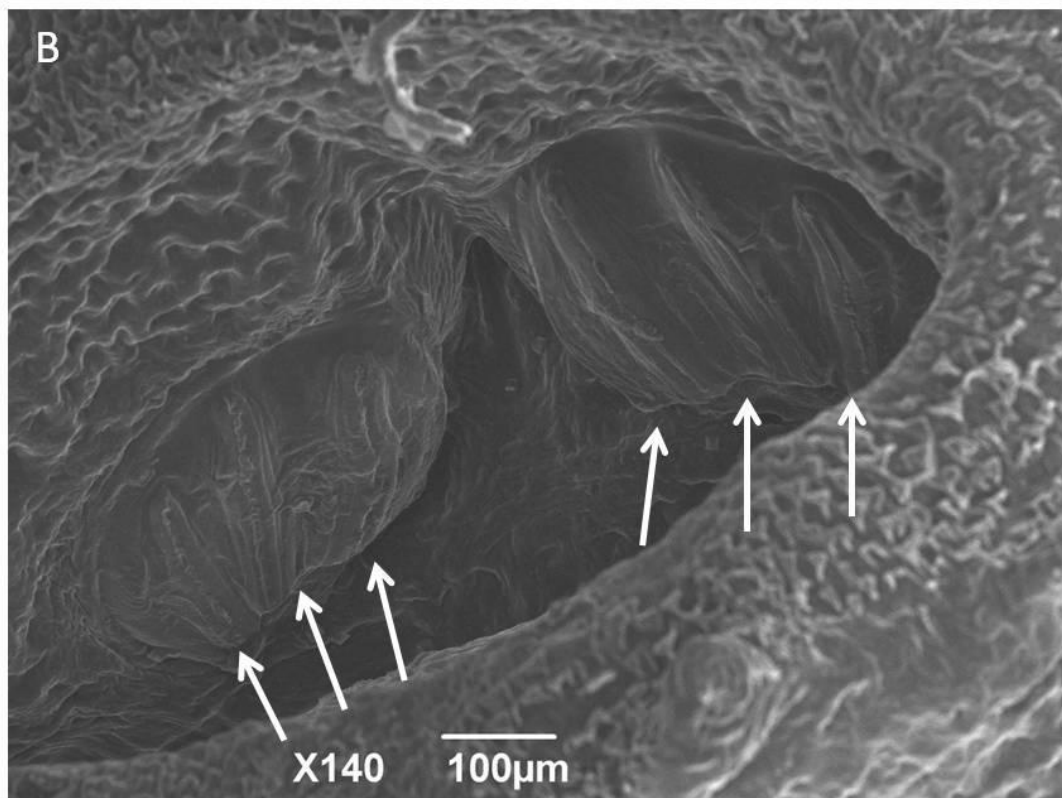
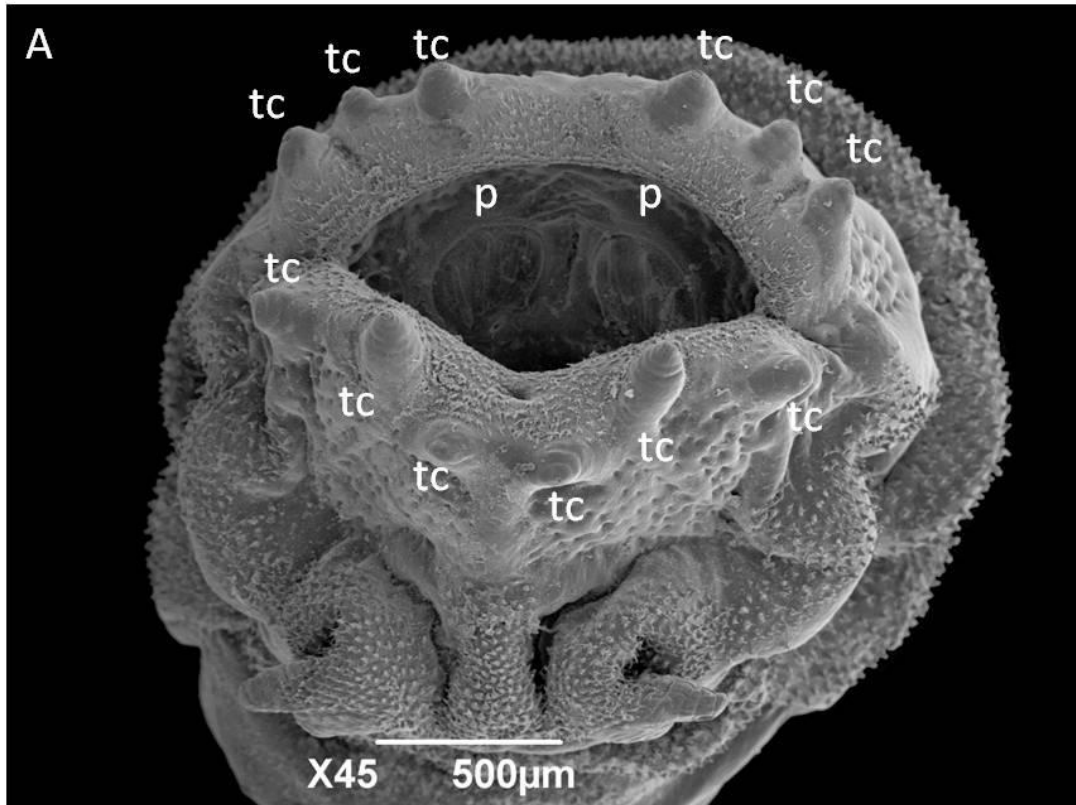


Figura 4.36 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*. A – Vista frontal do espiráculo posterior com os peritremas (p) rodeados pelos quatro trios de tubérculos (tc). B – Peritremas com três aberturas espiraculares (setas).

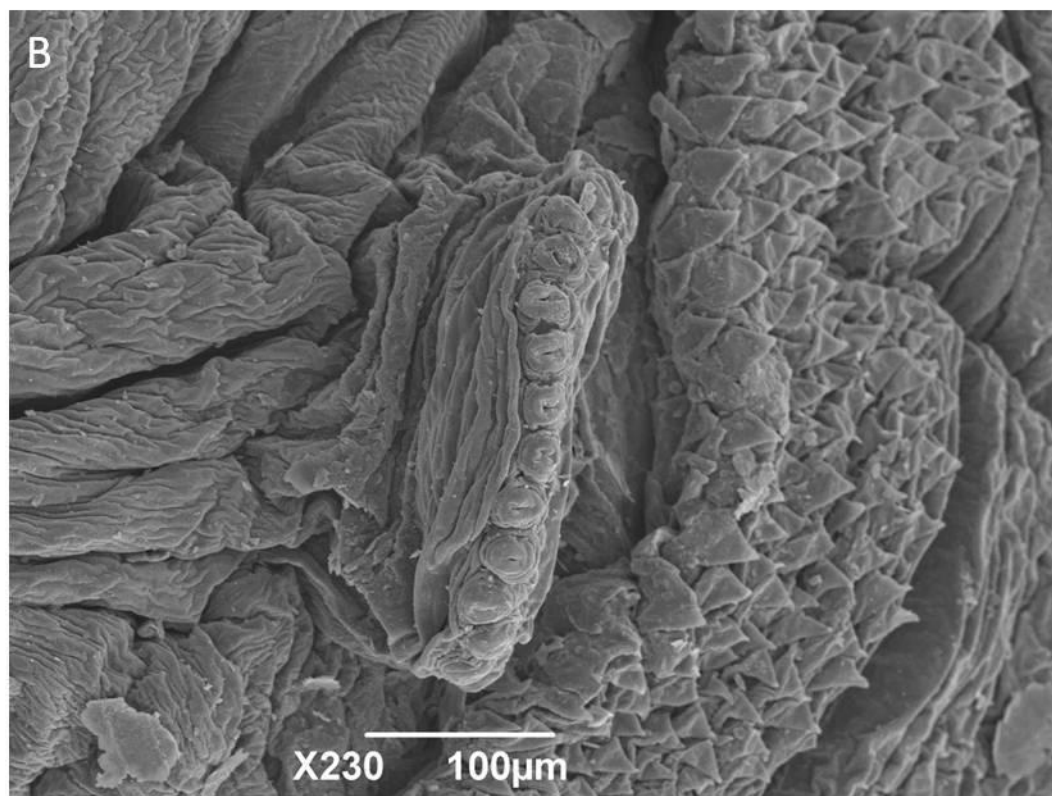
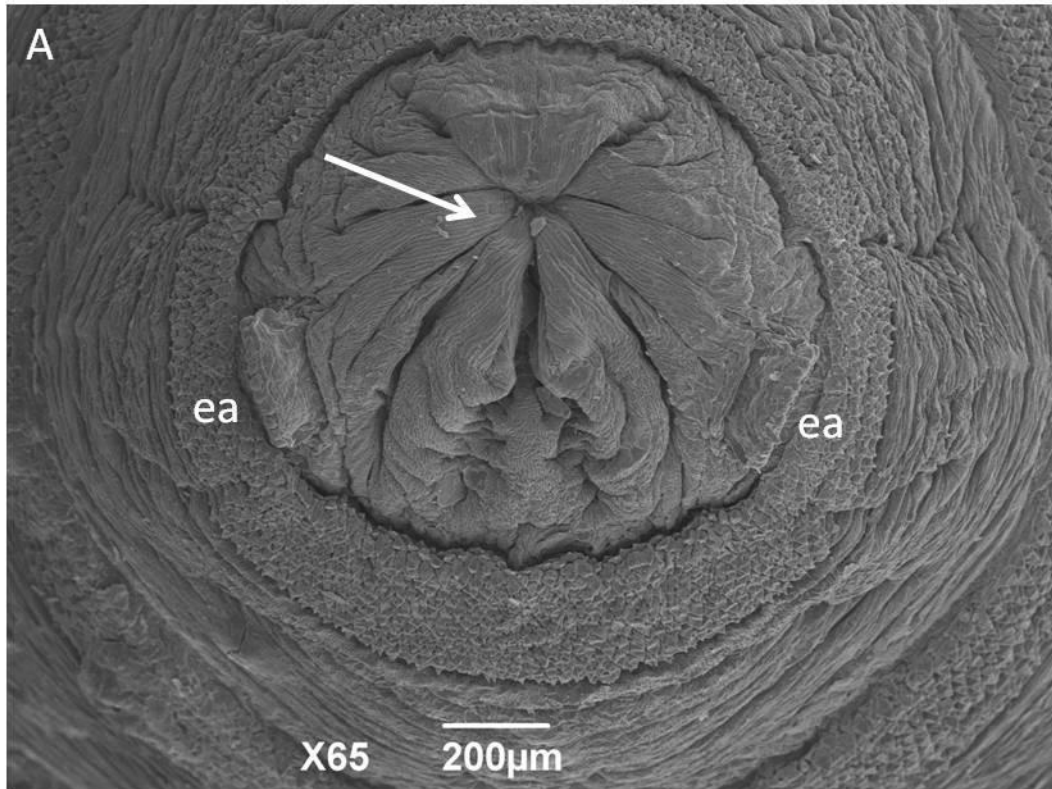


Figura 4.37 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia (Euboettcheria) anguilla*. A – Visão frontal com pseudocéfalo retraído (seta) e espiráculos anteriores (ea). B – Espiráculo anterior.

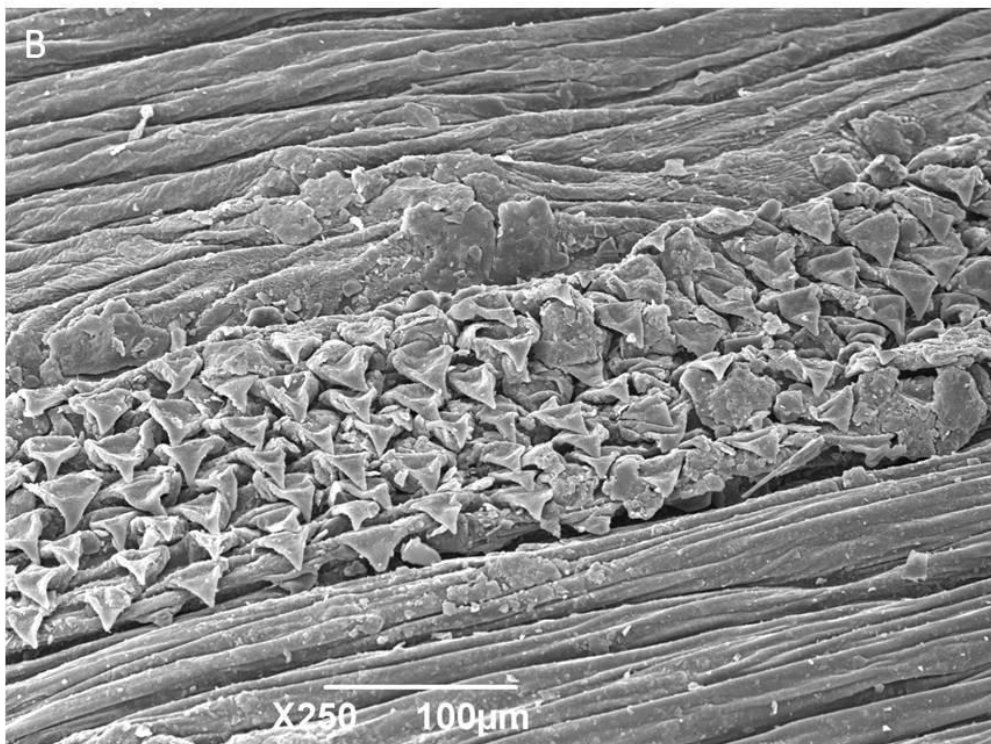
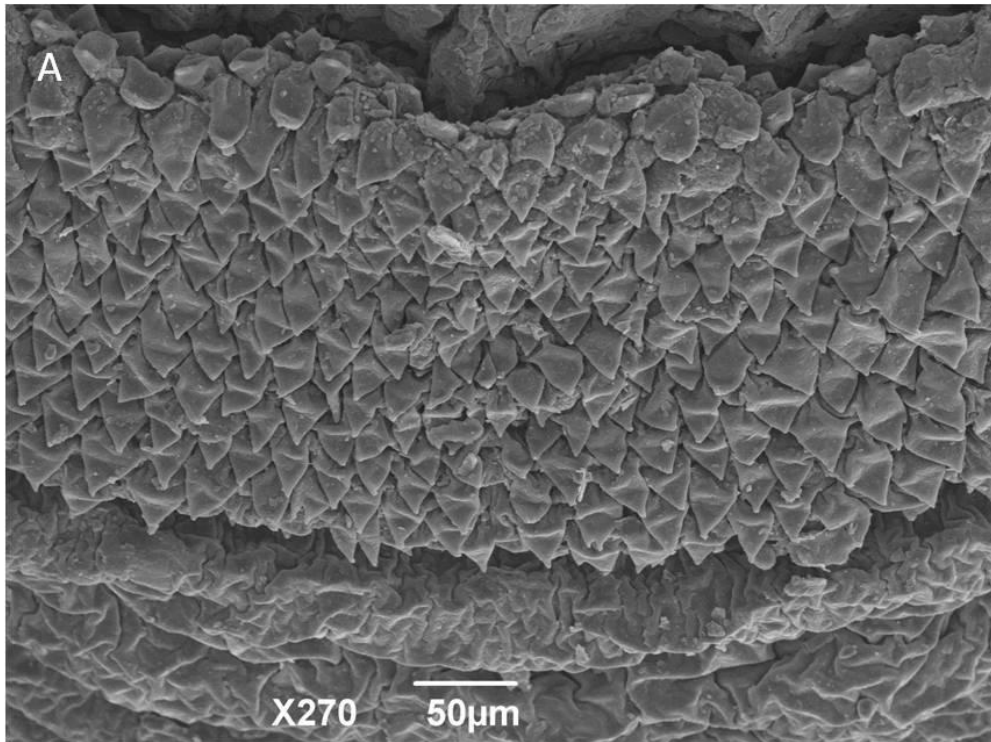


Figura 4.38 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*.
A – Espinhos do segundo segmento torácico. B – Espinhos intersegmentares abdominais.

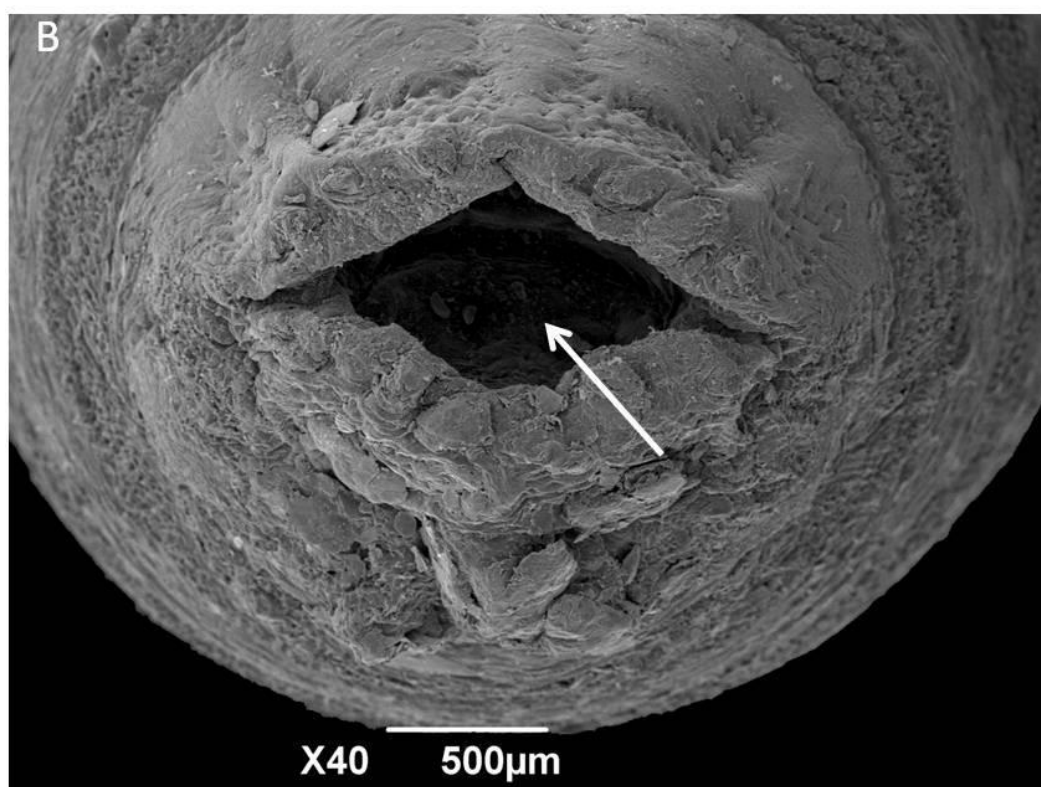
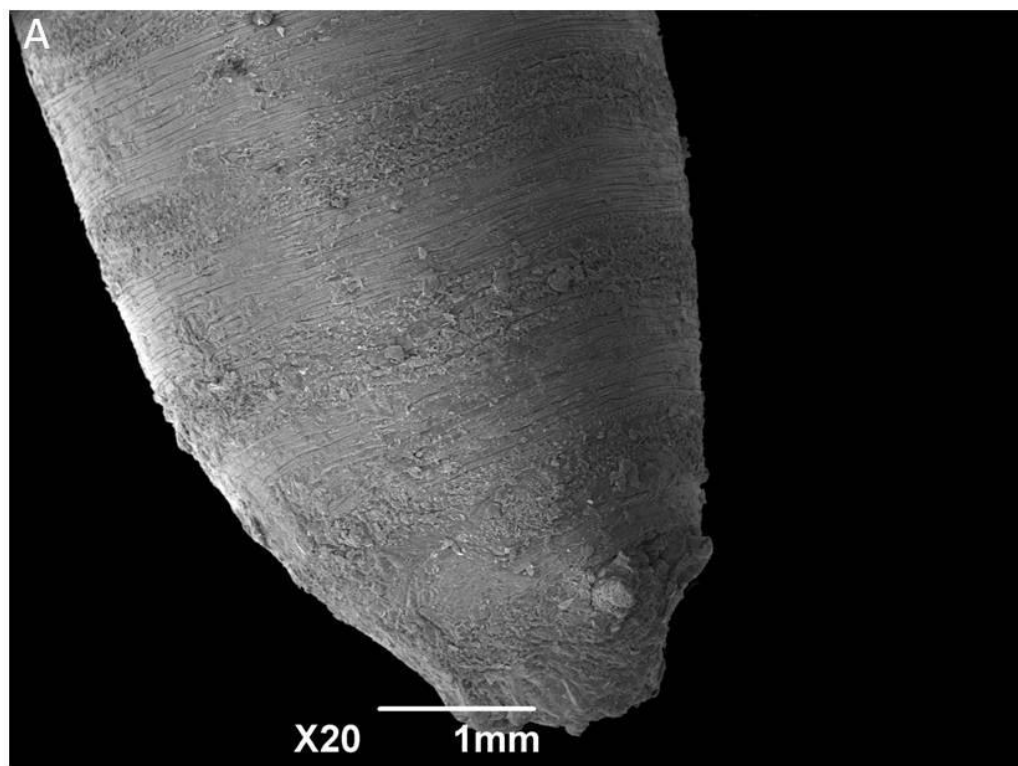


Figura 4.39 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia* (*Euboettcheria*) *anguilla*. A – Região posterior. B – Visão frontal da região posterior com o espiráculo internalizado (seta).

4.2.4. *Peckia (Euboettcheria) collusor* (variação morfológica)

4.2.4.1. Larva de primeiro instar – L1

O corpo da larva de *P. (E.) collusor* segue o padrão das larvas de sarcófagídeos com 12 segmentos. No segmento cefálico, encontram-se um par de antenas globosas em forma de cúpula, palpos maxilares, cristas orais e os ganchos maxilares (Fig. 4.40A). O colar cefálico é composto por espinhos filiformes e de pontas simples, semelhantes aos espinhos intersegmentares ao longo do corpo (Fig. 4.40B). Os espinhos que dividem os segmentos da larva estão orientados para a região posterior, com exceção dos espinhos dos últimos segmentos abdominais, orientados para ambas as regiões. O tegumento da larva é enrugado e livre de espinhos. O espiráculo posterior se encontra internalizado na cavidade anal e circundado por tubérculos curtos, ainda em desenvolvimento. O par de peritremas incompletos do espiráculo posterior apresenta duas aberturas espiraculares em cada um (Fig. 4.41).

4.2.4.2. Larva de segundo instar – L2

A região cefálica da larva de segundo instar apresenta as estruturas sensoriais mais desenvolvidas e ornamentadas do que as observadas no instar anterior (Fig. 4.42A). Os espinhos do colar cefálico estão mais desenvolvidos e grossos do que no instar anterior, e apresentam um padrão dentiforme com pontas duplas e simples (Fig. 4.42A). No primeiro segmento torácico podem ser observados os espiráculos anteriores. Estes estão rodeados por papilas espiraculares dispostas em fileiras regulares e que variam em número de 13 a 18 (Fig. 4.42B). Os espinhos intersegmentares torácicos são robustos, triangulares e orientados para a região posterior. À medida que se aproximam do segmento anal, os espinhos intersegmentares adquirem uma orientação para ambas as regiões do corpo da larva. Os espinhos abdominais são menos próximos um dos outros, diferentes dos espinhos torácicos e com um aspecto mais dentiforme (Fig. 4.43). A larva apresenta

tegumento enrugado. Na região posterior, os espinhos estão presentes ao longo de todo o segmento anal, não só na faixa intersegmentar. Os tubérculos circunspiraculares localizados na região posterior são curtos e circulam o espiráculo posterior no característico padrão de quatro trios. Os peritremas apresentam duas aberturas espiraculares grossas e orientadas verticalmente (Fig. 4.44).

4.2.4.3. Larva de terceiro instar – L3

Todas as estruturas estão claramente visíveis na larva de terceiro instar. A região anterior apresenta um pseudocéfalo bem desenvolvido e os espinhos do colar cefálico são dentiformes com pontas duplas ou simples (Fig. 4.45 e Fig. 4.46A). O espiráculo anterior está totalmente desenvolvido e apresenta papilas ornamentadas e dispostas em fileiras regulares, com um número máximo de 18 papilas observadas (Fig. 4.46B). Os segmentos do corpo da larva estão bem definidos, com bandas de espinhos intersegmentares bem desenvolvidos. Os espinhos intersegmentares torácicos apresentam uma morfologia muito similar aos espinhos do colar cefálico, porém são quase que totalmente compostos por espinhos de pontas simples. Os espinhos intersegmentares abdominais repetem a orientação para ambas as regiões observada nos instares anteriores e são menos densos e grossos que os espinhos do colar cefálico e dos intersegmentos torácicos (Fig. 4.47). A região posterior apresenta uma quantidade maior de espinhos sobre o tegumento. O espiráculo posterior está rodeado pelos quatro trios de curtos tubérculos circunspiraculares e cada um dos dois peritremas possuem três aberturas espiraculares estreitas e orientadas verticalmente (Fig. 4.48).

4.2.4.4. Pupário

A morfologia do pupário de *P. (E.) collusor* é semelhante à observada para as larvas L3. A região cefálica e o primeiro segmento torácico estão retraídos, o que faz com que os espiráculos anteriores assumam a posição mais extrema da região

anterior (Fig. 4.49). Estes espiráculos mantêm o padrão observado nas larvas de terceiro instar (Fig. 4.50A). Os espinhos intersegmentares torácicos mantêm a conformação observada nas larvas L3, bem como as rugas do tegumento. A região posterior apresenta os espinhos abdominais orientados para ambas as regiões. A placa espiracular está internalizada na cavidade anal e apresenta o par de peritremas com três aberturas espiraculares em cada um (Fig. 4.50B).

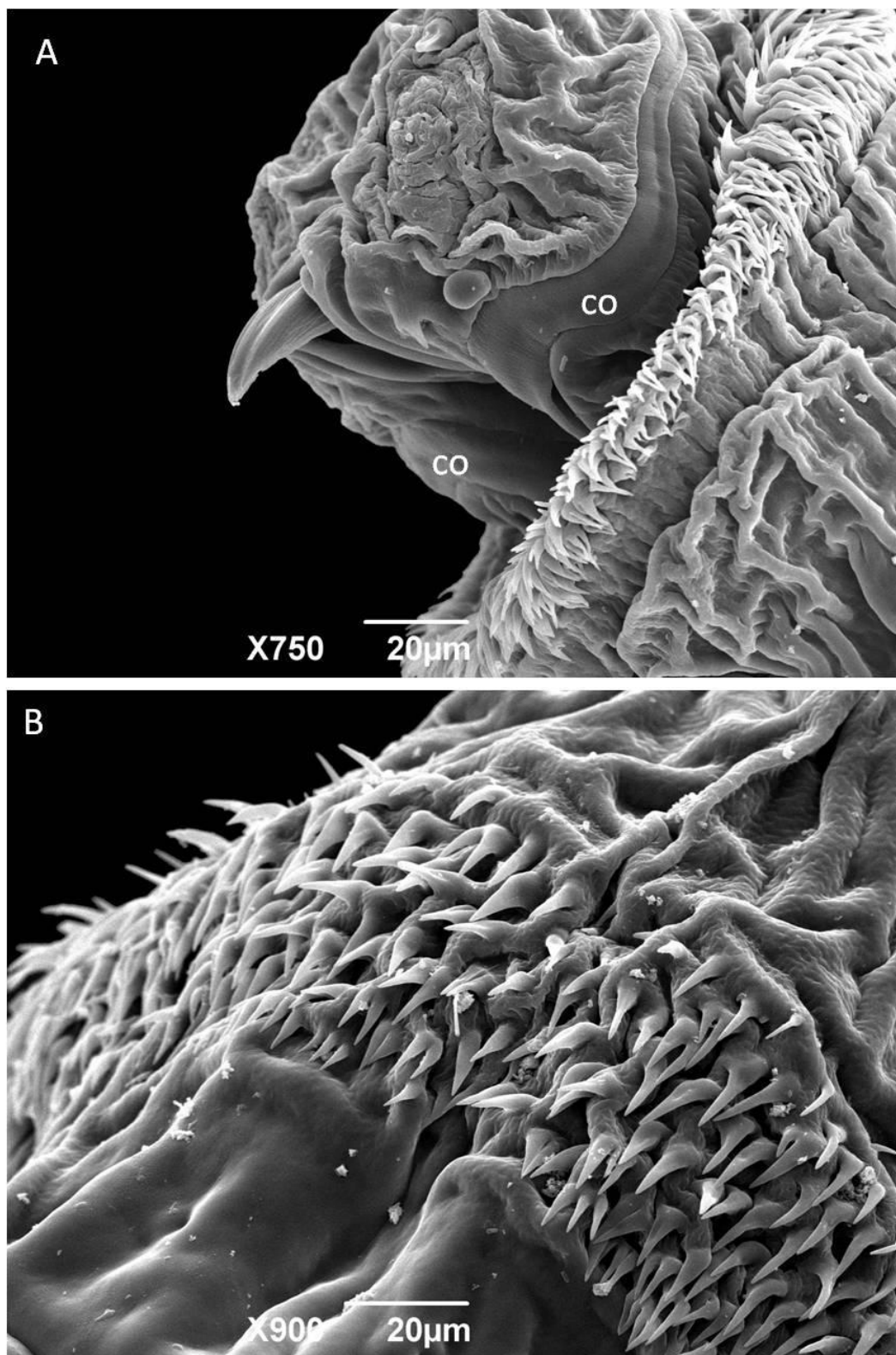


Figura 4.40 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Pseudocéfalo com as cristas orais (co). B – Espinhos do colar cefálico.

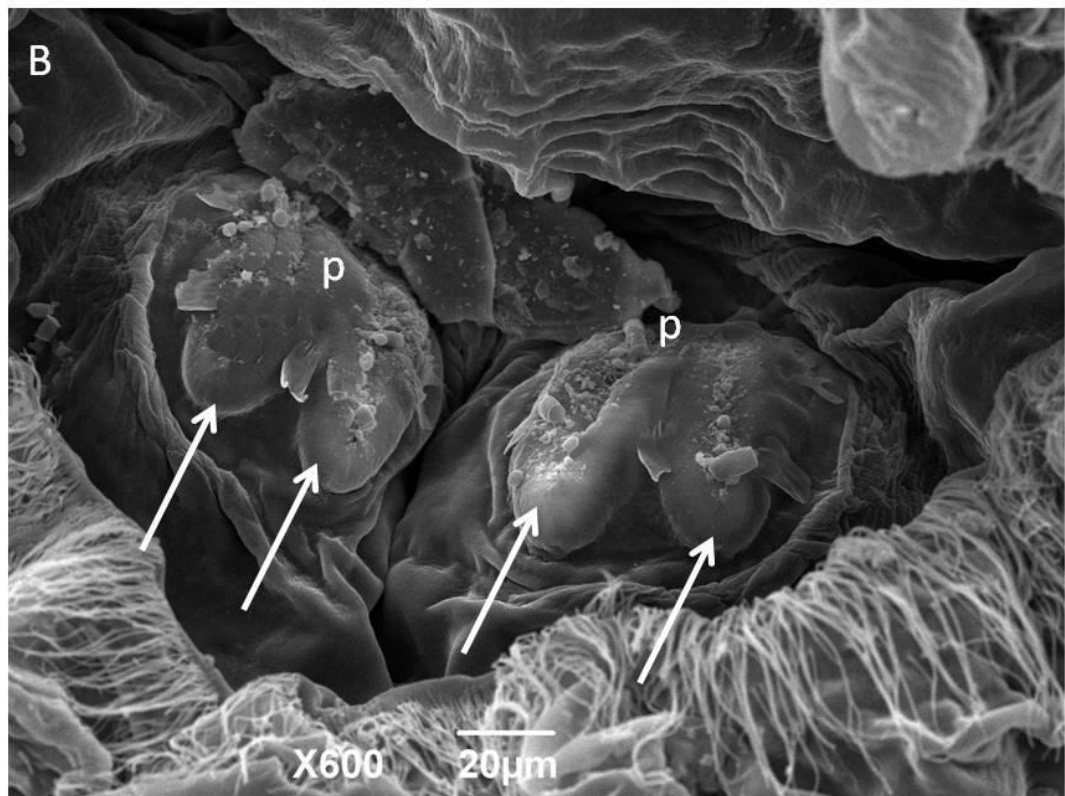
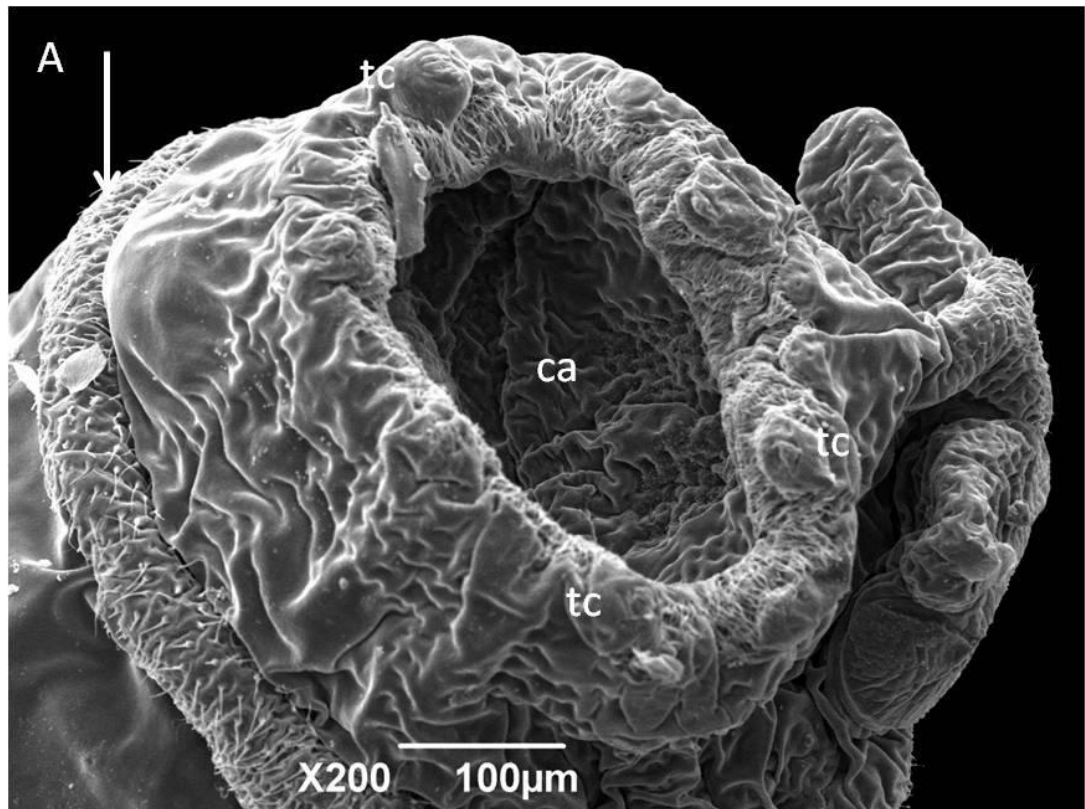


Figura 4.41 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de primeiro instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *collusor*. A – Espinhos intersegmentares dividindo o segmento abdominal do segmento anal (seta). Cavidade anal (ca) com a placa espiracular internalizada na região posterior e rodeada por tubérculos circunspiraculares (tc).

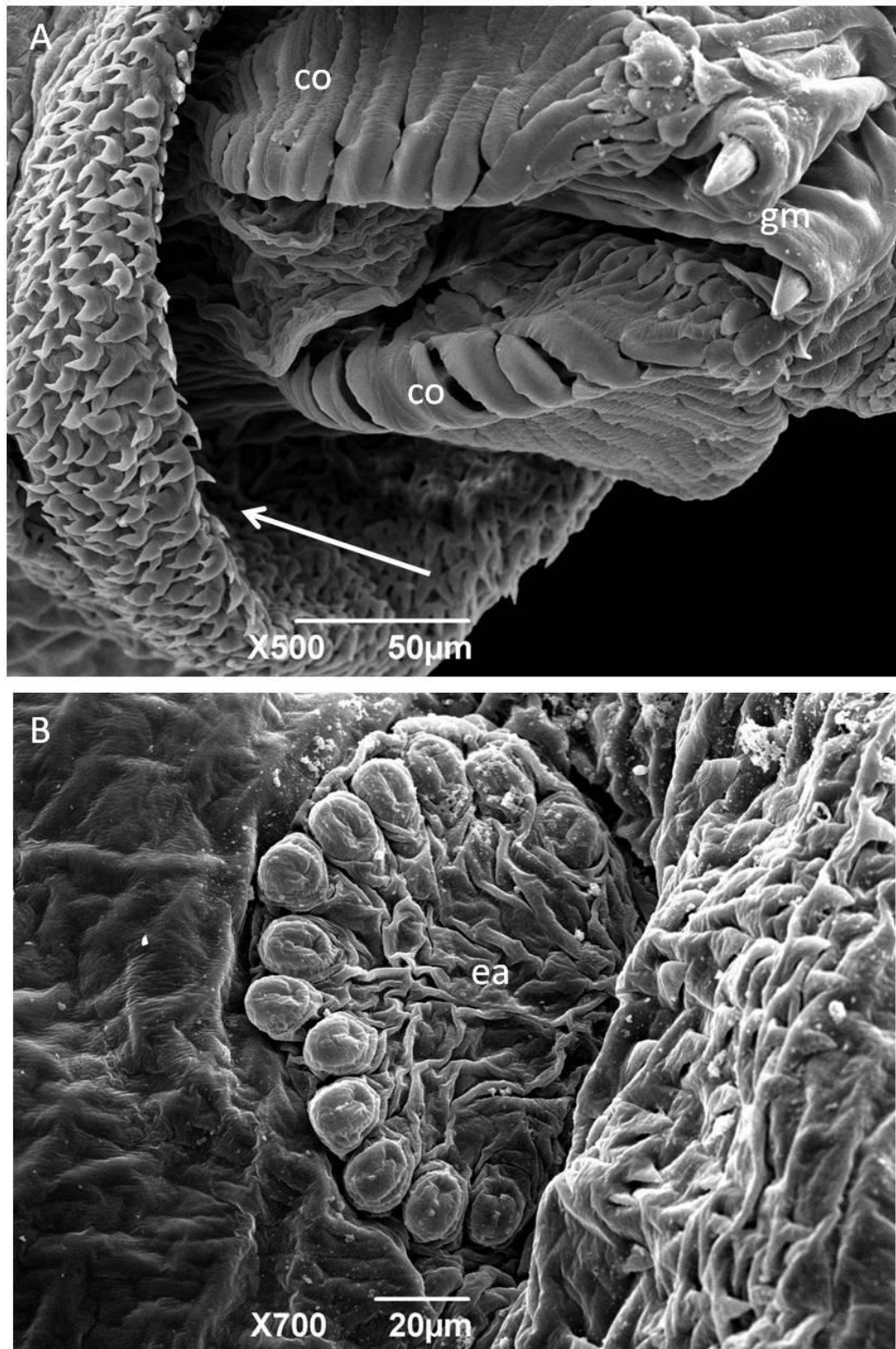


Figura 4.42 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Região cefálica com ganchos maxilares (gm), cristas orais (co) e espinhos do colar cefálico (seta). B – Espiráculo anterior (ea).

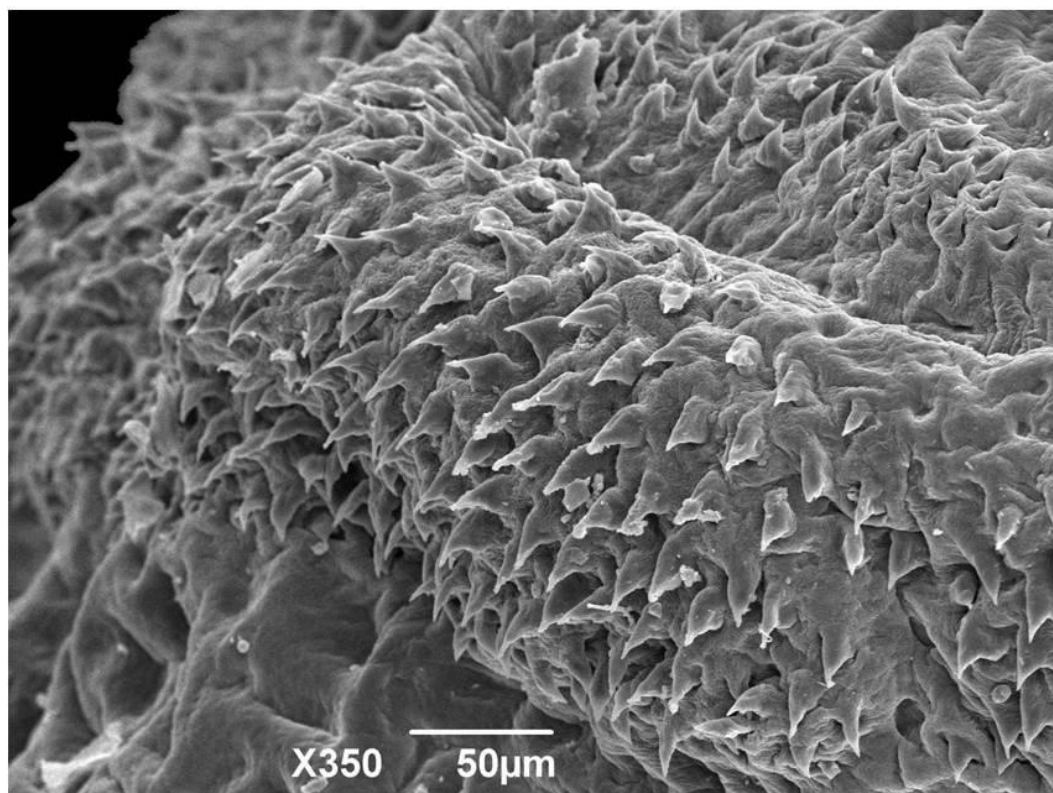
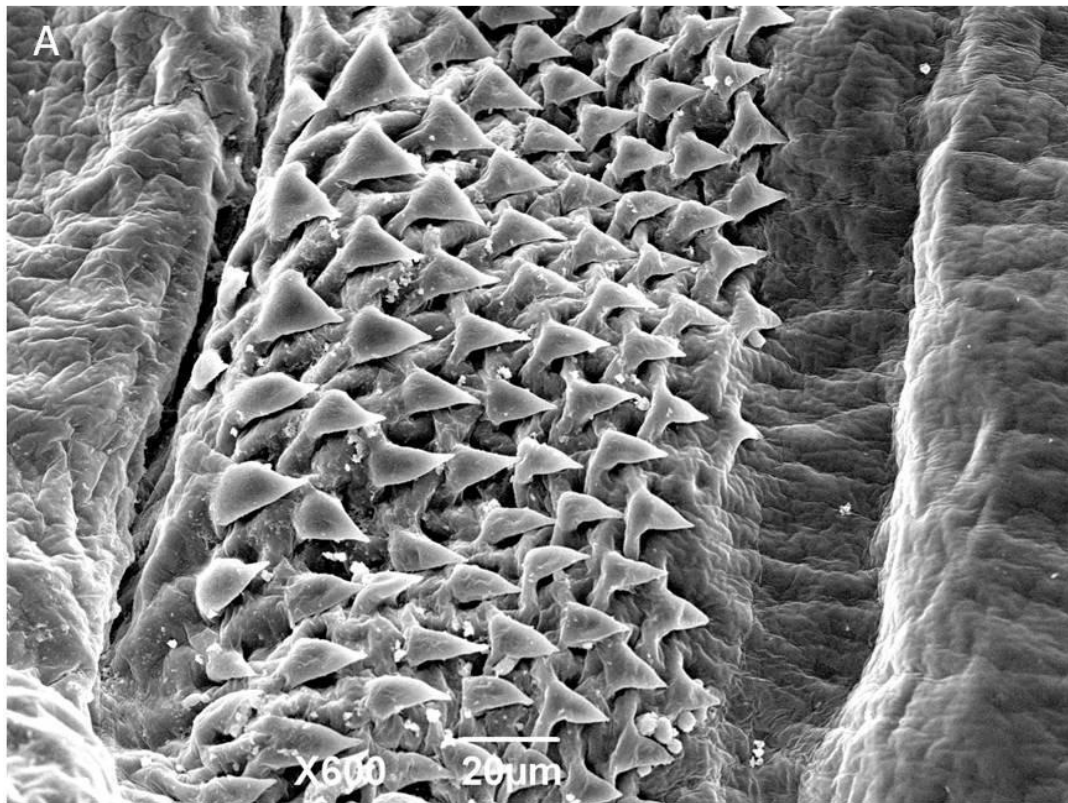


Figura 4.43 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Espinhos intersegmentares torácicos. B - Espinhos intersegmentares abdominais.

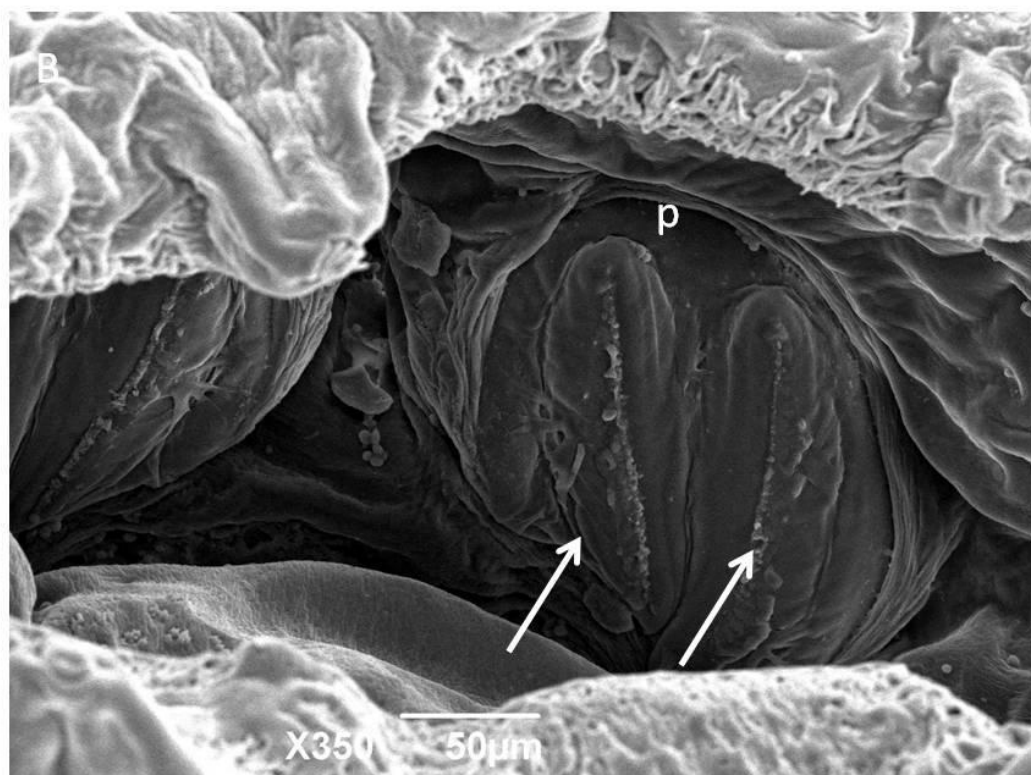
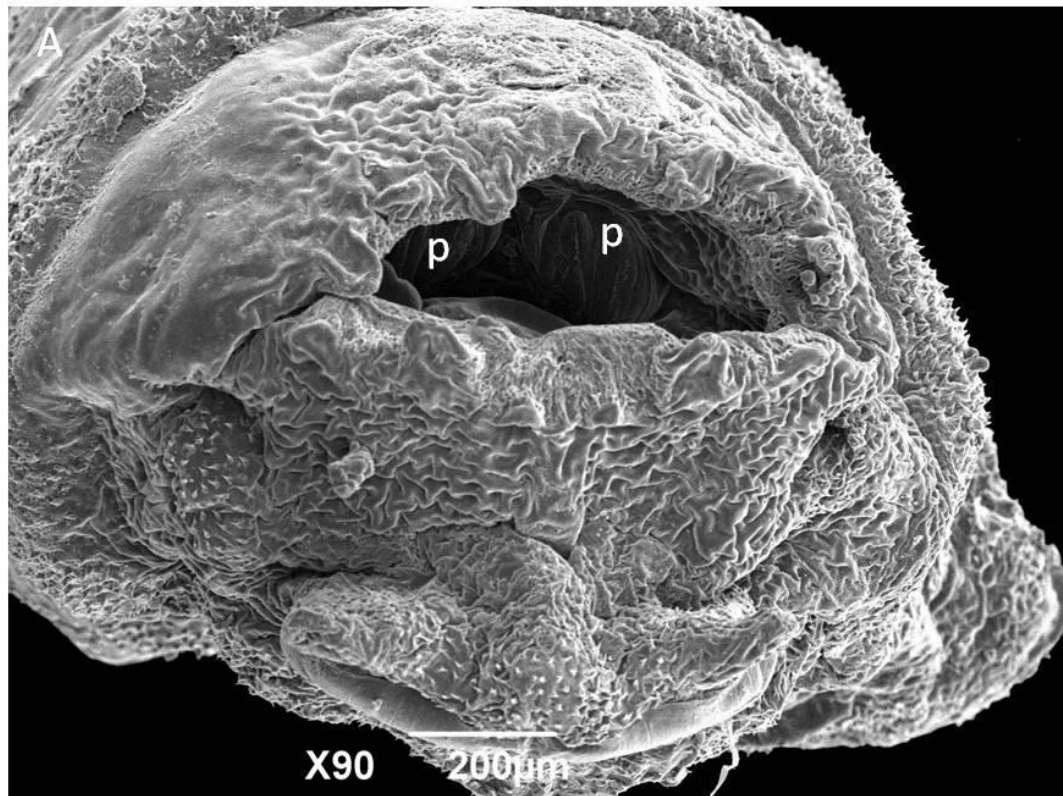


Figura 4.44 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de segundo instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Espiráculo posterior com um par de peritremas (p). B – Peritrema (p) com duas aberturas espiraculares (setas).

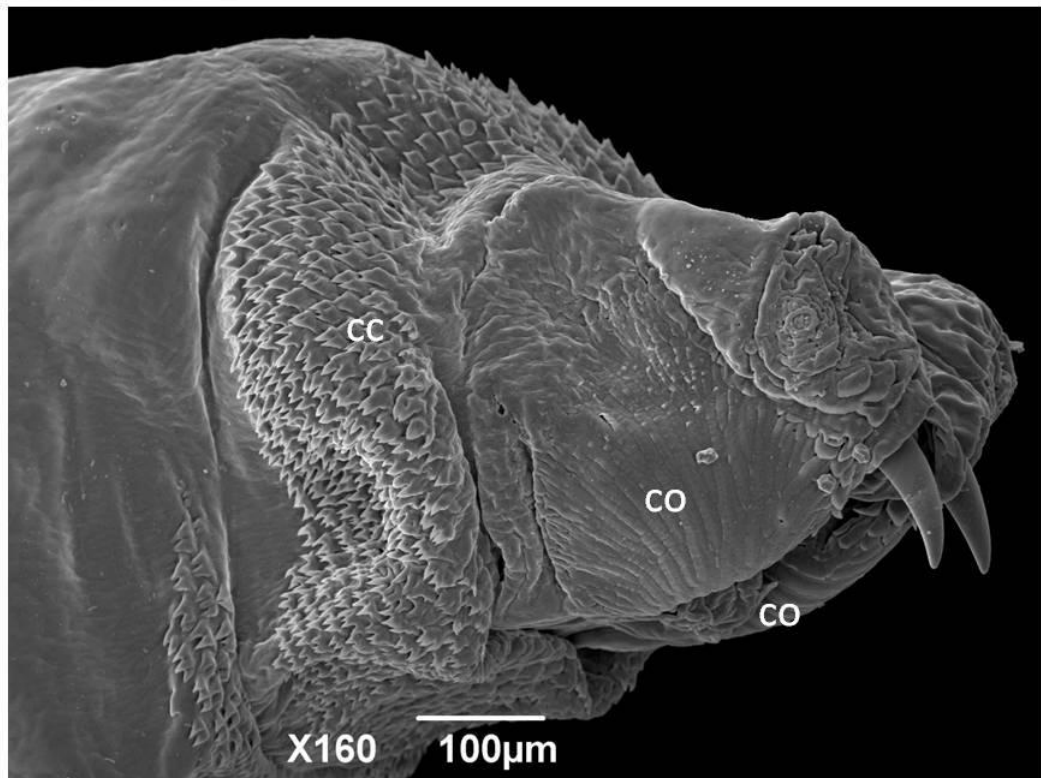
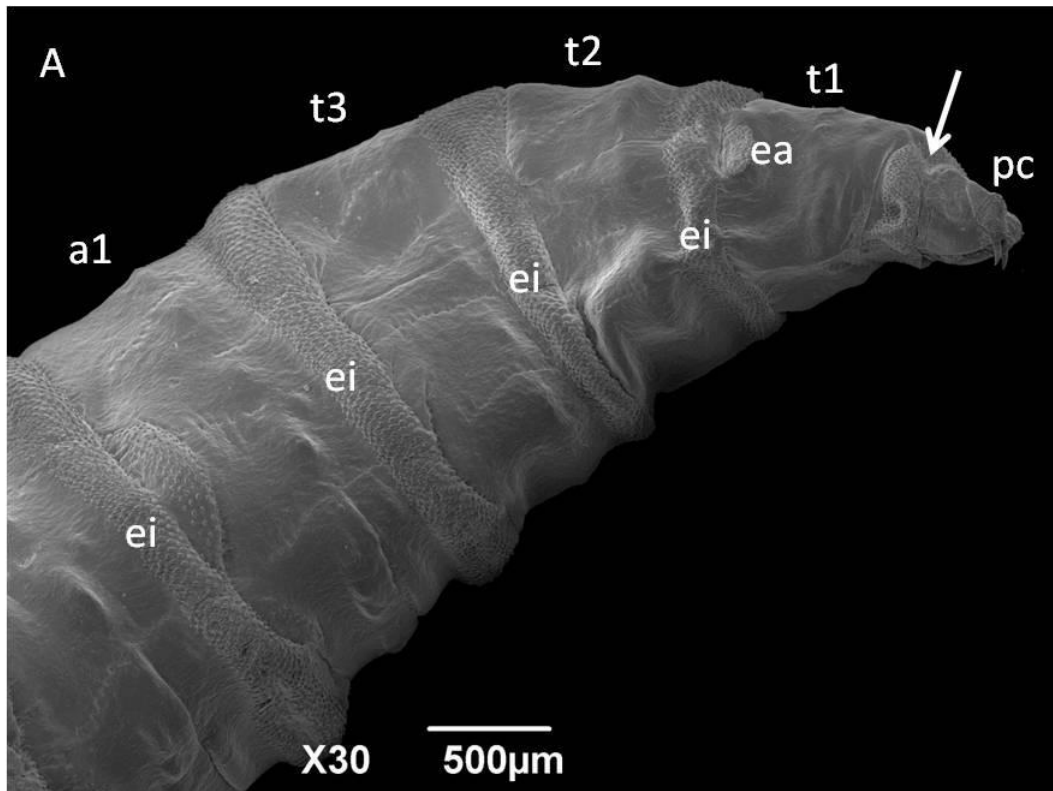


Figura 4.45 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Região anterior com destaque para o pseudocéfalo (pc), colar céfálico (seta), espiráculo anterior (ea), segmentos torácicos (t1-3), segmento abdominal (a1) e espinhos intersegmentares (ei). B – Pseudocéfalo com as cristas orais (co) e colar céfálico (cc).

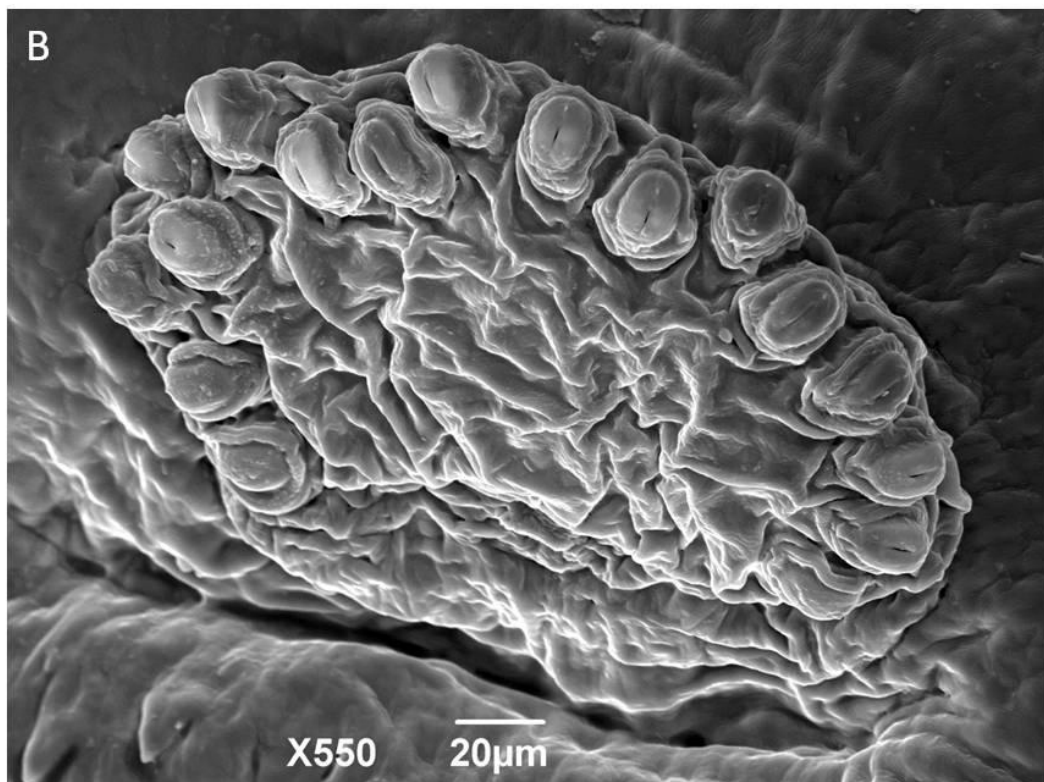
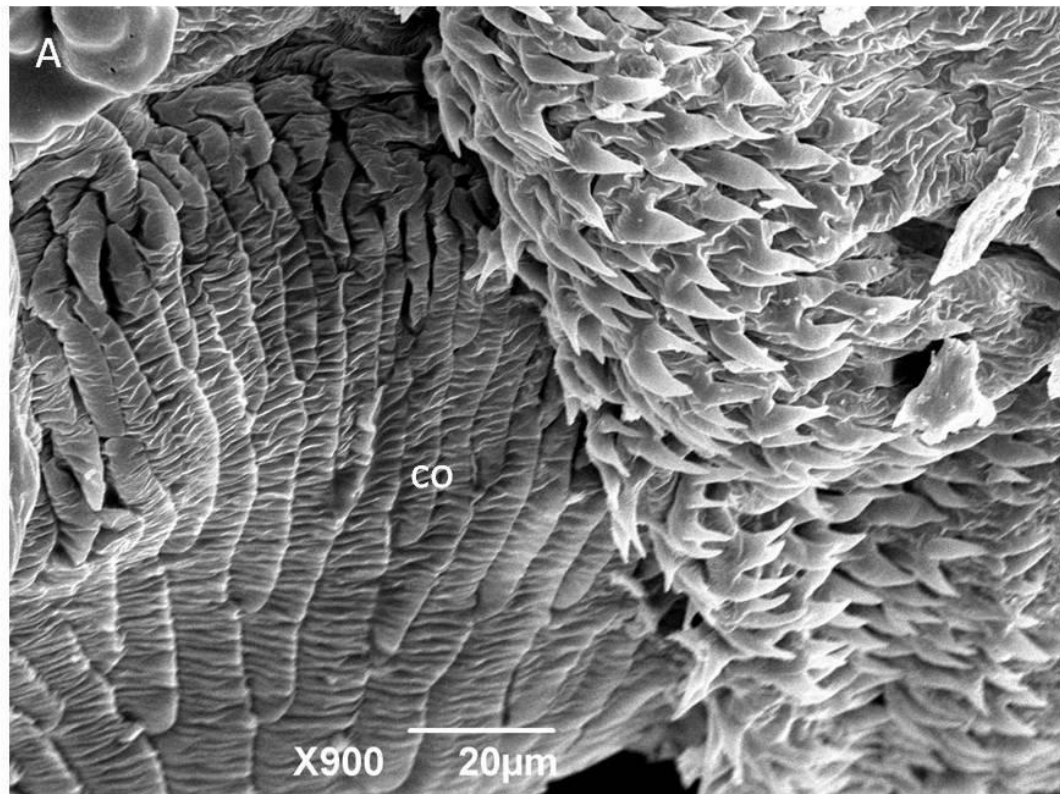


Figura 4.46 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Colar cefálico ao lado das cristas orais (co). B – Espiráculo anterior.

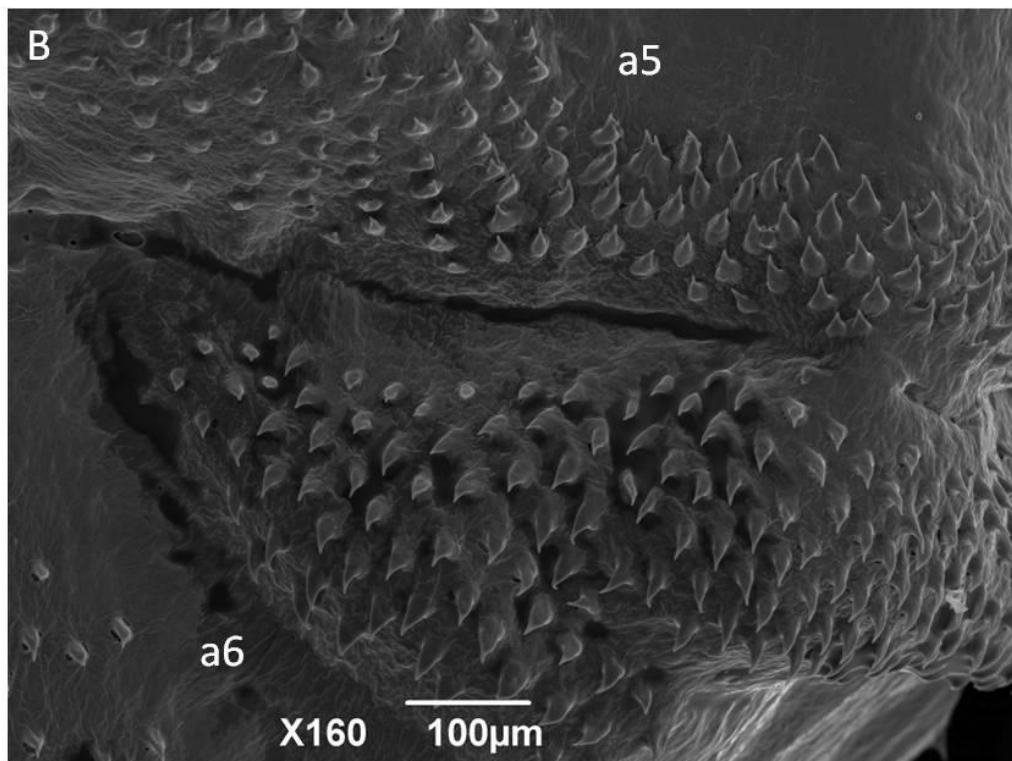
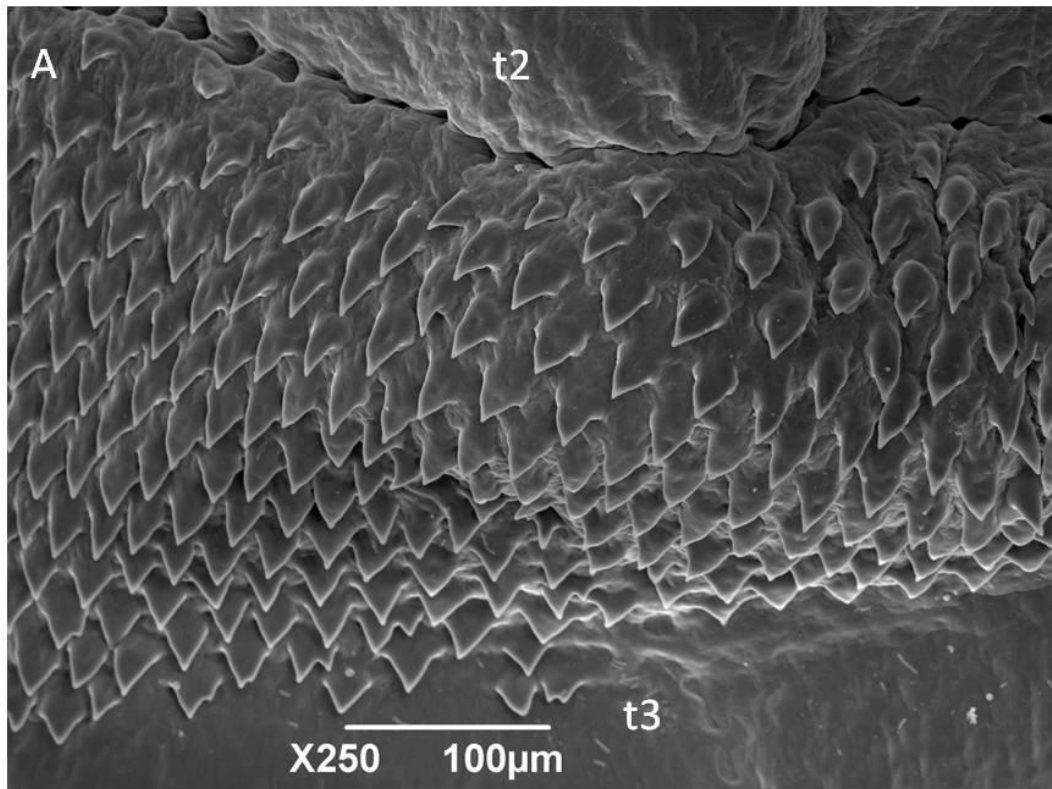


Figura 4.47 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *collusor*. A – Espinhos intersegmentares torácicos separando o segundo (t2) e terceiro (t3) segmento. B – Espinhos abdominais separando o quinto (a5) e sexto (a6) segmento.

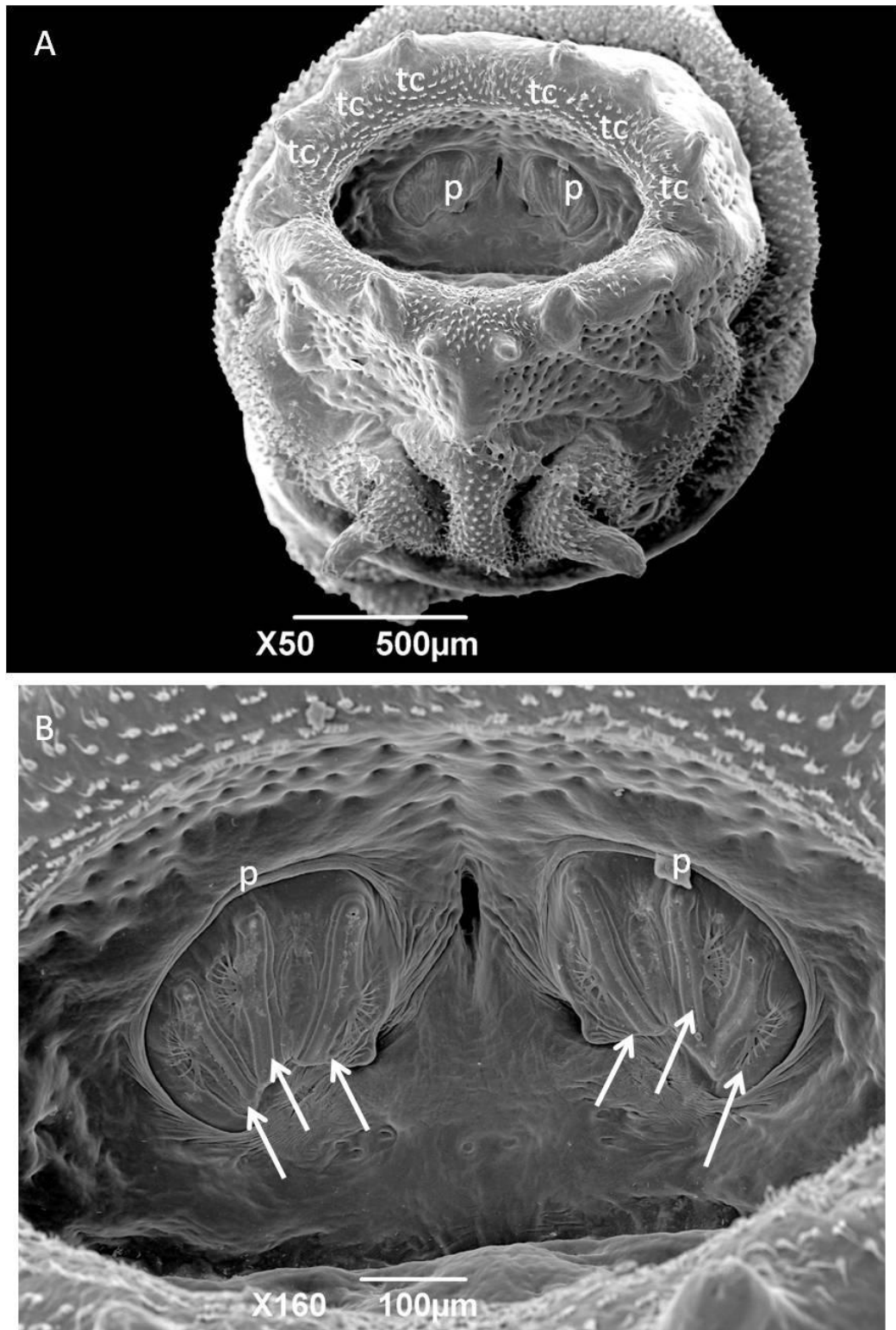


Figura 4.48 – Micrografia eletrônica de varredura de uma larva de terceiro instar de *Peckia* (*Euboettcheria*) *collusor*. A – Região posterior com o espiráculo, par de peritremas (p) e tubérculos circunspiraculares (tc). B – Par de peritremas (p) com três aberturas espiraculares cada um (setas).

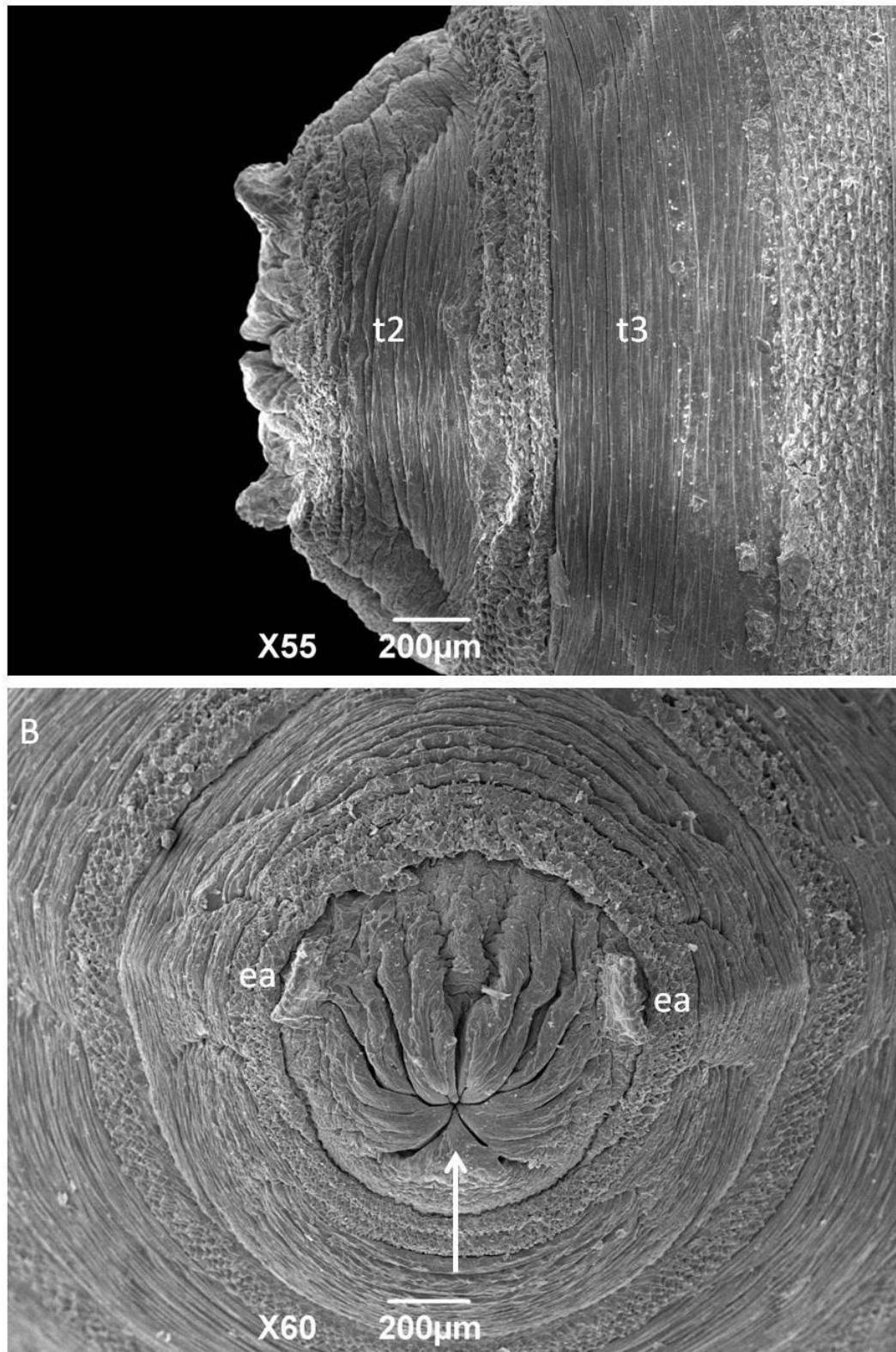


Figura 4.49 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia (Euboettcheria) collusor*. A – Visão lateral com o pseudocéfalo retraído (seta) e espiráculos posteriores (ea). Segundo (t2) e terceiro (t3) segmentos torácicos. B – Visão frontal da região anterior com pseudocéfalo retraído (seta) e espiráculos anteriores (ea).

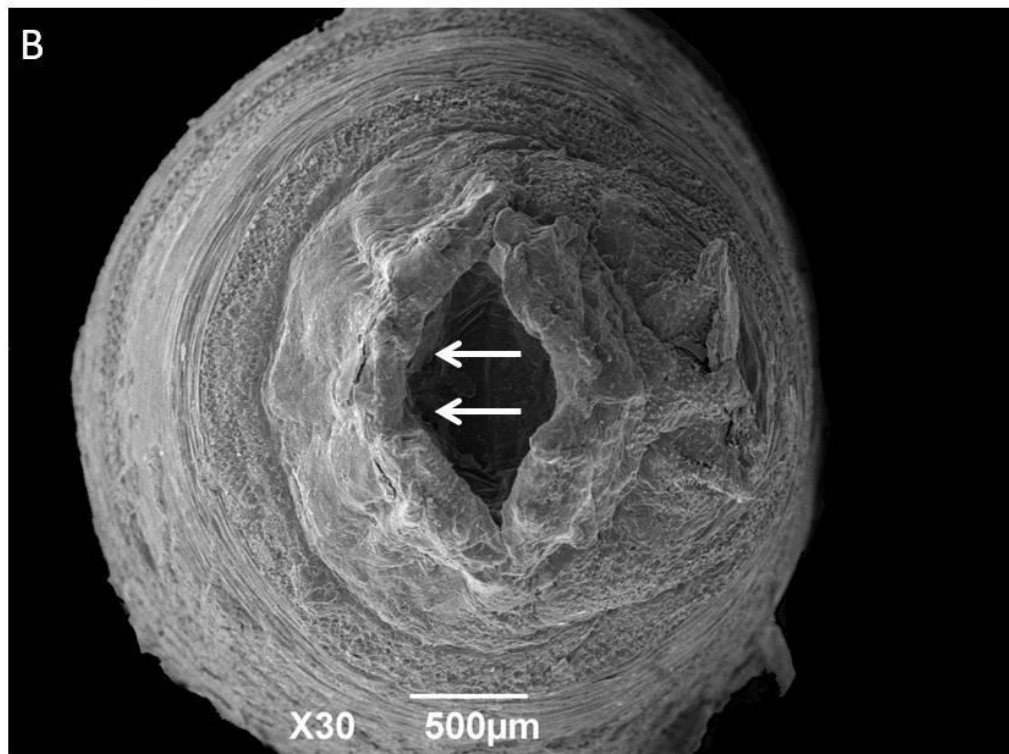
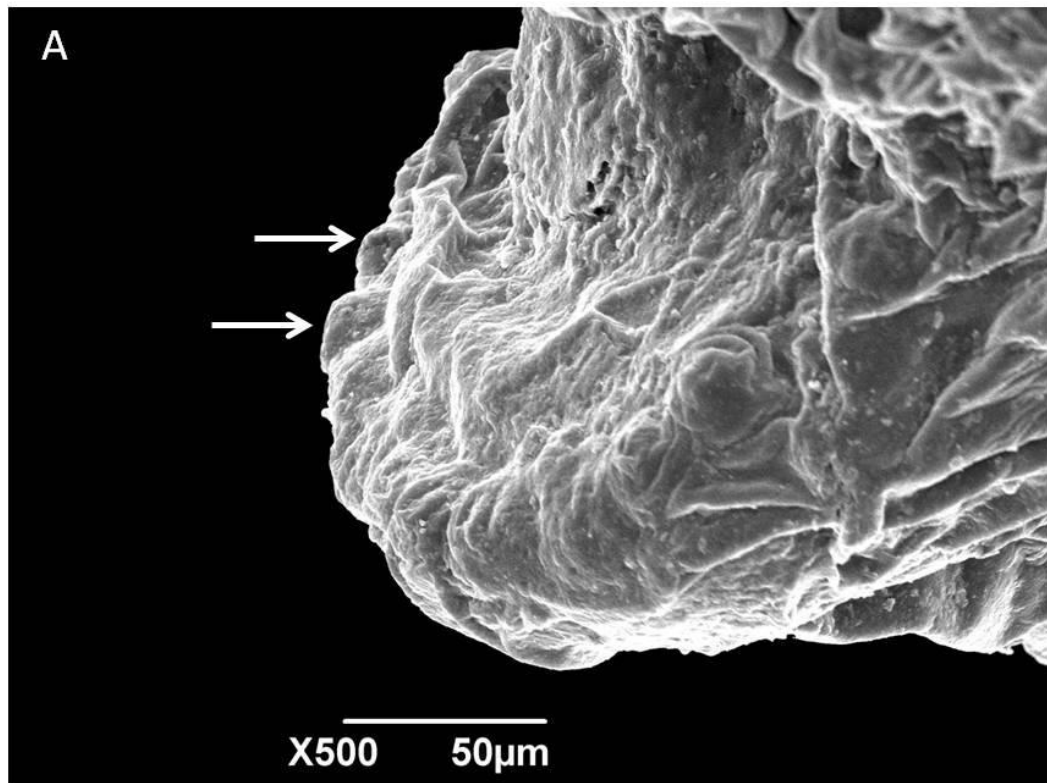


Figura 4.50 – Micrografia eletrônica de varredura de um pupário de *Peckia* (*Euboettcheria*) *collusor*. A – Espiráculo anterior com papilas espiraculares (setas). B – Espiráculo posterior com setas indicando os peritremas internalizados.

Quadro 4.1 – Comparação entre as principais características morfológicas de imaturos de quatro espécies de dípteros muscoides da família Sarcophagidae analisados através da microscopia eletrônica de varredura.

Características	Espécies			
	<i>Ravinia belforti</i>	<i>Peckia (Patonella) intermutans</i>	<i>Peckia (Euboettcheria) anguilla</i>	<i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i> Var. Morf.
Padrão dos espinhos do colar cefálico	Pontas duplas, triplas ou quádruplas	Pontas simples	Pontas simples ou duplas	Pontas simples
Número de papilas do espiráculo anterior	16-22	17-35	14-17	13-18
Tipo de fileiras do espiráculo anterior	Irregular	Regular/Irregular	Regular	Regular
Orientação dos espinhos torácicos	Apontados para a região posterior	Apontados para a região posterior	Apontados para a região posterior	Apontados para a região posterior
Orientação dos espinhos abdominais	Apontados para a região anterior e posterior	Apontados para a região anterior e posterior	Apontados para a região anterior e posterior	Apontados para a região anterior e posterior
Padrão dos tubérculos circunspiraculares	Alongados	Alongados	Curtos	Curtos

4.3. Identificação molecular de dípteros muscoides da família Sarcophagidae

A tabela 4.4 mostra as 12 espécies de Sarcophagidae utilizadas nas análises moleculares, assim como seu local de coleta. O código utilizado para cada espécie também se encontra na tabela. Este código é composto da letra do gênero (ou subgênero) e do epíteto específico, seguido da sigla do estado no qual a espécie foi coletada. Quando duas espécies diferentes apresentavam as mesmas iniciais no nome científico, optamos por usar as três primeiras letras do epíteto específico. A numeração que segue cada código se refere ao número da amostra, já que cinco indivíduos de cada espécie foram utilizados.

Tabela 4.4: Nome, localização, código e número de amostras sequenciadas das 12 espécies de Sarcophagidae submetidas às análises moleculares.

Espécie	Local de coleta	Código das Amostras	Amostras sequenciadas
<i>Ravinia belforti</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	RBRJ	4
	Terenos, Mato Grosso do Sul	RBMS	3
<i>Helicobia aurescens</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	HARJ	5
<i>Oxysarcodexia terminalis</i>	Terenos, Mato Grosso do Sul	TERMS	5
<i>Oxysarcodexia thornax</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	OTRJ	5
	Terenos, Mato Grosso do Sul	OTMS	5
<i>Oxysarcodexia amorosa</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	OARJ	5
<i>Sarcophaga (Liopygia) ruficornis</i>	Macapá, Amapá	SRAP	3
<i>Malacophagomyia filamenta</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	MFRJ	4
<i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	COLRJ	4
<i>Peckia (Peckia) pexata</i>	Macapá, Amapá	PPAP	2
	Terenos, Mato Grosso do Sul	PPMS	3
<i>Peckia (Pattonella) intermutans</i>	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	PIRJ	3
	Manaus, Amazonas	PIAM	2
<i>Peckia (Sarcodexia) lambens</i>	Terenos, Mato Grosso do Sul	SLMS	2
<i>Peckia (Peckia) chrysostoma</i>	Macapá, Amapá	PCAP	1
	Terenos, Mato Grosso do Sul	PCMS	4

Ao longo do experimento foi extraído o DNA de 85 amostras. Os *primers* LCO1490-L e HCO2198-L não ofereceram bons resultados para as espécies estudadas nesse trabalho. Assim, com base nestes *primers*, foi desenhado um novo par de *primer*, chamado de COI-CallF e COI-CallR que amplifica um segmento dentro da mesma região amplificada por LCO1490-L e HCO2198-L. Esta amplificação foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5 % e tampão de corrida TBE 0,5x.

Após os produtos da PCR serem purificados e sequenciados, as sequências foram alinhadas e fragmentos de 635pb foram obtidos para 60 espécimes pertencentes às 12 espécies de Sarcophagidae coletadas no Brasil (tabela 4.4). Este valor resultou numa porcentagem de sucesso de 76,47 %. Apenas as espécies *Helicobia aurescens*, *Oxysarcodexia terminalis*, *O. thornax* e *O. amorosa* tiveram 100% de suas amostras sequenciadas com sucesso.

Todas as 60 sequências nucleotídicas das 12 espécies de Sarcophagidae foram submetidas ao algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool*, *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para que fossem feitas comparações com sequências nucleotídicas disponibilizadas no *Genbank*. Das 12 espécies sequenciadas no presente trabalho, seis encontraram correspondentes no banco de dados que corroboraram as identificações morfológicas destas espécies previamente realizadas por nosso grupo.

Destas seis espécies, duas apresentaram 100 % de similaridade com sequências depositadas no *BLAST*. A espécie *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* coletada em Macapá-AP teve uma correspondência de 100 % com uma sequência de *S. (L.) ruficornis* (código de acesso KR071620) obtida de uma fêmea coletada na China. A espécie *Peckia (Sarcodexia) lambens* coletada em Terenos-MS apresentou 100% de similaridade com uma sequência de um sarcófagídeo coletado na Costa Rica e identificado apenas como "SarcJanzen01 sp Janzen19" (JQ576745).

As espécies *O. thornax*, coletada no Rio de Janeiro-RJ e em Terenos-MS, *Peckia (Euboettcheria) collusor*, coletada no Rio de Janeiro-RJ, e *P. (P.) chrysostoma*, coletada em Macapá-AP e Terenos-MS, apresentaram 99 % de similaridade com sequências das mesmas espécies (JQ246695, GQ409344 e GQ223333, respectivamente) disponibilizadas no banco de dados. A espécie

Peckia (Peckia) pexata, coletada em Macapá-AP e Terenos-MS, apresentou similaridade de 99 % com uma espécie de *Peckia (Peckia) uncinata* (GQ223332).

A espécie *Peckia (Pattonella) intermutans* coletada no Rio de Janeiro-RJ apresentou uma similaridade de 98 % com uma sequência da mesma espécie depositada no banco de dados (GQ223335). Já a espécie coletada em Manaus-AM e comparada com a mesma espécie de *P. (P.) intermutans* (GQ223335) apresentou similaridade de 96 %.

Das 12 espécies analisadas, cinco não tiveram uma sequência correspondente com similaridade acima de 94 % no *BLAST*. O que indica não existir sequências das espécies *H. aurescens*, *O. amorosa*, *O. terminalis*, *Malacophagomyia filamenta* e *Ravinia belforti* disponibilizadas no banco de dados.

A composição nucleotídica do fragmento de 635pb do gene mitocondrial COI foi calculada através do programa MEGA. A média da composição nucleotídica para as 12 espécies estudadas foi de A = 29,6 %, T = 36,9 %, C = 16,9 % e G = 16,6 %. A maior média de A+T foi de 67,6 %, observada para as espécies *H. aurescens* e *P. (P.) chrysostoma*. A menor média de A+T foi de 64,7 %, observada para a espécie *R. belforti*.

O alinhamento das 60 sequências de 635pb apresentaram 449 sítios conservados ou monomórficos (70,7 %), 186 sítios variáveis ou polimórficos (29,3 %) e 182 sítios informativos para parcimônia (28,66 %).

A média de distância genética calculada através do modelo Kimura-2-parâmetros (K2P) observada entre as 12 espécies de Sarcophagidae analisadas no presente trabalho foi de 11,1%. A distância intraespecífica variou de 0,2 a 3,2 %. Enquanto a maioria das espécies apresentou uma distância intraespecífica próxima de 0%, as duas populações de *R. belforti* (RJ e MS) apresentaram 1,3 % de variação intraespecífica e as populações de *P. (P.) intermutans* apresentaram 3,2% de variação intraespecífica (Tabela 4.5).

A distância interespecífica variou de 4,3 a 15,2 %. A menor distância interespecífica, de 4,3 %, foi observada entre *P. (P.) pexata* e *P. (P.) chrysostoma*. A maior distância interespecífica, de 15,2 %, foi observada entre as espécies *R. belforti*

e *M. filamenta*, *O. thornax* e *P. (E.) collusor* e *R. belforti* e *P. (S.) lambens* (tabela 4.5).

Para analisar os agrupamentos e auxiliar a identificação das espécies foram geradas árvores de distância genética construídas pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ) e a sua confiabilidade foi testada com 1000 repetições de *bootstrap*.

Tabela 4.5: Matriz de distância genética (em porcentagem) para as populações das 12 espécies de dípteros muscoides da família Sarcophagidae estudadas.

Populações	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1 RBRJ																	
2 RBMS	1,3																
3 HARJ	13,1	13,9															
4 TERMS	13,4	14,1	10,1														
5 OTRJ	13,9	14,8	11,5	9,4													
6 OTMS	13,7	14,6	11,3	9,3	0,2												
7 OARJ	13,7	14,6	11,0	8,3	8,9	8,8											
8 SRAP	12,3	13,3	9,9	10,3	12,1	11,9	11,2										
9 MFRJ	14,8	14,8	11,2	11,8	14,3	14,1	12,4	11,2									
10 COLRJ	13,1	13,7	12,2	13,2	15,0	14,9	11,9	11,3	12,3								
11 PPAP	13,2	13,9	10,5	11,1	11,9	11,9	11,0	9,2	10,9	11,8							
12 PPMS	13,2	13,9	10,3	10,9	11,7	11,7	10,9	9,2	10,7	11,6	0,3						
13 PCAP	12,7	12,7	9,9	11,0	12,3	12,2	11,8	8,5	11,4	11,4	4,3	4,3					
14 PCMS	12,7	12,7	9,9	11,1	12,3	12,2	11,8	8,6	11,5	11,4	4,3	4,3	0,2				
15 PIRJ	12,9	13,4	10,4	10,5	14,4	14,5	11,0	8,0	12,0	10,7	9,6	9,6	9,0	9,0			
16 PIAM	13,7	14,6	11,9	9,9	13,3	13,3	10,8	8,4	12,4	11,7	9,3	9,3	10,0	10,0	3,2		
17 SLMS	14,4	15,2	11,4	11,3	12,1	12,1	11,4	9,9	13,3	12,0	11,6	11,6	11,6	11,6	8,6	9,0	

A figura 4.51 apresenta a árvore de *Neighbour-Joining* para as 12 espécies de Sarcophagidae analisadas. Uma sequência retirada do *Genbank* da espécie da família Calliphoridae *Lucilia illustris* (JX295708) foi utilizada como grupo externo. O gênero *Oxysarcodexia* manteve um agrupamento isolado das demais espécies analisadas. Todas as espécies foram agrupadas juntas e não houve amostras isoladas, misturadas a outras espécies na árvore. Este fato e os valores elevados de *bootstrap* de até 100 % nos ramos interiores a nível específico suportam que uma identificação acurada das espécies através do fragmento de 635 pb do gene mitocondrial COI foi obtida.

Uma árvore de distância genética construída pelo método de NJ foi gerada apenas para as sequências do gênero *Peckia* (Fig. 4.52). Da mesma forma, uma nova árvore também foi gerada para as sequências do gênero *Oxysarcodexia* (Fig. 4.53). Ao gerar uma árvore de NJ apenas com as sequências de nucleotídeos pertencentes aos gêneros *Peckia* e *Oxysarcodexia*, foram obtidos valores de *bootstrap* de 81 % para o gênero *Peckia* e de 62 % para o gênero *Oxysarcodexia* (Fig. 4.54). Estes baixos valores de *bootstrap* nos ramos externos indicam não ser possível inferir um monofiletismo ao nível de gênero utilizando apenas o gene mitocondrial COI como marcador.

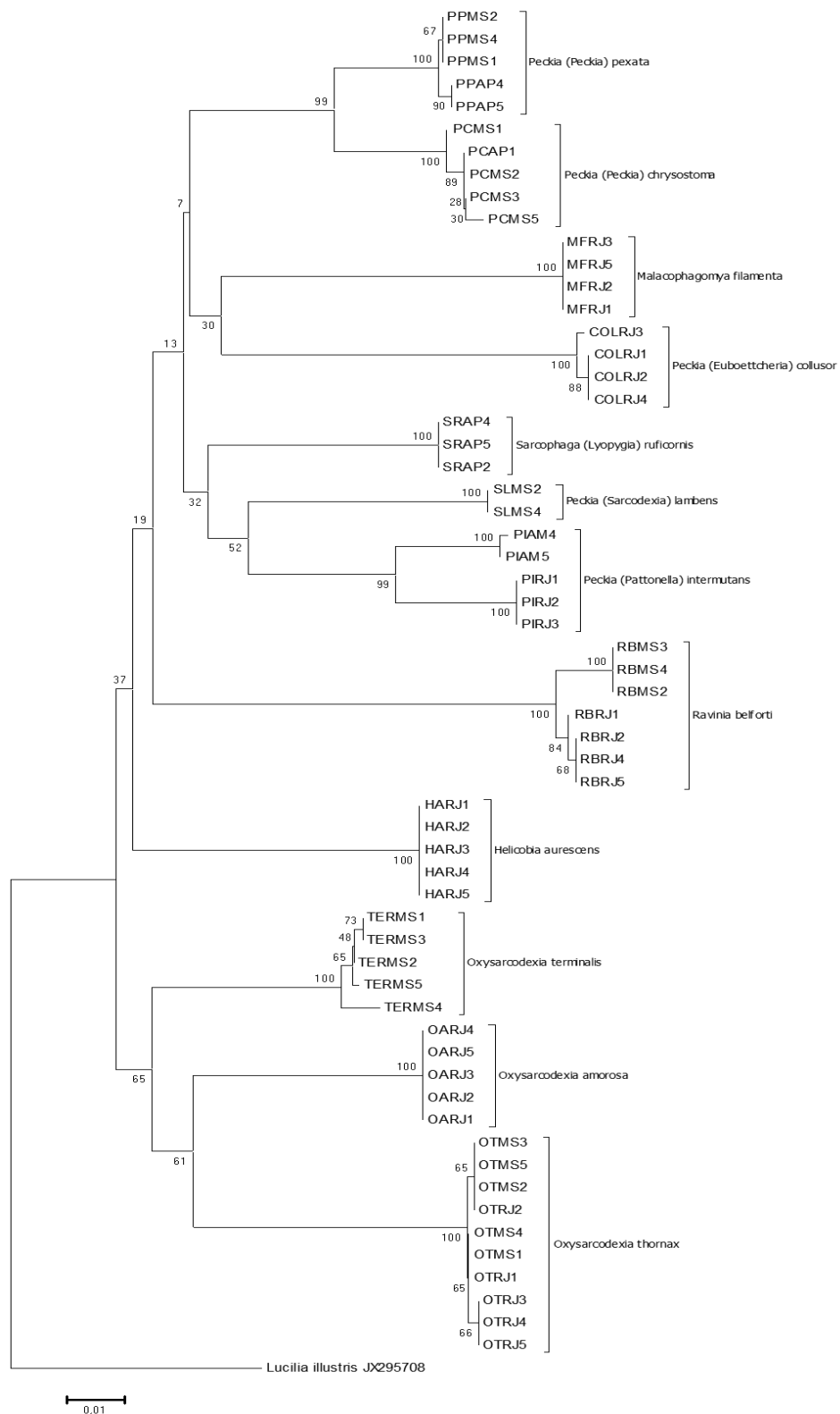


Figura 4.51 – Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de 12 espécies de Sarcophagidae. Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicações testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*.

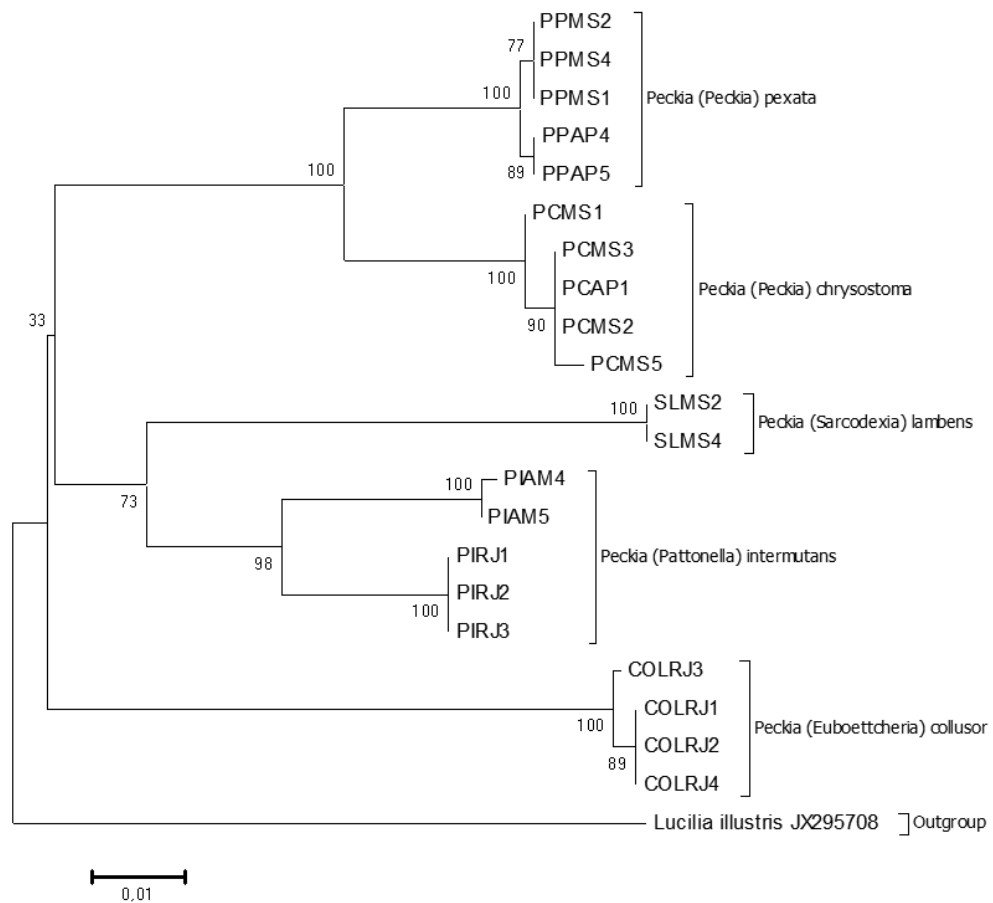


Figura 4.52 - Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de espécies do gênero *Peckia* (Diptera: Sarcophagidae). Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicações testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*.

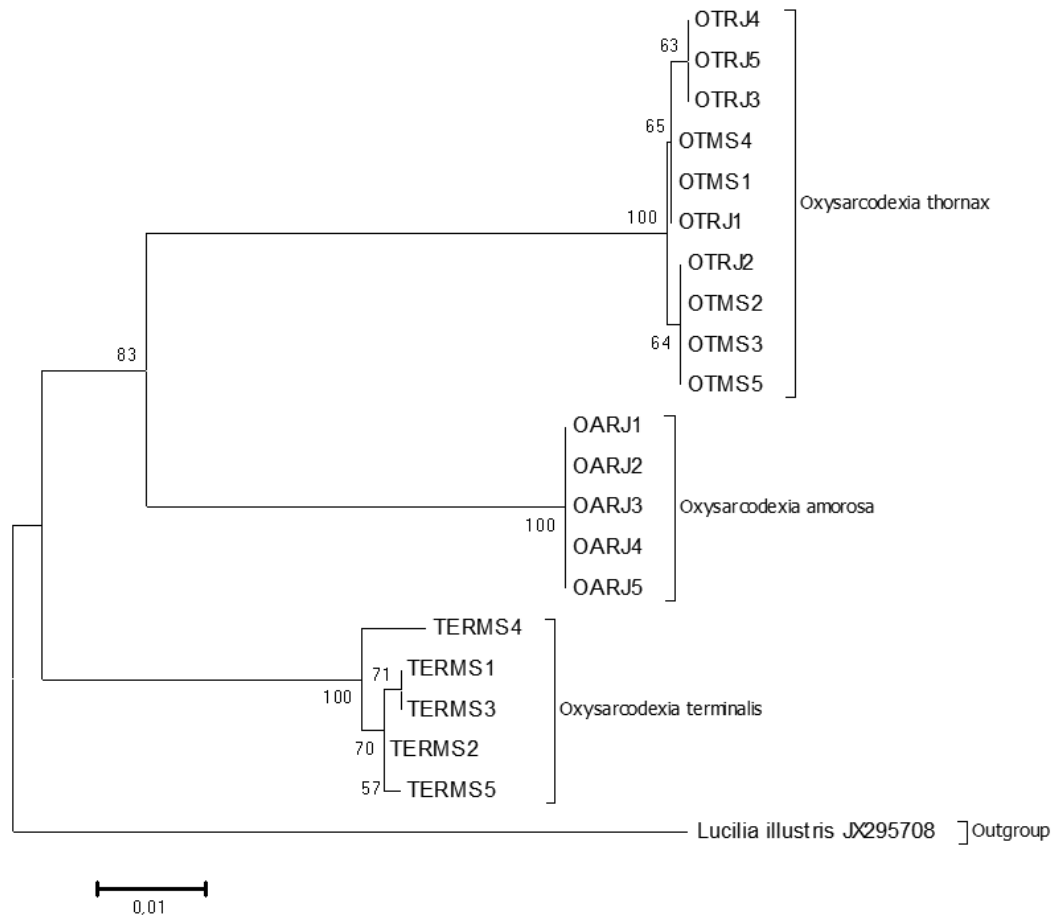


Figura 4.53 - Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de espécies do gênero *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae). Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicações testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*.

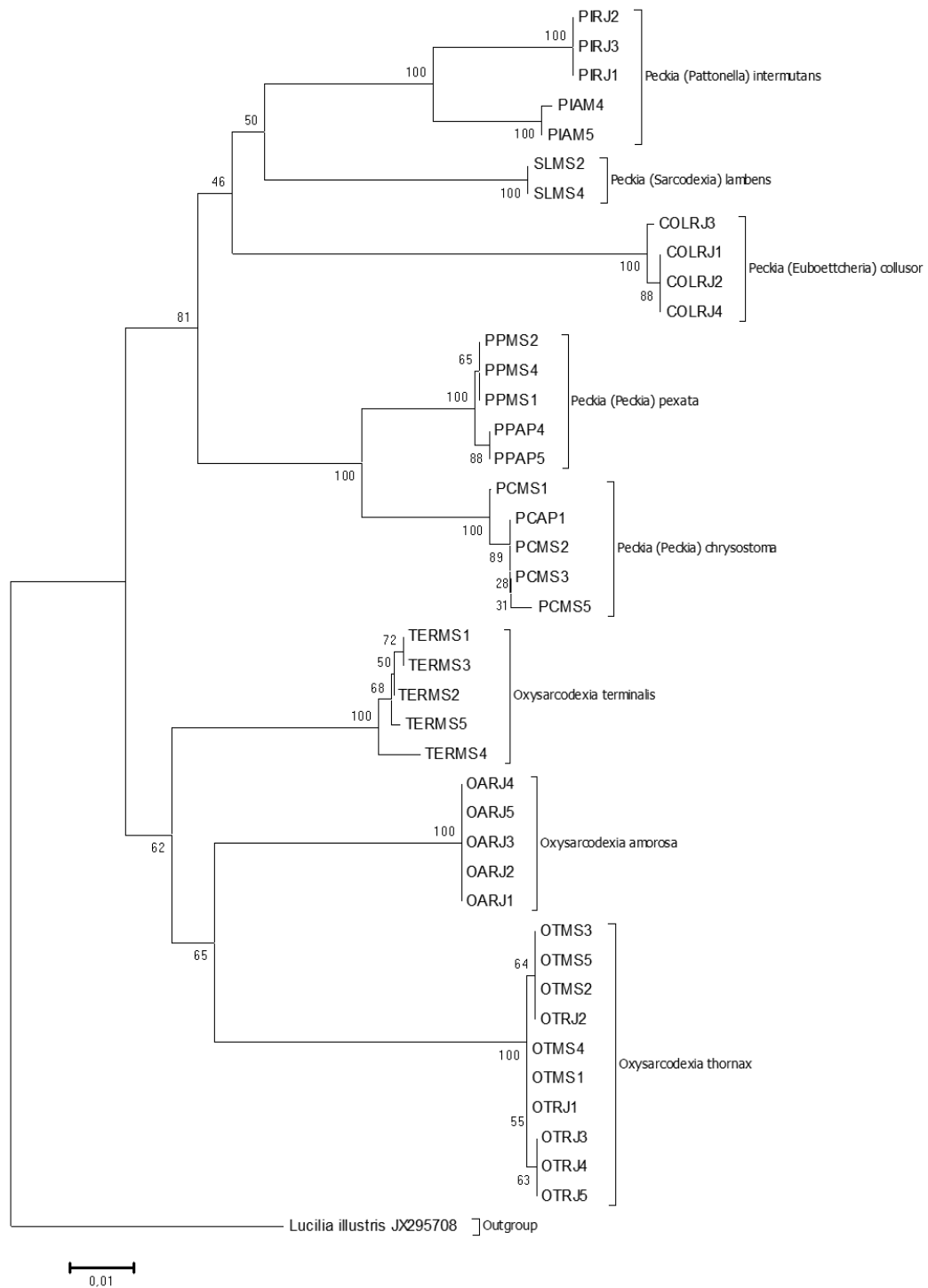


Figura 4.54 – Árvore de *Neighbour-Joining* (NJ) analisada pela distância de Kimura-2-Parâmetros (K2P) para sequências de um fragmento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) de espécies dos gêneros *Peckia* e *Oxysarcodexia* (Diptera: Sarcophagidae). Os números nos ramos principais referem-se às porcentagens de replicação testadas nas 1000 repetições de *bootstrap*.

5. Discussão

5.1. Desenvolvimento pós-embrionário e potencial biótico de *Peckia (Euboettcheria) anguilla* (Diptera: Sarcophagidae) sob condições de laboratório.

O estudo do desenvolvimento pós-embrionário é essencial para que seja possível determinar a idade da larva. Este é um passo importantíssimo para a entomologia forense, pois é a partir destes dados que o IPM poderá ser estimado (Catts e Goff 1992; Amendt et al. 2000; Oliveira-Costa e Mello-Patiu 2004). Kamal (1958) catalogou o tempo de desenvolvimento dos estágios larvais de 13 espécies necrófagas de Calliphoridae e Sarcophagidae sobre condições de laboratório a 27 °C. Este trabalho pioneiro serviu de base para todos os demais estudos relacionados à bionomia de dípteros de importância forense que viriam a seguir.

A bionomia de *Peckia (Squamatodes) trivittata* foi observada por Salviano et al. (1996) e apresentou uma viabilidade larval de 89,82 %, a 27 °C. Madubunyl (1986) obteve uma viabilidade larval de 80,69 %, a 23-28 °C para *Sarcophaga (Bercaea) africa*. Em um estudo sobre biologia de Sarcophagidae, da-Silva-Xavier et al. (2015) obtiveram uma viabilidade larval de 82% para *Peckia (Sarcodexia) lambens* e de 76 % para *Oxysarcodexia amorosa*, ambas mantidas a 27 °C. Com exceção de *O. amorosa*, estes resultados são similares à viabilidade larval de 84% obtida para *P. (E.) anguilla* no presente trabalho.

A duração do período larval de *P. (E.) anguilla* apresentou uma média de 6,61 dias. Este valor pode ser considerado elevado quando comparado com outras espécies da mesma família analisadas a 27 °C, como por exemplo *P. (S.) lambens* e *O. amorosa* (3,51 dias) (da-Silva-Xavier et al. 2015), *P. (S.) trivittata* (4,2 dias) (Salviano et al. 1996), *Sarcophaga (Liopygia) crassipalpis* (2,8 dias) (Levot 1979) e *Peckia (Peckia) chrysostoma* (3,9 dias) (Ferraz 1995). Nassu et al. (2014), analisando o desenvolvimento pós-embrionário de *Microcerella halli*, obtiveram uma média de duração do período larval de 6,5 dias a 25 °C e 6 dias a 30 °C, valores muito semelhantes aos 6,61 dias obtidos para *P. (E.) anguilla* a 27 °C. Interessante notar que Nassu et al. (2014) também analisaram o desenvolvimento de *Sarcophaga*

(*Liopygia ruficornis*, a 25 °C e 30 °C, e obtiveram 4,6 e 4,5 dias, respectivamente. Os resultados de Nassu et al. (2014) estão próximos dos outros estudos de desenvolvimento do gênero *Peckia*, porém diferem dos resultados obtidos para *P. (E.) anguilla*, mostrando que o desenvolvimento pós-embriônico de Sarcophagidae, difere mesmo dentro de um mesmo gênero.

O peso médio de *P. (S.) trivittata* obtido por Salviano et al. (1996) foi de 257 mg para machos e 238 mg para fêmeas. Em relação a *P. (S.) lambens* e *O. amorosa*, da-Silva-Xavier et al. (2015) não observaram valores significativos para distinguir machos de fêmeas pelo peso larval. As larvas que originaram adultos machos de *P. (E.) anguilla* tiveram uma média de peso maior do que as larvas que originaram adultos fêmeas, semelhante ao observado por Salviano et al. (1996).

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.

As larvas com peso abaixo de 22 mg de *P. (S.) lambens* chegaram a empupar, porém não houve a emergência do inseto adulto, o que pode ser considerado como um peso limite para o desenvolvimento do adulto desta espécie. Já em relação à espécie *O. amorosa*, um peso limitante não foi observado, pois adultos emergiram de pupas com peso mínimo de 14 mg (da-Silva-Xavier et al. 2015). No caso de *P. (E.) anguilla*, o menor peso observado ao longo do experimento foi de 57 mg, para uma larva que chegou a iniciar o processo de pupação, mas não houve a emergência do adulto. Isto mostra que as larvas chegavam até a formar o pupário, porém a emergência do adulto não foi completada em nenhuma larva com peso abaixo de 98,3mg.

Hanski (1987) afirmou que determinados dípteros necrófagos estão mais aptos a iniciar o processo de pupação 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* (Diptera: Calliphoridae), cujo peso mínimo crítico de pupas pode alcançar até 12 % do seu peso padrão sem prejudicar a emergência dos adultos. Von Zuben (1993) observou que o resultado da competição larval por alimento de outro díptero muscoide da família Calliphoridae, a espécie *Chrysomya megacephala*, 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. Para *P. (E.) anguilla* esse peso crítico pode ser de aproximadamente 100 mg, o que corroboraria as larvas com peso abaixo de 98mg não completarem a pupação.

Ferraz (1995) obteve uma viabilidade pupal de 69,9 % para *P. (P.) chrysostoma*, semelhante ao valor obtido por da-Silva-Xavier et al. (2015) para *P. (S.) lambens* (65,24 %). A viabilidade pupal de *P. (E.) anguilla* (91,6 %), foi similar as viabilidades pupais obtidas por Salviano et al. (1996) para *P. (S.) trivittata* (92,75 %) e por Madubunyl (1986) para *S. (B.) africa* (89,83 %).

O período pupal médio de *P. (E.) anguilla* corrobora o que foi observado por diversos autores, que afirmam que a duração do período pupal de dípteros da família Sarcophagidae, em temperaturas próximas de 27 °C, varia de 10 a 20 dias (Nishida 1984; Ferraz 1995; da-Silva-Xavier et al. 2015). A duração média de 13,47 dias para *P. (E.) anguilla* é próxima do valor observado por Salviano et al. (1996) para *P. (S.) trivittata* (15,7 dias) e por Nassu et al. (2014) para *S. (L.) ruficornis* (12 dias) e *M. halli* (14 dias).

A duração média do período de neolarva a adulto de *P. (E.) anguilla* foi de 22,62 ± 1,94 dias, com um mínimo de 19 e máximo de 27 dias. Este período foi maior do que o observado por Loureiro et al. (2005) para o tempo de neolarva a adulto de *Peckia (Pattonella) intermutans*, que variou de 17-20 dias, sob as mesmas condições de temperatura e umidade. Ainda dentro do gênero *Peckia*, 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 ± 1,59 dias. A média de tempo de neolarva a adulto obtidos por da-Silva-Xavier et al. (2015) para *P. (S.) lambens* foi de 11,53 dias, com um mínimo de 9 e um máximo de 15 dias. Isto

sugere que o período de desenvolvimento pós-embrionário de *P. (E.) anguilla* seja maior do que o de outras espécies do gênero *Peckia*.

Isto também é observado quando *P. (E.) anguilla* é comparada com outras espécies de Sarcophagidae, como por exemplo *S. (L.) ruficornis*, cujo o tempo total de desenvolvimento pós-embrionário foi de 17,5 dias (Nassu et al. 2014). O tempo total que da-Silva-Xavier et al. (2015) obtiveram para *O. amorosa* foi de 13,6 dias.

A espécie que apresentou um período de neolarva a adulto semelhante ao de *P. (E.) anguilla* foi *M. halli*. Nassu et al. (2014) obtiveram um valor de desenvolvimento total pós-embrionário de 21,8 dias para esta espécie.

Em relação ao tempo médio de longevidade de adultos, as fêmeas de *P. (E.) anguilla* apresentaram maior longevidade que os machos. Esse resultado difere do observado por Salviano et al. (1996) para *P. (S.) trivittata*, cuja longevidade dos machos, a 27 °C, foi maior do que das fêmeas (14,7 dias). A longevidade entre as espécies de Sarcophagidae diferem muito entre si. Sob as mesmas condições de temperatura e umidade do presente experimento, 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. Adicionalmente, da-Silva-Xavier et al. (2015) observaram uma duração de 39,33 dias para fêmeas e 57,33 dias para machos de *P. (S.) lambens* e 83,66 dias para fêmeas e 84 dias para machos de *O. amorosa*. A longevidade de adultos machos e fêmeas de *P. (E.) anguilla* foi, respectivamente, de 34,66 e de 44 dias. Diferente de *P. (E.) anguilla*, todas as espécies citadas obtiveram uma longevidade maior em machos do que em fêmeas. Ferraz (1995) obteve uma longevidade maior de fêmeas de *P. (P.) chrysostoma*, semelhante ao obtido no presente estudo. A maior longevidade de fêmeas observada neste estudo e no estudo de Ferraz (1995) não corroboram a afirmação de Salviano et al. (1996), que justificaram uma menor longevidade de fêmeas em relação a machos, devido ao desgaste pelo desenvolvimento ovariano.

Ao longo do experimento, as fêmeas de *P. (E.) anguilla* depositaram em carne moída em estágio inicial de putrefação um total de 1326 larvas. Valor semelhante ao encontrado por da-Silva-Xavier et al. (2015) para *P. (S.) lambens*, 1433. Estes mesmos autores, obtiveram um valor de 4781 larvas depositadas para *O. amorosa*.

As fêmeas de *O. amorosa* tiveram uma longevidade muito mais elevada do que *P. (E.) anguilla*, o que explicaria a maior quantidade de larvas depositadas.

Contudo, se levarmos em consideração que a longevidade das fêmeas de *P. (E.) anguilla* foi maior que de *P. (S.) lambens*, pode-se dizer que esta última apresenta um maior potencial biótico, visto que mais larvas foram depositadas em menor quantidade de tempo. Isto é corroborado quando se compara a quantidade de dias de larviposição entre *P. (S.) lambens* e *P. (E.) anguilla*. A primeira realizou as posturas de larvas ao longo de 16 dias, enquanto que a segunda depositou suas larvas em carne moída em estágio inicial de putrefação ao longo de um período de 20 dias. Mesmo realizando posturas em uma menor quantidade de dias, o número de larvas por fêmeas de *P. (S.) lambens* foi de 10,17, valor bem mais elevado do que os 3,7 observados para *P. (E.) anguilla*, o que também justifica um potencial biótico mais elevado de *P. (S.) lambens*.

Interessante observar também que tanto *P. (E.) anguilla*, como *P. (S.) lambens* e *O. amorosa* (da-Silva-Xavier et al. 2015) tiveram um intervalo de 7 a 11 dias antes que a primeira larviposição ocorresse, sendo que carne moída em estágio inicial de putrefação foi oferecida às três espécies desde o primeiro dia do experimento. Este intervalo pode evidenciar um período no qual as fêmeas utilizam a proteína presente na carne para maturação ovariana ou amadurecimento sexual.

Os resultados deste estudo ajudam a aumentar o conhecimento sobre a espécie *P. (E.) anguilla*. Esta espécie possui uma potencial importância forense, pois já foi encontrada em experimentos em carcaças de animais e se cria facilmente em substrato animal em decomposição (Barros et al. 2008; Yepes-Gaurisas et al. 2013). Ainda não há relatos na literatura que comprovem a criação de suas larvas diretamente em cadáveres humanos, porém isso não significa que a espécie não colonize cadáveres ou carcaças de animais, apenas que seus hábitos de criação e alimentação ainda não foram totalmente estudados (Vanin et al. 2011). Por ser uma espécie com preferência por regiões rurais e matas fechadas, *P. (E.) anguilla* pode ser um importante indicador de local do crime e movimentação de cadáver, caso venha ser provada sua importância forense (Dias et al. 1984).

5.2. Caracterização morfológica de imaturos de dípteros muscoides através da microscopia eletrônica de varredura

Em relação ao método de preparo das amostras para a análise no microscópio eletrônico de varredura, não foi observada nenhuma diferença significativa na visualização de suas estruturas através dos dois métodos utilizados. Isto corrobora o trabalho de López-Esclapez et al. (2014) que testaram diferentes métodos de fixação de larvas de dípteros muscoides de importância forense. Desta forma, a metodologia de fixação por etanol se torna vantajosa por ser mais econômica, além de mais rápida e menos tóxica.

O alto nível de similaridade morfológica entre os imaturos da família Sarcophagidae dificulta a identificação das espécies. Além disso, existe uma grande escassez de trabalhos referentes à descrição dos estágios imaturos de dípteros de importância médica-veterinária e forense desta família, com trabalhos focados principalmente com Calliphoridae (Erzinçlioglu 1985; Szpila 2010; Mendonça et al. 2010; Mendonça et al. 2014). Trabalhos sobre a caracterização morfológica de sarcófagídeos, além de abastecerem o banco de dados de informações referentes à entomologia médica-veterinária e forense, também fornecem um maior conhecimento sobre os dípteros muscoides de maneira geral.

De acordo com Singh et al. (2012), a caracterização larval de Sarcophagidae pode ser realizada comparando um grupo de características, tais como: o formato e a distribuição dos espinhos do colar cefálico e dos intersegmentos; a configuração do espiráculo anterior, a forma e posição do espiráculo posterior e a distribuição dos tubérculos circunspiraculares.

Mendonça et al. (2013) caracterizaram a morfologia de imaturos de *Peckia (E.) collusor*. As características dos imaturos analisados pelos autores serão comparadas com os imaturos da variação morfológica de *P. (E.) collusor* coletados no presente trabalho.

Diversos estudos forenses têm providenciado informações interessantes sobre a colonização de espécies e a preferência por estágios de decomposição, principalmente em relação ao gênero *Peckia*. As espécies do presente estudo,

Peckia (P.) intermutans, *Peckia (E.) anguilla* e *P. (E.) collusor*, foram coletadas em experimentos forenses que simulavam um cadáver humano, utilizando carcaças de porco por Barros et al. (2008). Estes autores observaram que nenhuma destas espécies foi encontrada durante o estágio fresco de decomposição. Os estágios de preferência destas espécies do gênero *Peckia*, os quais elas foram encontradas com maior abundância, foram os estágios de inchamento e decomposição ativa e avançada. Dentre as três espécies de *Peckia* analisadas aqui, há registros apenas de *P. (P.) intermutans* encontrada em cadáveres humanos tanto no Brasil (Oliveira e Vasconcelos 2010) como na Colômbia (Buenaventura e Pape 2013).

Em relação ao gênero *Ravinia*, a morfologia de seus imaturos ainda é pouco estudada, com literatura escassa (Velásquez et al. 2010). Leite e Lopes (1987) e Lopes e Leite (1987) fizeram notas breves a respeito da morfologia do primeiro e do segundo instar de *Ravinia belforti*, respectivamente. Apesar de serem os primeiros registros relacionados à espécie, esses dados não foram suficientemente detalhados. Os poucos registros a respeito da morfologia e da biologia de *R. belforti* contrastam fortemente com sua presença tanto em carcaças de animais como em cadáveres humanos (Barbosa et al. 2009; Oliveira e Vasconcelos 2010).

Leite e Lopes (1987) também observaram o padrão de espinhos achatados e com pontas que variam de duplas a quádruplas no colar cefálico do primeiro instar de *R. belforti*. O padrão achatado, robusto e com pontas duplas, triplas ou quádruplas dos espinhos torácicos de *R. belforti* difere de outros sarcófagídeos. Mendonça et al. (2013) observaram um padrão de espinhos finos e com pontas simples em *P. (E.) collusor*, diferente do padrão de espinhos observado para a variação morfológica de *P. (E.) collusor* do presente trabalho. Aqui, *P. (E.) collusor* apresentou espinhos filiformes apenas no primeiro instar. Os dois instares seguintes apresentaram espinhos dentiformes, com pontas simples ou duplas. Esse padrão do colar cefálico com espinhos filiforme em L1 e espinhos dentiformes em L2 e L3 com uma ou duas pontas também foi observado para *Peckia (E.) anguilla*. Já a espécie *Peckia (P.) intermutans* apresentou um padrão de espinhos do colar cefálico semelhante ao observado por Mendonça et al. (2013), com o primeiro e segundo instar apresentando espinhos filiformes e L3 com espinhos dentiformes.

Contudo, dentre todas as espécies analisadas, *R. belforti* foi a única a apresentar um padrão único, que facilmente o diferencia do padrão observado para as demais espécies. Leite e Lopes 1987 também observaram um padrão dos espinhos do colar cefálico semelhante ao de *R. belforti* na morfologia dos espinhos de imaturos do gênero *Oxysarcodexia*. Este padrão de espinhos dentiformes com pontas variando de 2 a 4 pode ser uma característica das espécies dos gêneros *Ravinia* e *Oxysarcodexia*, ambos pertencentes à tribo Raviniini. Enquanto espécies do gênero *Peckia* apresentam espinhos dentiformes com pontas simples ou duplas.

Diversos outros grupos de muscoides apresentam diferenças morfológicas entre os espinhos torácicos e os espinhos abdominais (Bonatto e Carvalho 1996; Singh et al. 2012; Mendonça et al. 2014). Todas as quatro espécies analisadas no trabalho apresentaram o padrão clássico de espinhos do segmento torácico orientados para a região posterior. Este padrão se repete ao longo dos espinhos abdominais, porém, a medida que se aproximam do segmento anal, a orientação destes espinhos passa a ser para ambas as regiões, ou seja, orientado para a região anterior e para a região posterior.

Os espinhos intersegmentares foram utilizados para diferenciar espécies de Sarcophagidae do gênero *Sarcophaga* por Aspoas (1991). Segundo o autor, o arranjo dos espinhos pode sofrer modificações durante o desenvolvimento larval em determinadas espécies (mais delgados no primeiro instar e mais achatados no terceiro instar). Estas mudanças também foram observadas em *P. (P.) intermutans*; *P. (E.) anguilla* e *P. (E.) collusor*. Em relação a *R. belforti*, não foram observadas mudanças do arranjo dos espinhos intersegmentares de forma significativa, assim como observado por Sukontason et al. (2003b) para *Sarcophaga (Liosarcophaga) dux*.

O espiráculo anterior está ausente no primeiro instar, mas visível nos demais instares. O segundo instar de *R. belforti* foi descrito inicialmente numa nota de Lopes e Leite (1987), porém os autores não exploraram a morfologia do espiráculo anterior da larva. O número de papilas ou ramificações espiraculares pode apresentar uma variação interespecífica para determinadas espécies de Calliphoridae e para espécies de Sarcophagidae do gênero *Sarcophaga* (Erzinçlioglu 1985; Singh et al. 2012). A espécie *R. belforti* apresentou de 16 a 22 papilas espiraculares, enquanto

P. (E.) anguilla apresentou 14-17 papilas, *P. (P.) intermutans* apresentou 17-35 papilas e a variação morfológica de *P. (E.) collusor* apresentou de 13 a 18 papilas. As duas espécies do subgênero *Euboettcheria* do presente estudo apresentaram um número semelhante de papilas espiraculares, porém o mesmo não foi observado por Mendonça et al. (2013) para *P. (E.) collusor*, que apresentou de 11 a 16 ramificações. Este fato mostra uma diferença em relação ao número das papilas entre a variação morfológica e a espécie *P. (E.) collusor* coletada por Mendonça et al. (2013).

Ainda em relação ao número de papilas do espiráculo anterior, algumas espécies de Sarcophagidae apresentam números baixos de papilas, podendo ser distinguidas facilmente das quatro espécies aqui apresentadas, como por exemplo, *Wohlfahrtia magnifica* (5-6) (Ruiz-Martinez et al. 1989), *Wohlfahrtia opaca* (7-10) (James e Gassner 1948), *Sarcophaga (Liopygia) crassipalpis* (11-12) (Uni et al. 1999) e *Peckia (Sarcodexia) lambens* (11-13). Ishijima (1967) observou um elevado número de papilas em sarcófagídeos do Japão (mais de 20 ramificações espiraculares), como por exemplo, em *Sarcophaga (Liosarcophaga) hapax* (40-44) e *Sarcophaga albiceps* (32-38). A espécie *P. (P.) intermutans* também apresentou um elevado número de ramificações, próximo ao observado para as espécies japonesas.

O número de ramificações de *R. belforti* é semelhante ao encontrado em *Sarcophaga (Liosarcophaga) tibalis* (15-20) (Panós-Nicolás et al. 2015). Porém, além de *R. belforti* apresentar uma morfologia do espiráculo anterior diferente, estas espécies não compartilham da mesma região geográfica. Uma espécie do gênero *Sarcophaga* que compartilha a mesma região geográfica de *R. belforti* é a espécie *Sarcophaga (L.) ruficornis*, porém, esta apresenta de 8 a 12 papilas espiraculares (Singh et al. 2012).

Importante notar que todos os valores máximos de papilas foram encontrados no terceiro instar larval. Esta observação corrobora a afirmação de Erzinçlioglu (1985) de que o número de ramificações espiraculares é maior no terceiro instar larval.

A forma como as ramificações circundam o espiráculo anterior das espécies de Sarcophagidae também podem apresentar importante valor taxonômico (Kano et

al. 1951). As ramificações podem estar dispostas em uma única fileira como, por exemplo, em *S. (L.) dux* (Sukontason et al. 2003b), *S. (L.) ruficornis* (Singh et al. 2012), *P. (S.) lambens* (Vairo et al. 2015c) e *P. (E.) collusor* (Mendonça et al. 2013). Outras espécies da mesma família apresentam as ramificações espiraculares dispostas em múltiplas fileiras ou fileiras irregulares: *S. albiceps* (Kano et al. 1951), *S. (L.) hapax* (Ishijima 1967) e *Sarcophaga (Liopygia) argyrostoma* (Awad et al. 2003). Alguns autores afirmam que essa irregularidade no padrão de ramificações espiraculares é uma característica exclusiva de espécies de Sarcophagidae do velho mundo, não observada em sarcófagídeos da região Neotropical e, nem mesmo, em espécies da família Calliphoridae (Ishijima 1967; Lopes e Leite 1987; Sukontason et al. 2003b; Mendonça et al. 2014). As espécies *R. belforti* e *P. (P.) intermutans* não corroboram a afirmação destes autores, sendo até o momento as únicas espécies Neotropicais com ramificações dispostas em fileiras irregulares.

Em *R. belforti*, esta irregularidade foi mais evidente em larvas L2 (o espiráculo das L3 será discutido mais a frente), enquanto que em *P. (P.) intermutans* esta irregularidade foi observada em larvas L3. Ao analisar os dez exemplares de L3 de *P. (P.) intermutans*, pode ser constatado que quanto maior o número de papilas (com o máximo de 35 papilas observadas) mais irregular era a disposição destas papilas no espiráculo anterior. A variação morfológica de *P. (E.) collusor*, apesar de apresentar um número de papilas maior do que a espécie estudada por Mendonça et al. (2013), apresentou as papilas em uma única fileira regular, da mesma forma que a observada por estes autores. Porém, no presente trabalho, em algumas amostras foi observado que as papilas da variação morfológica não estavam sempre no mesmo nível. Esta característica também foi observada para outras espécies por Lopes e Leite (1987) e Sukontason et al. (2003a) e segundo estes autores, este ligeiro desnível das papilas não implica em uma fileira irregular. A disposição em uma única fileira regular também foi observada para todas as amostras de *P. (E.) anguilla*.

Nas larvas de terceiro instar de *R. belforti*, as ramificações espiraculares apresentam fileiras múltiplas apenas no meio do espiráculo. Esta característica, que dá ao espiráculo um formato de coração, pode ser considerada como um importante caráter taxonômico da espécie. Um padrão semelhante foi observado por Paños-Nicolás et al. (2015) para *S. (L.) tibalis*, mas de uma forma bem menos acentuada

que em *R. belforti*. A forma do espiráculo anterior de *R. belforti* também foi uma característica determinante para diferenciá-la das outras espécies analisadas no presente estudo.

O espiráculo posterior das espécies da família Sarcophagidae além de ser internalizado no segmento anal, está circundado por tubérculos circunspiraculares. O tamanho e a posição destes tubérculos podem ser usados como caráter taxonômico para distinguir espécies (Lopes e Leite 1987; Szpila 2010). O número de tubérculos foi o mesmo observado para outras espécies de Sarcophagidae, em um total de 12 tubérculos dispostos em quatro trios, sendo seis dorsais e seis na região ventral. Lopes e Leite (1987) observaram tubérculos alongados em *Oxysarcodexia paulistanensis*, semelhantes aos observados no segundo e terceiro instar de *R. belforti* e de *P. (P.) intermutans*. Estes tubérculos longos, circundando o espiráculo posterior, diferem daqueles observados tanto para a variação morfológica de *P. (E.) collusor* como para *P. (E.) collusor* analisada por Mendonça et al. (2013) e para *P. (S.) lambens* (Vairo et al. 2015c), os quais apresentaram tubérculos curtos.

O espiráculo posterior das quatro espécies do presente trabalho é composto por duas aberturas espiraculares (em L1 e L2) e três aberturas espiraculares (em L3 e pupário) que, por sua vez, se encontram dentro de um par de peritremas incompletos, bem como observado para diversas espécies de Sarcophagidae, como *S. (L.) ruficornis* (Singh et al. 2012), *S. (L.) dux* (Sukontason et al. 2003b), *P. (E.) collusor* (Mendonça et al. 2013) e *P. (S.) lambens* (Vairo et al. 2015c). Muitos califórídeos também apresentam o peritrema incompleto (Liu e Greenberg 1989; Mendonça et al. 2014), o que não torna esta característica exclusiva dos sarcófagídeos. Porém, diferente de outros dípteros muscoides, a cavidade espiracular das espécies de Sarcophagidae se encontra profundamente internalizada na cavidade anal, distinguindo facilmente suas larvas de larvas de outras famílias de Diptera (Leite e Lopes 1987; Velásquez et al. 2010; Szpila et al. 2015b).

O formato do peritrema e das aberturas espiraculares também são considerados caracteres taxonômicos por diversos autores (Ishijima 1967; Nandi 1980; Velásquez et al. 2010). Porém, Szpila et al. (2015b) afirmam que esta característica apresenta baixa confiabilidade taxonômica devido à uma clara

variação intraespecífica, possivelmente devido a forma de como as larvas foram mortas e fixadas. O peritrema de *R. belforti* não estava totalmente visível em quase nenhuma das amostras observadas. Velásquez et al. (2010) relataram algo semelhante com o terceiro instar de *Ravinia pernix*. Apesar deste fato aparentemente indicar uma possível característica taxonômica do gênero *Ravinia*, é mais provável que isto seja uma condição relacionada à forma que as amostras foram mortas e fixadas, como sugere Szpila et al. (2015b).

Os pupários de dípteros muscoides apresentam fortes semelhanças morfológicas, dificultando a identificação da espécie somente através da morfologia da pupa (Byrd e Castner 2010). Por apresentar a morfologia do pupário semelhante à morfologia do terceiro instar larval, alguns autores sugerem que a chave para a identificação da espécie através da pupa seja o padrão dos espinhos intersegmentares (Erzinçlioglu 1985; Aspoas 1991). Porém, uma das principais características de *R. belforti* (seus espinhos do colar cefálico achatados e com pontas duplas, triplas e quádruplas) não são visíveis no pupário, visto que o segmento cefálico e o primeiro segmento torácico se encontram internalizados na região anterior. Contudo, os espiráculos anteriores ainda estão visíveis. Os espiráculos anteriores de *R. belforti* no pupário mantiveram o padrão característico da espécie, com uma divisão central acentuada, o que pode ser utilizado para diferenciar as pupas desta espécie das demais. Da mesma forma, o espiráculo anterior de *P. (P.) intermutans* também apresentou o padrão de fileiras irregulares e um elevado número de ramificações, bem diferente do número de papilas observado para outras espécies do gênero *Peckia*.

Samerjai et al. (2014) elaboraram chaves de identificação de pupários para algumas espécies do gênero *Sarcophaga*, utilizando como principal característica o padrão do espiráculo posterior. Em diversas amostras das quatro espécies analisadas, a placa espiracular do pupário estava profundamente internalizada, o que dificultava a visualização dos peritremas. Desta forma, a melhor maneira de diferenciar espécies de Sarcophagidae através da morfologia do pupário é pela análise do espiráculo anterior, porém devido a muitas semelhanças entre eles e a sobreposição do número de papilas, é praticamente impossível identificar uma espécie apenas pela análise morfológica do pupário.

Este trabalho caracterizou morfológicamente as espécies *R. belforti*, *P. (P.) intermutans*, *P. (E.) anguilla* e uma variação morfológica de *P. (E.) collusor*. Esta última apresentou diferenças significativas quanto à espécie *P. (E.) collusor* comumente encontrada e coletada no Brasil, tais como: um maior número de papilas do espiráculo anterior e um padrão diferente dos espinhos do colar cefálico. Somado a isto, está o padrão da genitália ligeiramente diferente da variação morfológica. A diferença mais notável está no surstilo. Buenaventura e Pape (2013), ao descreverem a genitália de *P. (E.) collusor*, observaram um surstilo com um tamanho equivalente a 2/3 o tamanho do cerco. Na variação morfológica aqui apresentada, esse tamanho é de no máximo 1/3 o tamanho do cerco. O pregonito e a juxta também apresentaram diferenças. Enquanto Buenaventura e Pape (2013) observaram um pregonito sobreposto à juxta (característica também observado pelo nosso grupo analisando uma espécie de *P. (E.) collusor* de nossa coleção entomológica), a variação morfológica apresentou a juxta separada do pregonito. Contudo, deve ser levada em consideração, nesse caso, a maneira como a genitália foi distendida.

Estas observações descritas acima implicam em pelo menos duas suposições: (1) podem ser a mesma espécie com genitália e imaturos diferentes ou (2) podem ser espécies diferentes com genitália e imaturos semelhantes. Independente das suposições, isto poderia levar a interpretações errôneas de taxonomistas não experientes. A melhor forma de resolver esta questão seria através da comparação das sequências de DNA entre as duas espécies.

As principais características morfológicas resumidas por Singh et al. (2012) e descritas no presente trabalho foram eficientes para uma distinção de *R. belforti* das demais espécies de Sarcophagidae, como por exemplo em relação ao arranjo do espiráculo anterior, o número de ramificações espiraculares e o padrão dos espinhos do colar cefálico. Estas três características são possivelmente as mais importantes para diferenciar estas espécies de Sarcophagidae. Os dados aqui apresentados são importantes, pois facilita a distinção dos imaturos de *R. belforti* de outras espécies, principalmente aquelas que compartilham a mesma distribuição geográfica como, por exemplo, em alguns estados do Brasil.

5.3. Identificação molecular de dípteros muscoides da família Sarcophagidae

Os *primers* LCO 1490-L e HCO 2198-L, descritos por Nelson et al. (2007) que foram modificados a partir dos *primers* desenhados por Folmer et al. (1994) não ofereceram bons resultados para as espécies estudadas nesse trabalho. Baseados nestes *primers*, um novo par de *primers*, chamado de COI-Call F e COI-Call R que amplifica um segmento dentro da mesma região dos *primers* LCO 1490-L e HCO 2198-L, foi desenhado. Estes novos *primers* foram utilizados em estudos prévios por nosso grupo e obtiveram sucesso na amplificação de dípteros de importância médica-veterinária e forense da família Calliphoridae (Mendonça 2014).

Dentre as cinco espécies que não encontraram correspondentes nos bancos de dados, *Ravinia belforti* é a que mais chama atenção. Essa espécie é frequentemente encontrada em carcaças de animais e cadáveres em áreas urbanas, além de ter elevada sinantropia e preferência coprófaga. Soma-se a isto, o fato de a espécie não se criar facilmente em laboratório, o que dificultaria a obtenção de adultos machos para que a identificação morfológica fosse realizada.

Vanin et al. (2011) encontraram pela primeira vez, na Itália, uma espécie de Calliphoridae, *Calliphora loewi*, colonizando um cadáver. Esta espécie, até então, não possuía importância forense e nenhum estudo sobre sua biologia havia sido desenvolvido. Isto exemplifica o fato de que mesmo sem ser encontrada diretamente sobre um cadáver, não quer dizer que a espécie não tenha importância forense. Quanto mais espécies de dípteros classificados como de potencial importância forense (ou seja, que são atraídas por carcaças, mesmo que não haja registro de larvas depositadas sobre a mesma) forem estudados tendo sua biologia, morfologia e sequências de DNA catalogadas, mais rapidamente se poderá estimar o IPM caso seja a primeira vez que tais espécies sejam encontradas sobre um cadáver.

Atualmente, a maior quantidade de sequências de espécies de importância forense existentes em bancos de dados como o *Genbank* e o *BOLD* é do gênero *Sarcophaga*. Porém, mesmo assim ainda é pouco. De acordo com Jordaens et al. (2013), das aproximadamente 800 espécies do gênero, apenas 12 % possuem sequências depositadas nos bancos de dados genéticos. Além disso, estas espécies

são encontradas principalmente no hemisfério norte e na Ásia.

O aumento no número de trabalhos que tenham como objetivo depositar sequências de dípteros muscoides de importância forense em bancos de dados como o *Genbank* e o BOLD é necessário para que possíveis erros na identificação de determinadas espécies sejam corrigidos. Desta forma, apesar do BLAST ser uma rápida maneira de se obter uma ideia geral de qual espécie possa ser, deve se atentar para possíveis sequências depositadas de forma errônea. Isto alerta para que a análise de caracteres morfológicos através da taxonomia clássica não seja deixada de lado, mesmo em estudos relacionados a sequências de DNA (Wells e Stevens 2008).

Através dos caracteres morfológicos analisadas na genitália dos exemplares machos foi possível confirmar que nossas sequências de *Peckia (Peckia) pexata* estavam corretas, apesar de o BLAST acusar 99 % de similaridade com uma sequência depositada da espécie *Peckia (Peckia) uncinata*. Estas espécies, pertencentes ao subgênero *Peckia*, compartilham a mesma região geográfica e apresentam um padrão semelhante da genitália do macho. Se o entomologista forense estiver utilizando o BLAST para identificar a espécie que ele coletou sobre um cadáver e o algoritmo mostrasse 99 % de similaridade com *P. (P.) uncinata*, este profissional iria identificar a espécie erroneamente e caso ela fosse utilizada para calcular o IPM, seriam utilizados dados biológicos da espécie errada, o que poderia levar a estimativa de um IPM errado.

A média da composição nucleotídica do fragmento de 635pb do gene mitocondrial COI das 12 espécies de Sarcophagidae estudadas no presente trabalho (A = 29,6 %, T = 36,9 %, C = 16,9 % e G = 16,6 %) está de acordo com aqueles apresentados para genes mitocondriais de outras espécies da família Sarcophagidae (Meiklejohn et al. 2011; Sharma et al. 2015) e também para outras famílias de dípteros, como Calliphoridae (Nelson et al. 2007).

Em relação ao conteúdo A+T, a média geral encontrada no presente trabalho foi de 66,7 %. Silvestre et al. (2008) ao trabalharem com insetos sociais da ordem Hymenoptera, sugeriram a hipótese de que a maior quantidade de adeninas e timinas na composição nucleotídica destes insetos estaria relacionada ao fato da

DNA polimerase utilizar estas bases de uma forma mais eficiente durante a replicação do DNA mitocondrial. O baixo custo energético para quebrar as ligações A-T durante a replicação e a transcrição do DNAm_t poderia gerar essa maior porcentagem de A+T em organismos que dependem de uma eficiência mitocondrial para manter uma taxa metabólica elevada (Xia 1996).

Song et al. (2008) trabalharam com um fragmento de 552pb da região COI de espécies de Sarcophagidae coletadas na China e encontraram uma média do conteúdo A+T de 68%. Meiklejohn et al. (2011) encontraram o mesmo valor de conteúdo A+T observado no presente trabalho (66,7 %) para um fragmento de 658pb do gene COI para 16 espécies de Sarcophagidae australianos. Zhang e Hewitt (1997) observaram que as regiões de controle mitocondrial de insetos são ricas em adeninas e timinas, com uma média de A+T de 85%. Esta observação pode ser a responsável pela quantidade similar do conteúdo A+T observado em diferentes espécies ao redor do mundo.

O fragmento de 635pb de COI sequenciado para as 12 espécies de Sarcophagidae do presente trabalho apresentou 449 (70,7 %) sítios conservados e 182 (28,6 %) sítios variáveis e informativos para parcimônia (que apresentam variações compartilhadas por pelo menos dois táxons). Sharma et al. (2015) analisaram um fragmento de 465pb de espécies de Sarcophagidae coletados na Índia e observaram 73,5 % de sítios conservados e 26 % de sítios variáveis e informativos para parcimônia. Estes resultados, assim como os resultados observados por Song et al. (2008) são similares ao do presente trabalho. Ao trabalhar com um curto fragmento de 296pb de COI em uma análise de cinco espécies de Sarcophagidae, Bajpai e Tewari (2010) observaram que dos 71 sítios variáveis presentes nas sequências, apenas 26 (8,7 %) eram informativos para parcimônia.

A análise do percentual de variação genética pelo método de distância Kimura-2-parâmetros (K2P) entre as sequências de todos os espécimes fornece uma abordagem quantitativa para avaliar o *DNA barcoding*. De acordo com o conceito de *Barcoding gap*, uma correta identificação da espécie será corroborada pelo *barcoding* quando o percentual de variação genética dentro da mesma espécie

for menor que 3 % e o percentual de variação genética entre espécies diferentes for maior que 3 % (Hebert et al. 2003b).

Os percentuais de variação genética observados para as 12 espécies aqui estudadas encontram-se dentro deste limite, com uma média de 11,1 %, assim como aqueles observados por Meiklejohn et al. (2011) para espécies de Sarcophagidae da Austrália e por Nelson et al. (2007) para espécies de Calliphoridae.

A maioria das espécies estudadas no presente trabalho apresentou uma variação genética intraespecífica próxima de 0 %, independente de terem sido coletadas em diferentes regiões e, conseqüentemente, compõem diferentes populações. A exceção foi observada para as duas populações das espécies *R. belforti* e *Peckia (P.) intermutans*. As populações morfológicamente idênticas de RBRJ e RBMS apresentaram uma distância genética intraespecífica de 1,3 %, enquanto as populações morfológicamente idênticas de PIRJ e PIAM apresentaram uma distância intraespecífica de 3,2 %. Amorim et al. (2014) também observaram um percentual maior que 0 % de distância genética intraespecíficas para diferentes populações de *P. (P.) intermutans*, variando de 0,3 até 1,5%. Estas populações foram coletadas em diferentes cidades de São Paulo (Campinas, Mogi-Guaçu, Jundiaí e Ubatuba) e em Salvador, na Bahia. Esses valores ainda estão dentro do conceito de *Barcoding gap* e também já foram observados por outros autores que trabalharam com espécies de Sarcophagidae do gênero *Sarcophaga* (Meiklejohn et al. 2011; Guo et al. 2012; Nakano e Honda 2015; Sharma et al. 2015).

Em relação à variação interespecífica, o sequenciamento do fragmento de 635pb do gene COI se mostrou satisfatório por separar de forma convincente todas as 12 espécies aqui estudadas. A variação interespecífica foi de 4,3 a 15,2 % e, portanto, dentro do limite do *barcoding gap*. Não houve sobreposições dos valores da variação interespecífica com os valores de variações intraespecíficas. A variação interespecífica mais baixa, observada entre *P. (P.) pexata* e *Peckia (P.) chrysostoma*, foi de 4,3 %. Rolo et al. (2013) encontraram um valor de 3,9 % de variação interespecífica para as espécies *Calliphora vicina* e *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae), enquanto que Meiklejohn et al. (2011) observaram um valor de 2,9% de variação interespecífica para duas espécies do gênero *Sarcophaga*, *S. megafilosia* e *S. meiofilosia*. Estes autores sugerem que

essa baixa variação interespecífica possa ser explicada por uma divergência recente entre as espécies. Além disso, Sharma et al. (2015) enfatizam que a variação entre espécies do mesmo gênero é menor do que a variação entre espécies de gêneros diferentes, o que explicaria a variação de 4 % entre as duas espécies do subgênero *Peckia*. Em nosso trabalho isto foi observado também para as espécies do gênero *Oxysarcodexia*, que apresentaram de 8 a 9 % de variação interespecífica.

O fragmento de 635pb do gene COI foi sequenciado com sucesso para os 60 espécimes que foram corretamente atribuídos a 12 espécies agrupadas em uma árvore de distância construída pelo método de *Neighbour-Joining* (NJ). Os baixos valores de *bootstrap* nos ramos mais afastados mostram a ineficiência do COI para inferir filogenia. Diversos autores observaram valores igualmente baixos de *bootstrap* nestes ramos em suas árvores de NJ (Nelson et al. 2007; Preativatanyou et al. 2010; Meiklejohn et al. 2011; Sharma et al. 2015). Porém, os elevados valores de *bootstrap* nos ramos terminais, com porcentagens robustas de até 100 % suportam a eficiência do COI em identificar espécies.

O *DNA barcoding* não possui como objetivo a resolução de relações filogenéticas através da utilização do COI como marcador molecular (Herbert et al. 2003a). Análises filogenéticas podem ser realizadas com outros marcadores moleculares para a detecção de grupos monofiléticos e consequente delimitação das espécies, tais como ND5, CAD e ITS2 (Nelson et al. 2007; Kutty et al. 2010). Stevens et al. (2002), por exemplo, observaram que espécies de califórídeos do gênero *Lucillia* eram parafiléticas utilizando o gene mitocondrial COI, mas ao serem analisados com um gene RNA ribossomal 28S se mostraram monofiléticas.

As análises com o método de NJ e medida de distância K2P correspondem às práticas mais frequentemente utilizadas nos estudos com *DNA barcoding* relacionados à identificação taxonômica (Hebert et al. 2003a). De acordo com Meiklejohn et al. (2011), este método é mais efetivo para determinar espécies em estudos de *barcoding* quando a divergência entre as sequências é baixa. Para uma maior precisão em estudos filogenéticos, métodos de parcimônia e verossimilhança possuem um melhor desempenho (Nelson et al. 2007). Mesmo que o gene mitocondrial COI não seja o melhor marcador molecular para resolver relações filogenéticas, o fato dele ser capaz de discriminar corretamente indivíduos ao nível

de espécie torna a técnica de *DNA barcoding* importantíssima para a entomologia forense.

No presente trabalho, a análise de um fragmento de 635pb do COI foi capaz de identificar as 12 espécies estudadas, independente de sua origem populacional, o que corrobora a forte conservação do gene ao longo dos *taxa* (Hebert et al. 2003a; Hajibabaei et al. 2007). Estudos de dispersão mostram que muitas espécies de moscas necrófagas da família Calliphoridae são capazes de se deslocar por centenas de quilômetros em apenas um dia (Norris 1965; Baumgartner e Greenberg 1984). Esta característica dificulta os estudos sobre isolamento genético por distância para estes insetos. Mesmo assim, o conhecimento sobre as diferenças faunísticas entre regiões geográficas e climáticas é importante. Rolo et al. (2013) afirmaram que estes insetos podem ser influenciados por características ambientais e podem exibir diferenças nas características genéticas. Esta variação geográfica fenotípica, que provavelmente estaria associada a uma variação genotípica, seria útil para separar insetos locais de insetos “não-locais” em uma cena de crime, o que poderia implicar numa possível movimentação do cadáver (Wells e Stevens 2008).

Banco de dados como o BOLD e o *Genbank* ainda precisam ser abastecidos para muitas espécies de importância forense e que possuem distribuição geográfica no Brasil, principalmente para espécies da família Sarcophagidae. Além disso, a taxonomia clássica permanece de extrema importância e sempre servirá como base para que uma sequência de determinada espécie seja depositada adequadamente (Stoeckle 2003; Hebert e Gregory 2005; Padial e de-La-Riva 2007; Pires e Marinoni 2010).

6. Considerações Finais

Apesar dos 108 anos do estudo da entomologia forense no Brasil, ainda há muita informação que precisa ser obtida a respeito dos dípteros necrófagos da região Neotropical, principalmente devido a grande diversidade de espécies. Por mais que um futuro no qual técnicas moleculares que facilitarão e agilizarão a identificação taxonômica das espécies esteja cada vez mais próximo, o conhecimento sobre a ecologia, a biologia e a preferência alimentar destes insetos ainda é fundamental. E sempre será.

A biologia molecular ainda não é capaz de informar com total certeza as preferências alimentares, geográficas e ecológicas dos dípteros necrófagos. O sequenciamento do fragmento de determinado gene, seja ele mitocondrial ou nuclear, não dará informações a respeito da idade dos imaturos coletados em um cadáver. Além disso, ela deve limitar-se a grupos bem revisados e com uma taxonomia bem estabelecida, para evitar erros no diagnóstico da espécie.

O estudo da caracterização morfológica ainda é importante para a ciência. Técnicas como o *DNA barcoding* não podem e não devem reduzir o conhecimento científico. Pelo contrário, tanto o *DNA barcoding* como outras técnicas moleculares capazes de delinear espécies, revelar espécies crípticas e reorganizar a filogenia de diversos grupos, poderão influenciar uma grande quantidade de pesquisadores a estudar as características biológicas, ecológicas e morfológicas destas espécies.

Desta forma, é necessário um banco de dados cada vez mais informativo. Imaturos coletados em um cadáver, durante uma investigação criminal, poderão ser submetidos a análises moleculares. As sequências obtidas destes imaturos serão comparadas com sequências disponibilizadas em bancos de dados, como o BOLD e o *Genbank*. Isto poderá dizer qual espécie foi coletada e a partir desta informação, junto com dados coletados sobre a região, o clima e a temperatura na qual estes insetos foram coletados, estudos sobre a biologia da espécie deverão ser obtidos e aplicados para o caso em questão. A falta de qualquer uma destas informações dificultaria ou, até mesmo, impossibilitaria o cálculo de estimativa do IPM.

Paralelamente a uma análise molecular a respeito dos imaturos coletados em uma cena de crime, deveria ser feita uma análise morfológica conjunta. Principalmente com um padrão estabelecido para as características morfológicas observadas nestes imaturos. Esta outra análise poderia ou corroborar os resultados obtidos através do sequenciamento de DNA ou ajudar na identificação da espécie, caso a sequência de DNA não encontre um correspondente no banco de dados.

Quanto mais informações forem obtidas e mais sequências forem depositadas nos bancos de dados, menos erros serão encontrados no mesmo e a precisão na identificação da espécie aumentará. Quanto mais sólidas forem as informações de diversas espécies de importância médica-veterinária e forense, mais robusta será a utilização da entomologia forense como uma ferramenta para auxiliar peritos em uma investigação criminal, onde métodos tradicionais não possam mais ser aplicados.

7. Conclusões

Foi possível a criação de *P. (E.) anguilla* em laboratório a 27 °C e com uma dieta de solução açucarada e carne moída em estágio inicial de putrefação, fato importante, visto a dificuldade de criação em laboratório de determinadas espécies.

Apesar das diferenças observadas na genitália dos machos e nas estruturas dos imaturos, somente após análise genotípica seria possível afirmar se a variação morfológica de *P. (E.) collusor* é outra espécie ou não.

Este trabalho apresenta pela primeira vez a observação de papilas espiraculares dispostas em fileiras irregulares em espécies de Sarcophagidae da região Neotropical.

O padrão de espinhos do colar cefálico, o espiráculo anterior, o espiráculo posterior e os tubérculos circunspiraculares são estruturas fundamentais para serem analisadas com o objetivo de diferenciar espécies de Sarcophagidae através de imaturos.

Dentre as espécies estudadas no recente trabalho, as espécies *R. belforti*, *H. aurescens*, *O. terminalis*, *O. amorosa* e *M. filamenta* terão suas sequências depositadas pela primeira vez no BOLD.

As espécies *R. belforti* e *O. amorosa* possuem importância forense e sequências submetidas ao BOLD facilitarão a identificação destas espécies caso imaturos ou fragmentos de insetos sejam encontrados em uma cena de crime.

O gene mitocondrial COI é um marcador molecular eficiente para a identificação de espécies de Sarcophagidae, porém não é um substituto à taxonomia clássica.

Não foi encontrada uma variação genotípica evidente entre as populações coletadas em diferentes estados do Brasil para as espécies *P. (P.) pexata*, *P. (P.) chrysostoma*, *O. thornax* e *R. belforti*.

8. Referências bibliográficas

- Alacs EA, Georges A, Fitz-Simmons NN, Robertson J. DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *For Sci Med Pathol* 2010. 6: 180-194.
- Alencar APP, Leite ACR. Ultrastructure of the egg of *Muscina stabulans* and *Synthesiomya nudiseta* (Diptera: Muscidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992. 87: 463-466.
- Alves ACF, Santos WE, Creão-Duarte AJ. Diptera (Insecta) de importância forense da Região Neotropical. *Entomotropica* 2014. 29: 77-94.
- Amendt J, Krettek R, Niess C, Zehner R., Bratzke H. Forensic entomology in Germany. *For Sci Int* 2000. 113: 309-314.
- Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Hall MJ. Best practice in forensic entomology – standards and guidelines. *Int J Legal Med* 2007. 121: 90-104.
- Amorim DS, Silva VC, Balbi MIPA. Estado do conhecimento dos Diptera neotropicais In: Costa C, Vanin SA, Lobo JM, Melic A (Eds). *Proyectode Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática PRIBES. M3m Monografias Tercer Milênio*, vol. 2. Sociedad Entomológica Aragonesa (SEA) e Cytel, Zaragoza 2002.
- Amorim DS, Yeates DK. Pesky gnats: ridding dipteran classification of the nematocera. *Studia Dipterol* 2006. 13: 3-9.
- Amorim JA, Souza CM, Thyssen PJ. Molecular Characterization of *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans* (Walker, 1861) (Diptera: Sarcophagidae) based on the Partial Sequences of the Mitochondrial Cytochrome Oxidase I Gene. *J Forensic Res* 2007. 5: 227-232.
- Anderson GS. Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bear cubs. *J Forensic Sci* 1999. 44: 856-859.
- Aspoas BR. Comparative micromorphology of third instar larvae and the breeding biology of some Afrotropical *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *Med Vet Entomol* 1991. 5: 437–445.

Awad A, Abdel-Salam S, El-Ela RA, Abdel-Aal AA, Mohamed D. Ultrastructure comparison of the sensory morphology of the first- and third-instar larvae of *Parasarcophaga argyrostoma* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Sarcophagidae). Egypt J Biol 2003. 5: 148-154.

Bajpai N, Tewari RR. Mitochondrial DNA sequence-based phylogenetic relationship among flesh flies of the genus *Sarcophaga* (Sarcophagidae: Diptera). J Genet 2010. 89: 51-54.

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.

Barrett RDH, Hebert PD. Identifying spiders through DNA barcodes. Can J Zool 2005. 83: 481-491

Barros RM, Mello-Patiu CA, Pujol-Luz JR. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) 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.

Baumgartner DL, Greenberg B. The genus *Chrysomya* in the New World. J Med Entomol 1984. 21: 105-113.

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

Benecke M, Lessing R. Child neglect and forensic entomology. Forensic Entomol 2001. 120: 155-159.

Benecke M. Six forensic entomology cases: description and commentary. J Forensic Sci 1998. 43: 797-805.

Benecke M. A brief history of forensic entomology. Forensic Science International 2001. 120: 2-14.

- Bonacci T, Vercillo V, Brandmayr P, Fonti A, Tersaruolo C, Zetto Brandmayr T. A case of *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera, Calliphoridae) breeding in a human corpse in Calabria (southern Italy). *Leg Med* 2009. 11: 30-2.
- Bonato SR, Carvalho CJB. Análise morfológica das formas imaturas de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae). *Rev Bra Zool* 1996. 13: 707-726.
- Braga MV, Pinto ZT, Queiroz MMC, Matsumoto N, Blomquist GJ. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: puparial cases from Sarcophagidae. *Acta Trop* 2013. 128: 479-485.
- Brown B, Borkent A, Cumming JM, Wood DM, Woodley NE, Zumbado MA. *Manual of Central American Diptera*. Ottawa, NRC Research Press 2009.
- Brown BV. Malaise trap catches and the crisis in Neotropical dipterology. *Am Entomol* 2005. 51: 180-183.
- Buenaventura E, Pape T. Revision of the New World genus *Peckia* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae). *Zootaxa* 2013. 3622(1):1.
- Byrd JH, Castner JL. *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*. 2nd Ed. CRC Press 2010.
- Campobasso CP, Introna F. The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. *Forensic Sci Int* 2001. 120: 132-9.
- Campobasso PC, Vella GD, Introna F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *For Sci Int* 2001. 120: 18-27.
- Campobasso PC, 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 JBC, Mello-Patiu CA. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev Bras Entomol* 2008. 52: 390-406.

Carvalho JBC, Rafael JA, Couri MS, Silva VC. Diptera. In: Rafael JA, Melo GAR, Carvalho CJB, Casari AS, Constantino R (Eds). Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia. Holos Editora 2012.

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

Caterino, MS, Cho, S, Sperling FAH. The current state of insect molecular systematic: a thriving tower of Babel. Annu Rev Entomol 2000. 45: 1-54.

Catts EP, Goff ML. Forensic Entomology in criminal investigation. Annu Rev Entomol 1992. 37: 253-272.

Cherix D, Wyss C, Pape T. Occurrences of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) on human cadavers in Switzerland, and their importance as forensic indicators. Forensic Sci Int 2012. 220: 158–163.

Courtney GW, Sinclair BJ, Meier R. Morphology and terminology of Diptera larvae. In: Papp L, Darvas B, (Eds.). Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera (with special reference to flies of economic importance) Science Herald Press, Budapest 2000.

d'Almeida JM, Mello RP. Comportamento de dípteros muscóides frente a substratos de oviposição em laboratório, no Rio de Janeiro, RJ. Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996. 91: 137-138.

d'Almeida JM, Salviano RJB. Feeding preference of the larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and *Ravinia belforti* (Prado e Fonseca) (Diptera: Sarcophagidae) concerning different diets. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996. 91: 137-138.

d'Almeida JM. Reproductive behavior of *Ravinia belforti* (Prado e Fonseca, 1932) (Diptera: Sarcophagidae) females reared, in isolation, in the laboratory at Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Mem Inst Oswaldo 1996. 91: 239-240.

Dahlem GA. Order Diptera, Sarcophagidae (Oestroidea). in: Stehr FW (Ed.). Immature Insects, Vol.2. Kendal/Hunt Publishing Company, Dubuque 1991.

da-Silva-Xavier A, Barbosa RR, Barbosa CG, Queiroz MMC. Bionomy of two flies of sanitary and forensic importance: *Peckia (Sarcodexia) lambens* (Wiedemann) and *Oxysarcodexia amorosa* (Schiner) (Diptera, Sarcophagidae). Rev Bras Entomol 2015. 59: 229-233.

Dias ES, Neves DP, Lopes HS. Estudos sobre a fauna de Sarcophagidae (Diptera) de Belo Horizonte, Minas Gerais. III - Atratividade das iscas. Mem Inst Oswaldo Cruz 1984. 79: 413-417.

Duman M, Guz N, Sertkaya E. DNA barcoding of sunn pest adult parasitoids using cytochrome c oxidase subunit I (COI). Biochem Syst Ecol 2015. 59 70–77.

Dunn CP. Keeping taxonomy based in morphology. Trends Ecol Evol 2003. 18: 270-271.

Erzinçlioglu YZ. Immature stages of British *Calliphora* and *Cynomya*, with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). J Nat Hist 1985. 19: 69-96.

Ferraz MV. Larval and pupal periods of *Peckia chrysostoma* and *Adiscochaeta ingens* (Diptera: Sarcophagidae) reared under laboratory conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1995. 90: 611-614.

Ferreira S, Oliveira AR, Farinha A, Rebelo MT, Dias D. Forensic entomology: Nuclear and mitochondrial markers for Diptera and Coleoptera identification. For Sci Int 2011. 3:174-175.

Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol Mar Biol Biotech 1994. 3: 294-299.

Freire O. Fauna cadavérica brasileira. Rev Med 1923 3-4: 15-40.

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

Goff ML. Estimation of postmortem interval using arthropod development and successional patterns. Forensic Sci Rev 1993. 5: 81-94.

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. Flies and Diseases. Vol. I: Ecology, Classification and Biotic Associations. Princeton Uni Press, Princeton 1973.

Guimarães JH, Papavaro N. Myiasis in man and animals in the Neotropical Region. Ed Plêiade, Curitiba 1999.

Guo YD, Cai JF, Meng FM, Chang YF, Gu Y, et al. Identification of forensically important flesh flies based on a shorter fragment of the cytochrome oxidase subunit I gene in China. Med Vet Entomol 2012. 26: 307-313.

Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PD, Hickey DA. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends in Genetics 2007. 23: 167-172.

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

Hayat MA. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. Van Nostrand Reinhold Company, New York 1970.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. Biological identifications through DNA barcodes. Proc Biol Sci 2003a. 270: 313-321.

Hebert PD, Ratnasingham S, de Waard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proc Biol Sci 2003b. 7:96-9.

Hebert PD, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM. Identification of Birds through DNA Barcodes. PLoS Biology 2004a. 2: 312-318.

- Hebert PD, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. Proc Natl Acad Sci USA 2004b. 101: 14812-14817.
- Hebert PD, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Syst Biol 2005. 54: 852-9.
- Introna, F., Campobasso, C.P., Di Fazio, A., 1998. Three case studies in forensic entomology from southern Italy. J Forensic Sci. 43, 210-214.
- Ishijima H. Revision of the third stage larvae of synanthropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae). Jpn J Sanit Zool 1967. 18: 47-100.
- James MT, Gassner FX. The immature stages of the fox maggot, *Wohlfartia opaca* (Coq.). J. Parasitol 1948. 33: 241-244.
- Jordaens K, Sonet G, Richet R, Dupont E, Braet Y, et al. Identification of forensically important Sarcophaga species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene. Int J Legal Med 2013. 127: 491-504.
- Kamal AS. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera). Ann Entomol Soc Am 1958. 51: 261-70.
- Kano R, Sato K, Tange H. Notes on the flies of medical importance in Japan. Part 2. The larvae of *Sarcophaga* known in Japan. Jpn J Exp Med 1951. 20: 115-131.
- Kather R, Martin SJ. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. Physiol Entomol 2012. 37: 25–32.
- Keh B. Scope and applications of forensic entomology. Annu Rev Entomol 1985. 30: 137-154.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc Natl Acad Sci USA 2005. 102: 8369-8374.
- Kurtzman CP. Molecular taxonomy of the yeasts. Yeast 1994. 10:1727-1740.

Kutty SN, Pape T, Wiegmann BM, Meier R. Molecular phylogeny of the Calyptratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine's fly. *Syst Entomol* 2010. 35: 614-635.

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* 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 of the 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* 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. Third contribution to the knowledge of the Raviniini (Diptera, Sarcophagidae), based on observations of the larvae, using scanning electron microscope. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987. 82: 407-413.

López-Esclapez R, García MD, Arnaldos MI, Presa JJ, Ubero-Pascal N. Are the evidences of forensic entomology preserved in ethanol suitable for SEM studies? *Micron* 2014. 62: 43-51.

Lord WD, Burger JF. Collection and preservation of forensically important entomological materials. *J Forensic Sci* 1983. 28: 936-944.

Lord WD, Stevenson JR. Directory of forensic entomologists. 2 ed. Misc Publ Armed Forces Pest Mgt. Board, Washington 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. Ottawa, Research Branch, Agriculture Canada 1981.

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

Meiklejohn KA, Wallman JF, Dowton M. DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). Int J Leg Med 2011. 125: 27-32.

Mendonça PM. Estudo comparativo de imaturos de dípteros muscoides de importância médica-veterinária e forense com bases em caracteres morfológicos e moleculares. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) UFRRJ. Rio de Janeiro 2014.

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.

Mendonça PM, Barbosa RR, Cortinhas LB, Santos-Mallet JR, Queiroz MMC. Ultrastructure of Immature Stages of *Peckia (Euboetcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae). Acta Trop 2013. 128: 522-527.

Mendonça PM, Barbosa RR, Cortinhas LB, Santos-Mallet JR, Queiroz MMC. Ultrastructure of immature stages of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae), a fly of medical and veterinary importance. Parasitol Res 2014. 113: 3675-3683.

Moraes DFC, Still DW, Lum MR, Hirsch AM. DNA-Based Authentication of Botanicals and Plant-Derived Dietary Supplements: Where Have We Been and Where Are We Going? *Planta Med* 2015. 81: 687-95.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986. 1: 263-73.

Nakano A, Honda J. Use of DNA sequences to identify forensically important fly species and their distribution in the coastal region of Central California. *Forensic Sci Int* 2015. 253: 1-13.

Nandi BC. Studies on the larvae of flesh flies from India (Diptera: Sarcophagidae) *Orient Insects* 1980. 14: 303-323.

Nassu MP, Thyssen PJ, Linhares AX. Developmental rate of immature of two fly species of forensic importance: *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* and *Microcerella halli* (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitol Res* 2014. 113: 217-222.

Nelson LA, Wallman JF, Downton M. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Med Vet Entomol* 2007. 21: 44-52.

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

Norris KR. The bionomics of blowflies. *Annu Rev Entomol* 1965. 10: 47-68.

Oliveira TC, Vasconcelos SD. Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil and its implications for forensic entomology. *For Sci Int* 2010. 198: 97-102.

Oliveira VC, Mello RP, d' Almeida JM. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico, Brasil. *Rev Saúde Publica* 2002. 36: 614-620.

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.

Oliveira-Costa J, Mello-Patiu CA. Application of forensic entomology to estimate of the postmortem interval (PMI) in homicide investigations by the Rio de Janeiro Police Department in Brazil. *Forensic Med Toxicol* 2004. 5: 40-44.

Otranto D, Stevens JR. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int J Parasitol* 2002. 32: 1345-1360.

Padial JM, de la Riva I. Integrative taxonomist should use and produce DNA barcodes. *Zootaxa* 2007. 1586: 67-68.

Paños-Nicolás A, Arnaldos MI, García MD, Ubero-Pascal N. *Sarcophaga (Liosarcophaga) tibialis* Macquart 1851 (Diptera: Sarcophagidae): micromorphology of preimaginal stages of a fly of medical and veterinary interest. *Parasitol Res* 2015. 114-118.

Pape T, Blagoderov V, Mostovski MB. Order Diptera Linnaeus, 1758. In: Zhang Z-Q. (Ed) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa* 2011. 3148: 222-229.

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

Pape T; Thompson, FC. (eds). *Systema Dipteroorum*, Version 1.5 2013. <http://www.diptera.org/>, acessado em 12/03/2016.

Pires AC, Marioni L. União entre DNA barcoding e taxonomia tradicional através da Taxonomia Integrativa: Uma visão que contesta o debate questionando uma ou outra metodologia. *Biota Neotrop* 2010.

Preativatanyou K, Sirisup N, Payungporn S, Poovorawan Y, Thavara U, Siriyasatien. Mitochondrial DNA-based identification of some forensically important blowflies in Thailand. *For Sci Int* 2010. 202: 97-101.

Pujol-Luz JR, Francez PAC, Ururahy-Rodrigues A, Constantino R. The Black Soldier-fly, *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae), Used to Estimate the Postmortem Interval in a Case in Amapá State, Brazil. *J Forensic Sci* 2006. 53: 476-478.

Pujol-Luz JR, Arantes LC, Constantino R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). *Rev Bras Entomol* 2008. 52: 485-492.

Rafael JA, Aguiar PA, Amorim DS. Knowledge of insect diversity in Brazil: challenges and advances. *Neotropical Entomology* 2009. 565-570.

Ratnasingham S, Hebert PD. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Mol Eco Notes* 2007. 7: 355-364.

Rodriguez WC, Bass WM. Insect activity and its relationship to decay rates of human cadavers in East Tennessee. *J Forensic Sci* 1983. 28: 423-432.

Rolo EA, Oliveira AR, Dourado C, Farinha A, Rebelo MT, Dias Deodália. Identification of sarcosaprophagous Diptera species through DNA barcoding in wildlife forensics. *For Sci Int* 2013. 228: 160-164.

Rosa TA, Babata MLY, Souza CM, Sousa D, Mello-Patiu CA, Vaz-de-Mello FZ, Mendes J. Arthropods associated with pig carrion in two vegetation profiles of Cerrado in the State of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Entomol* 2011. 55: 424-434.

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.

Saigusa K, Takamiya M, Aoki Y. Species identification of forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Legal Med* 2005. 7: 175-178.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987. 4: 406-425.

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.

Samerjai C, Sanit S, Sukontason K, Klong-klaew T, Kurahashi H, Tomberlin JK, Morakote N, Wannasan A, Sukontason KL. Morphology of puparia of flesh flies in Thailand. *Trop Biomed* 2014. 31: 351-361.

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

- Sharma M, Singh D, Sharma AK. Mitochondrial DNA based identification of forensically important Indian flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Forensic Sci Int* 2015. 247: 1-6.
- Shewell GE. Sarcophagidae. In: McAlpine JF (ed.). *Manual of Nearctic Diptera*. Agriculture Canada 1987.
- Silvestre D, Dowton M, Arias MC The mitochondrial genome of the stingless bee *Melipona bicolor* (Hymenoptera, Apidae, Meliopinini); sequence, gene organization and a unique tRNA translocation event conserved across the tribe Meliponini. *Genet Mol Biol* 2008. 31: 451-460.
- Singh D, Garg R, Wadhawan B. Ultramorphological characteristics of immature stages of a forensically important fly *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius) (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitol Res* 2012. 110: 821-831.
- Slansky, F, Scriber, JM. Food consumption and utilization. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. III, Pergamon Press, Oxford 1985.
- Smith KGV. *A Manual of Forensic Entomology*, British Museum (Natural History). Cornell Uni Press, London 1986.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM, Herndl GJ. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006. 103: 12115–12120.
- Song Z, Wang X, Liang G. Phylogenetic relationship among 15 sarcophagid fly species (Diptera; Sarcophagidae) based on partial sequences of mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase subunit I genes. *Acta Entomologic Sin* 2008. 51: 298-306.
- Sperling FAH, Anderson G, Hickey DA. A DNA-based approach to identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci* 1994. 39: 418-27.
- Spitz WU, Fischer RS. *Medicolegal Investigation of Death: Guidelines for the Application of Pathology to Crime Investigation*, Charles C. Thomas Publisher, Springfield, 1980.

- Stevens JR, Wall R, Wells JD. Paraphyly in Hawaiian hybrid blowfly populations and the evolutionary history of anthropophilic species. *Insect Mol Biol* 2002. 11: 141-148.
- Stoeckle M. Taxonomy, DNA and the bar code of life. *BioScience* 2003. 53: 2-3.
- Sukontason K, Sukontason KL, Piangjai S. Scanning electron microscopy of third-instar sarcophagid (Diptera: Sarcophagidae) recovered from a mummified human corpse in Thailand. *Rev Inst Med Trop* 2003a. 45: 95-98.
- Sukontason K, Sukontason KL, Piangjai S, Chaiwong T, Boonchu N, Kurahashi H, Vogtsberger RC. Larval ultrastructure of *Parasarcophaga dux* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae). *Micron* 2003b. 34: 359-364.
- Sukontason K, Bunchu N, Chaiwong T, Moophayak K, Sukontason KL. Forensically important flesh fly species in Thailand: morphology and developmental rate. *Parasitol Res* 2010. 106: 1055-1064.
- Summerbell RC, Lévesque CA, Seifert KA, Bovers M, Fell JW, Diaz MR, Boekhout T, de Oog GS, Stalpers J, Crous PW. Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005. 360: 1897-1903.
- Szpila K, Pape T. The first instar larva of *Apodacra pulchra* (Diptera, Sarcophagidae, Miltogramminae). *Insect Syst Evol* 2005. 36: 293-300.
- Szpila K. Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. In: Amendt J, Goff ML, Campobasso CP, Grassberger M (Eds). *Current concepts in forensic entomology*. Dordrecht, Springer 2010.
- Szpila K, Hall MJR, Pape T, Grzywacz A. Morphology and identification of first instar of the European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part II: Luciliina. *Med Vet Entomol* 2012. 27: 349-366.
- Szpila K, Mądra A, Jarmusz M, Matuszewski S. Flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) colonising large carcasses in Central Europe. *Parasitol Res* 2015a. 114: 2341-2348.
- Szpila K, Richet R, Pape T. Third instar larvae of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) of forensic importance-critical review of characters and key for European species. *Parasitol Res* 2015b. 114: 2279-2289.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011. 28: 2731-2739.

Tan SH, Rizman-Idid M, Mohd-Aris E, et al. DNA-based characterization and classification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) in Malaysia. *For Sci Int* 2010. 199: 43-49.

Ubero-Pascal N, Arnaldos MI, López-Esclapez R, García MD. Microscopy and forensic entomology. In: Mendez-Vilas A, Dias J (Eds). *Microscopy. Science, Technology, Applications and Education* 2010.

Ubero-Pascal N, Paños Á, García MD, Presa JJ, Torres B, Arnaldos MI. Micromorphology of immature stages of *Sarcophaga (Liopygia) cultellata* Pandellé, 1896 (Diptera: Sarcophagidae), a forensically important fly. *Microsc Res Tech* 2015. 78: 148-172.

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, Moura MO, Mello-Patiu CA. Comparative morphology and identification key for females of nine Sarcophagidae species (Diptera) with forensic importance in Southern Brazil. *Rev Bras entomol* 2015a. 59: 177-187.

Vairo KP, Corrêa RC, Lecheta MC, Caneparo MF, Mise KM, Preti D, Carvalho CJB, Almeida LM, Moura MO. Forensic Use of A Subtropical Blowfly: The First Case Indicating Minimum Postmortem Interval (mPMI) in Southern Brazil and First Record of *Sarconesia Chlorogaster* from a Human Corpse. *J Forensic Sci* 2015b. 60: S257-S260.

Vairo KP, Queiroz MMC, Mendonça PM, Barbosa RR, Carvalho CJB. Description of immature stages of the flesh fly *Peckia (Sarcodexia) lambens* (Wiedemann) (Diptera: Sarcophagidae) provides better resolution for taxonomy and forensics. *Trop Zool* 2015c. 28: 114-125.

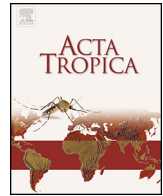
- Vanin S, Gherardi M, Bugelli V, Di Paolo M. Insects found on human cadaver in central Italy including the blowfly *Calliphora loewi* (Diptera: Calliphoridae), a new species of forensic interest. *For Sci Int* 2011. 207: 30-33.
- Velásquez Y, Magaña C, Martínez-Sánchez A, Rojo S. Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Med Vet Entomol* 2010. 24: 293-308.
- Velásquez Y, Ivorra T, Grzywacz A, Martínez-Sánchez A, Magaña C, García-Rojo A, Rojo S. Larval morphology, development and forensic importance of *Synthesiomyia nudiseta* (Diptera: Muscidae) in Europe: a rare species of Just overlooked? *Bull Entomol Res* 2013. 103: 98-110.
- 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.
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PD. DNA barcoding Australia's fish species. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005. 360: 1847–1857.
- Wells JD, Stevens JR. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annu Rev Entomol* 2008. 53: 103-120.
- Will KW, Rubinoff D. Myth of the molecule: DNA barcodes for species cannot replace morphology for identification and classification. *Cladistics* 2004. 20: 47–55.
- 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.
- Wilson KH. Molecular biology as a tool for taxonomy. *Clin Infect Dis* 1995. 20: 192-208.
- Xia X. Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. *Genetics* 1996. 144:1309-1320.
- Yeates DK, Wiegmann BM, Courtney GW, Meier R, Lambkin C, Pape T. Phylogeny and systematic of Diptera: Two decades of progress and prospects. *Zootaxa* 2007. 1668: 565-590.

Yepes-Gaurisas D, Sanchez-Rodriguez JD, Mello-Patiu CA, Wolff ME. Synanthropy of Sarcophagidae (Diptera) in La Pintada, Antioquia, Colombia. *Rev Biol Trop* 2013. 61: 1275-1287.

Zhang DX, Hewitt GM. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochem Syst Ecol* 1997. 25: 99- 120.

Zimin LS. Key to the third instar larvae of synanthropic flies of Tadzhikistan. *Opred Faun SSSR* 1948. 28: 1-114.

9. ANEXO I



Ultrastructure analysis of the immature stages of *Ravinia belforti* (Diptera: Sarcophagidae), a species of medical-veterinary and forensic importance, by scanning electron microscopy



Alexandre da-Silva-Xavier^{a,b,*}, Margareth Maria de Carvalho Queiroz^a

^a Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Programa de pós-graduação em Biologia Parasitária, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2016

Received in revised form 29 March 2016

Accepted 31 March 2016

Available online 9 April 2016

Keywords:

Sarcophagidae

Diptera

SEM

Forensic entomology

Medical and veterinary entomology

ABSTRACT

The postmortem interval is related to the age of immature species of flies found on corpses and can be estimated using data available in the literature on the biology of the species. The flesh fly *Ravinia belforti* is a carrier of enteric pathogens that can affect human and animal health as well as being of forensic importance. As the morphology of many immature Sarcophagidae is unknown, these immature forms must be collected and characterized after the emergence of the adult male. Here we describe and analyze the morphological characteristics of the larvae stages L1, L2, L3 and the puparium of *R. belforti* by scanning electron microscopy (SEM). Ten specimens of each stage were analyzed. Larvae of *R. belforti* follow the typical muscoid vermiform pattern with 12 segments. The anterior region is pointed, while the posterior region is thicker. The spines of the cephalic collar are flattened and with double, triple or quadruple points, different from the spines along the body that only have a single point. In L2, the anterior spiracle is present with a varying number of papillae (16–22), differing from other species. The posterior spiracles are located within the peritreme. The spiracular cavity is internalized in the posterior region, following the pattern that differs Sarcophagidae from other families. L3 features more visible and developed spines around the cephalic collar, getting thicker and denser near to the first thoracic segment. Puparium is similar to other species of Sarcophagidae. This paper presents important data on this family which has both health and forensic importance. Furthermore, *R. belforti* shows significant differences from other species of Sarcophagidae.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

An important application of forensic entomology is to estimate the postmortem interval (PMI) when a body is already in an advanced stage of decomposition and the traditional methods are not reliable (Liu and Greenberg 1989; Benecke 1998; Greenberg and Kunich 2002; Vairo et al., 2015a). The PMI can be calculated based on the age of immature muscoid flies collected from the corpse using data available in the literature on the biology of the species in question (Salviano et al., 1996; Campobasso and Introna, 2001; Oliveira-Costa and Mello-Patiu, 2004; Amendt et al., 2007; Nassu et al., 2014; da-Silva-Xavier et al., 2015). Various species of flesh flies (Diptera, Sarcophagidae) are attracted to decaying corpses, and therefore may be used as entomological evidence

in criminal investigations (Catts and Goff, 1992; Benecke, 1998; Introna et al., 1998; Al-Mesbah et al., 2011).

The flesh fly *Ravinia belforti* Prado & Fonseca, 1932 is distributed throughout Argentina, Brazil, Colombia, Paraguay and Trinidad & Tobago (Mello-Patiu et al., 2009). This species has forensic importance due the fact that both immature and adult flies are found on animal carcasses and human cadavers (Carvalho and Linhares, 2001; Oliveira-Costa et al., 2001; Barros et al., 2008; Barbosa et al., 2009; Oliveira and Vasconcelos, 2010; Rosa et al., 2011; Alves et al., 2014). In addition, d'Almeida and Salviano (1996) reported that *R. belforti* has a preference to deposit their larvae on animal feces, including human feces. Besides being used to estimate the PMI, this species may indicate cases of abuse or neglect of the elderly, children and vulnerable persons (Benecke and Lessing, 2001; Benecke et al., 2004). As *R. belforti* uses feces as substrate to lay larvae and is a species with a high level of synanthropy, it is a potential carrier of enteric pathogens (e.g. bacteria, fungi, protozoa, viruses, worms

* Corresponding author at: Laboratório de Entomologia Médica e Forense, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

E-mail address: alex.sxavier@yahoo.com.br (A. da-Silva-Xavier).

and helminthic eggs) that can affect human and animal health (Linhares, 1981; d'Almeida and Mello, 1996).

Accurate identification of the Sarcophagidae species is usually made through the adult male genitalia (Carvalho and Mello-Patiu, 2008). However, it is very common to find immature stages on a corpse as adult females use the carcass to deposit their larvae (Anderson, 1999; Otranto and Stevens, 2002; Cherix et al., 2012). The few keys to identify immature forms of Sarcophagidae refer mainly to the species of the northern hemisphere, most commonly in Europe and Asia (Zimin, 1948; Ishijima, 1967; Smith, 1986; Velásquez et al., 2010; Szpila et al., 2015). Consequently, the morphology of many immature forms of Sarcophagidae species in the New World is poorly understood, which impedes the species identification via the larval instars or puparium.

In these cases the immature forms collected from corpses needed to be reared in the laboratory and after the emergence of the adult male the identification can be made (Smith, 1986; Byrd and Castner, 2010). In addition while waiting to complete the life cycle of the fly, other problems may prevent the identification of the species, for example, the small number of specimens collected, the low survival rate of the specimens that reach the laboratory and even the difficulty to breed a particular species under artificial conditions (Sukontason et al., 2003a; Pujol-Luz et al., 2008).

Scanning electron microscopy (SEM) is an extremely important tool for the morphological characterization of immature flies. SEM is able to reveal structures that cannot be viewed through the optical microscope and thus enrich the taxonomic data of the morphology of these understudied immature forms (Leite and Lopes, 1987; Liu and Greenberg, 1989; Dahlem, 1991; Sukontason et al., 2003b; Ubero-Pascal et al., 2010, 2015; Singh et al., 2012; Samerjai et al., 2014).

In this paper, we describe and analyze the morphological characteristics of the immature forms of *R. belforti*. The morphology of the first, second and third instar larvae and puparium were analyzed by SEM.

2. Material and methods

Adults of *R. belforti* were collected with the aid of a modified Shannon trap (Barbosa et al., 2009; da-Silva-Xavier et al., 2015) on the campus of Instituto Oswaldo Cruz (IOC, FIOCRUZ) (22°51'06''S 43°14'27''W), in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. The flesh fly *R. belforti* was identified by the adult identification key elaborated by Carvalho and Mello-Patiu (2008) and the captured flies were placed in wooden cages (30 cm × 30 cm × 30 cm) to establish a colony. The colonies were kept at the Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF, Instituto Oswaldo Cruz—IOC, Fundação Oswaldo Cruz—FIOCRUZ) and the rearing followed the methodology previously described by Queiroz and Milward-De-Azevedo (1991).

The second generation larvae from the colony were killed in hot water (75–80 °C) and washed with 2% sodium hydroxide for five minutes. After this process, the larvae were fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2. The larvae were subsequently washed three times (10 min each) in the same buffer. Then, post-fixation in osmium tetroxide 1% was carried out for 1 h at room temperature and in the dark. After this process, they were washed once more in sodium cacodylate 0.1 M (three times, 10 min each).

The next step was the dehydration of the specimens through increasing ethanol series (7.5, 15, 30, 50, 70, 90 and 100%) for 15 min at each concentration. At the end of this step, the samples were subjected to drying by the critical point method using superdry CO₂ (Hayat, 1970).

The puparium were not subjected to any fixation, post-fixation and drying process due to its rigid cuticle, composed of chitin. The pupae were killed by freezing at –23 °C for approximately 24 h. The larvae and puparium were mounted on specific metal brackets, attached with double-sided tape and covered by a thin layer of white gold (20–30 nm) to be viewed in the scanning electron microscope Jeol JSM 6390LV of the Plataforma de Microscopia Rudolf Barth, IOC, FIOCRUZ.

Ten specimens of each larval and puparia stage were analyzed. The terminology used in the morphology description followed Ishijima (1967), McAlpine et al. (1981) and Courtney et al. (2000).

3. Results

The general morphology of the instars of *R. belforti* follows the typical vermiform pattern of muscoid dipterans. The anterior region is narrower than the posterior region and the cylindrical body of the larvae presents one pseudocephalon, three thoracic segments (T1–T3) and eight abdominal segments (A1–A8) (Figs. 1 A and 2 A).

3.1. First instar—L1

In the first instar the pseudocephalon is divided into two lobes on which there are antennae, sensorial papillae, maxillary palps and oral ridges (Fig. 1B). The presence of maxillary hooks was only observed in the first instar specimens (Fig. 1C). The spines that separate the cephalic region of the first thoracic segment are small, flattened and arranged in groups of double, triple or quadruple tips (Fig. 1D,E). The body of the larva has a wrinkled tegument and the segments are divided by smaller spines, flattened and single tips always pointing to the posterior region. The posterior region is thicker and where the posterior spiracles, with an internalized spiracular cavity, are found. This region presents a large number of spines and the circumspiracular tubercles are not yet well developed in the L1 (Fig. 1F).

3.2. Second instar—L2

The body of L2 is similar to the L1, but is larger (Fig. 2A). The pseudocephalon is more developed. In this region, the dome-shaped antennae, oral ridges and maxillary palps are clearly visible. The spines of the cephalic collar become more dense, flattened and with double, triple or quadruple tips (Fig. 2B,C). The maxillary hooks were retracted in all samples examined. The anterior spiracle has a varying number of papillae (16–22). The papillae are arranged along the anterior spiracle in an irregular row, usually in a pattern of a double row (Fig. 2D). The spines of the abdominal segments have simple tips (Fig. 2E). In the anal segment, the posterior spiracle has a pair of incomplete peritremes with two slits each. The spiracular cavity is internalized in the anal region, which is surrounded by more developed and elongated circumspiracular tubercles. These tubercles are arranged in four groups of three, surrounding the spiracular cavity, making a total of 12 tubercles (Fig. 2F).

3.3. Third instar—L3

The third instar larvae have similar morphologies to the L2 larvae, but are heavier and larger. Furthermore, L3 has fully developed structures and spines in larger quantities (Fig. 3A). The cephalic region shows antennae, oral ridges and maxillary palps all fully developed (Fig. 3B). The spines of the cephalic collar are more visible and well developed with 1–4 tips, getting thicker and denser as they get closer to the first thoracic segment (Fig. 3C). The anterior spiracles, as well as having more developed and ornate papillae, have undergone a change from the L2 spiracle format. In all the L3

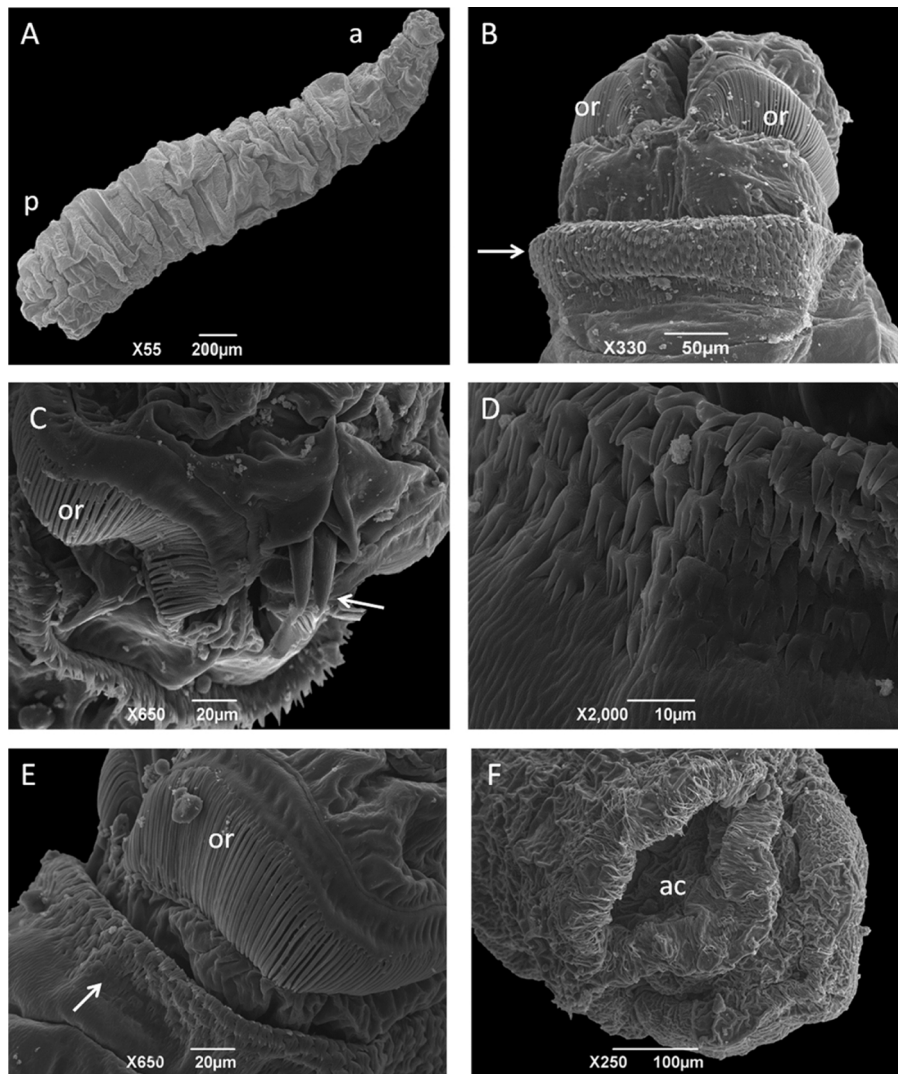


Fig. 1. Scanning electron micrographs of first instar larva of *Ravinia belforti* (Diptera: Sarcophagidae). (A) Full body larva, with the anterior (a) and posterior end (p). (B) Pseudocephalon with oral ridges (or) and spines of the cephalic collar (arrow). (C) Detail of the cephalic region with visible maxillary hooks (arrow) and oral ridges (or). (D) Spines of the cephalic collar. (E) Detail of the cephalic region with oral ridges (or) and spines of the cephalic collar (arrow). (F) Posterior end with the posterior spiracle internalized in the anal cavity (ac).

larvae analyzed, the papillae followed a regular row until the middle of the spiracle, then in this middle region, the papillae formed irregular rows and subsequently followed up to the other end of the spiracle again as regular rows. These irregular rows, which are only in the middle of the spiracle, are formed by only one or two papillae, which gives the spiracle a heart-shaped format (Fig. 3D). The intersegmental spines have single tips (Fig. 3E). The integument also features single tip spines. The spiracular cavity is internalized, as in L1 and L2. The two incomplete peritreme have three slits. The arrangement of the spiracular slits in the peritremes revealed that the slits were thick, long and vertically oriented. The distance between the peritremes is short, which makes it difficult to visualize the anal scar in some samples. The circumspiracular tubercles are fully-developed and elongated (Fig. 3F).

3.4. Puparium

The puparium of *R. belforti* shows a very similar morphology to the puparium of other species of Sarcophagidae with the retracted pseudocephalon and the anterior spiracles at the most anterior end of the body (Fig. 4A,B). The general morphology appears similar to the morphology of the third instar larva. The intersegmental spines

are thick, like the L3 larvae and have single tips (Fig. 4C). The integument presents fewer spines than the L3 larvae, but wrinkles are still present. The posterior spiracle is deeply internalized, and has the three spiracular slits as seen in L3 (Fig. 4E,F).

4. Discussion

The high level of morphological similarity between the immature forms of several Sarcophagidae species makes their identification difficult. Additionally, there is a lack of studies describing the immature stages of forensic important dipterans of this family; works are focused mainly on the Calliphoridae family (Erzinçlioglu, 1985; Szpila, 2010; Mendonça et al., 2010, 2014). Research concerning the morphological characterization of Sarcophagidae, besides supplying the information database related to medical-veterinary and forensic entomology also provides greater insight into muscoid flies in general. Together with the morphological characterization, other taxonomic techniques (e.g. DNA barcode or cuticular hydrocarbon) can be applied to avoid possible errors in the diagnosis of the species (Hebert et al., 2003; Wells and Stevens, 2008; Kather and Martin, 2012; Braga et al., 2013; Amorim et al., 2014; Nakano and Honda, 2015).

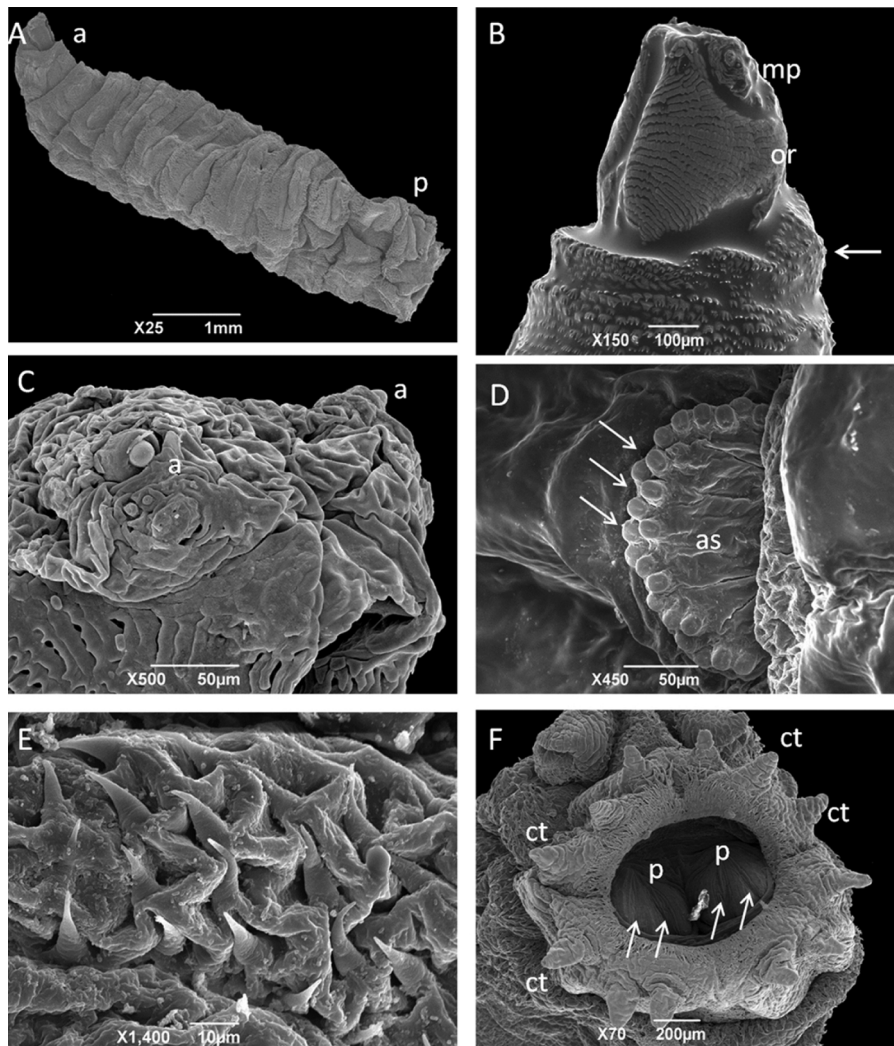


Fig. 2. Scanning electron micrographs of second instar larva of *Ravinia belforti* (Diptera: Sarcophagidae). (A) Full body larva, with the anterior (a) and posterior end (p). (B) Pseudocephalon with maxillary palps (mp), oral ridges (or) and spines of cephalic collar (arrow). (C) Detail of cephalic region showing antennae (a). (D) Anterior spiracle (as) surrounded by papillae (arrows) in an irregular row. (E) Details of the spines of the abdominal segments. (F) Posterior spiracle and peritreme (p) with two spiracular slits each (arrows). Circumspiracular tubercles (ct) surrounding the posterior spiracle.

According to Singh et al. (2012), the characterization of the Sarcophagidae larvae may be made by comparing a group of characteristics such as the shape and distribution of spines around the cephalic collar and intersegments; the configuration of the anterior spiracle; the shape and position of the posterior spiracle; and the distribution of the circumspiracular tubercles.

The morphology of immature forms of the *Ravinia* genus have been little studied, and so there are few works found in the literature (Velásquez et al., 2010). Leite and Lopes (1987) and Lopes and Leite (1987) made a brief note about the morphology of the first and second instars of *R. belforti*, respectively. Despite being the first records related to this species, these data are not significantly detailed.

The larvae of *R. belforti* have a wrinkled tegument for all larval instars. However, the integument of L3, besides wrinkled, shows many single spine tips, as observed by Mendonça et al. (2013) for *Peckia (Euboettcheria) collusor*. Some species of Sarcophagidae, such as *Peckia (Sarcodexia) lambens*, have smooth integument in the larval stages (Vairo et al., 2015b). Smooth integument is also a characteristic of Calliphoridae species (Mendonça et al., 2010, 2014).

Leite and Lopes (1987) observed the pattern of flattened spines and tips ranging from double to quadruple around the cephalic collar of the first instar of *R. belforti*. Several other muscoid groups also exhibit morphological differences between the thoracic and abdominal spines (Bonatto and Carvalho, 1996; Singh et al., 2012; Mendonça et al., 2014). The flattened, thick, double, triple or quadruple tipped pattern of thoracic spines of *R. belforti* differs from other Sarcophagidae, such as *P. (E.) collusor*, which features thin and single tips spines (Mendonça et al., 2013). Vairo et al. (2015b) also observed thick spines, however with single tips in the thoracic segments of *P. (S.) lambens*. Leite and Lopes (1987) also found a similar pattern in the morphology of spines of the immature form of *Oxysarcodexia* genus. This pattern of spines with tips ranging from two to four can be a characteristic of the species of genus *Ravinia* and *Oxysarcodexia*, both belonging to the Raviniini tribe. The intersegmental spines were used to differentiate species of genus *Sarcophaga* by Aspoas (1991). According to the author, the arrangement of the spines can be modified during larval development in certain species (threadlike in the first instar and flattened or dentiform in the third instar). These changes were also observed in *P. (E.) collusor*. These changes in the arrangement were not observed in the intersegmental spines of *R. belforti*, as noted by Sukontason

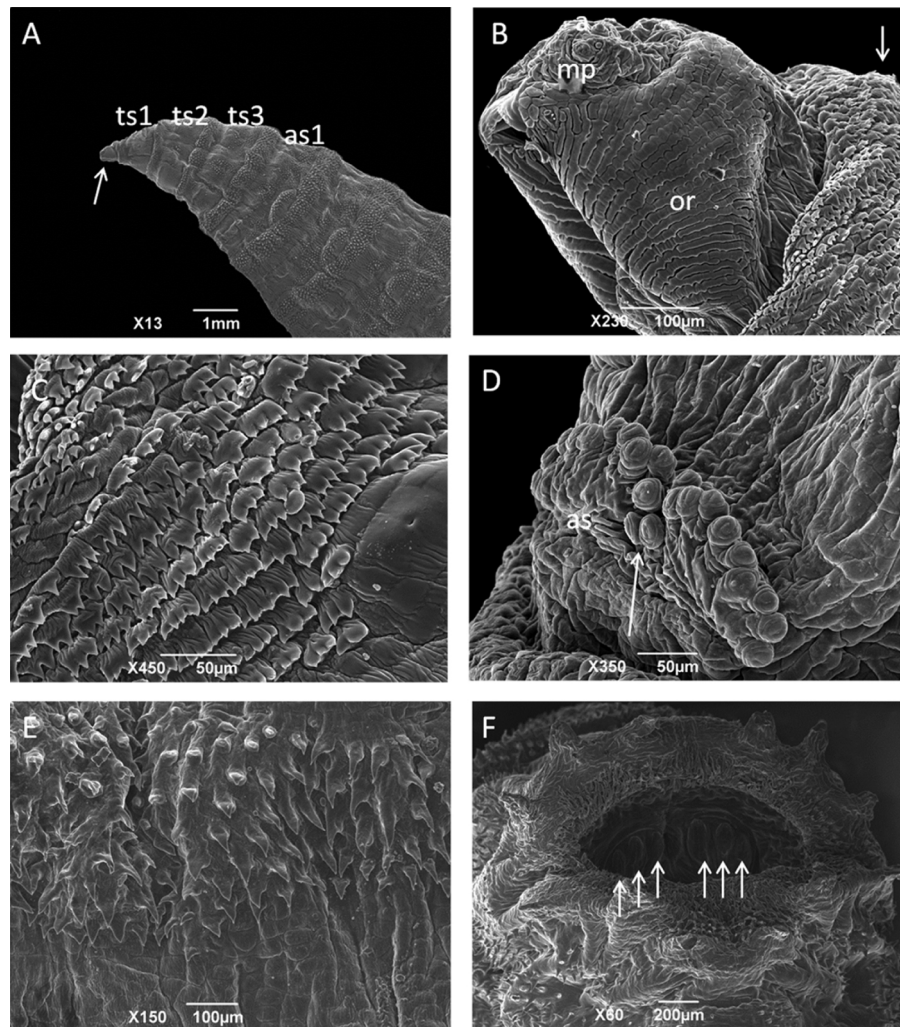


Fig. 3. Scanning electron micrographs of third instar larva of *Ravinia belforti* (Diptera: Sarcophagidae). (A) Anterior end: pseudocephalon (seta), three thoracic segments (ts1, ts2, ts3) and first abdominal segment (as1). (B) Pseudocephalon with maxillary palps (mp), oral ridges (or) and spines of cephalic collar (arrow). (C) Spines of cephalic collar. (D) Anterior spiracle (as) and irregular papillae (arrow). (E) Abdominal spines. (F) Posterior spiracle with three spiracular slits (arrows) in each peritreme.

et al. (2003b) for *Sarcophaga* (*Liosarcophaga*) *dux*. The anterior spiracle is absent in the first instar, but visible in the other instars. The second instar *R. belforti* was first described in a note by Lopes and Leite (1987), but the authors did not explore the morphology of the anterior spiracle. The number of papillae on the anterior spiracle may present an interspecific variation for some Calliphoridae species and also Sarcophagidae species from *Sarcophaga* genus (Erzinçlioglu, 1985; Singh et al., 2012). *R. belforti* showed a number of papillae ranging from 16 to 22. Some species of the same family showed a fewer number of papillae: *Wohlfahrtia magnifica* (5–6) (Ruiz-Martinez et al., 1989), *Sarcophaga* (*Liopygia*) *crassipalpis* (11–12) (Uni et al., 1999) and *P. (E.) collusor* (11–14) (Mendonça et al., 2013). Ishijima (1967) observed a higher number of papillae working with Sarcophagidae in Japan (more than 20 papillae): *Sarcophaga* (*Liosarcophaga*) *hapax* (40–44) and *Sarcophaga albiceps* (32–38). The number of papillae of *R. belforti* is similar to the number found in *Sarcophaga* (*Liosarcophaga*) *tibalis* (15–20) (Paños-Nicolás et al., 2015), however the anterior spiracle of *R. belforti* L3 larvae showed a distinct morphology of heart-shaped format.

The way the papillae surround the anterior spiracles of the Sarcophagidae species may also have important taxonomic value (Kano et al., 1951). The papillae may be arranged in a single row, for example, in *S. (L.) dux* (Sukontason et al., 2003b), *Sarcophaga* (*Liopygia*) *ruficornis* (Singh et al., 2012), *P. (S.) lambens* (Vairo et al., 2015b)

and *P. (E.) collusor* (Mendonça et al., 2013). Other Sarcophagidae species show the papillae arranged in multiple or irregular rows: *S. albiceps* (Kano et al., 1951), *S. (L.) hapax* (Ishijima, 1967) and *Sarcophaga* (*Liopygia*) *argyrostoma* (Awad et al., 2003).

Some authors claim that the irregularity in the pattern of papillae is a unique characteristic of Old World flesh flies, and not observed in flesh flies of Neotropical regions and even in Calliphoridae (Ishijima, 1967; Lopes and Leite, 1987; Sukontason et al., 2003b; Vairo, 2011; Mendonça et al., 2014). However, *R. belforti* does not follow this pattern and until now is the only Neotropical flesh fly with papillae arranged in irregular rows.

In the third instar larvae of *R. belforti* the papillae have multiple rows only in the middle of the spiracle, which can be considered an important taxonomic characteristic of the species. A similar pattern was observed by Paños-Nicolás et al. (2015) for *S. (L.) tibalis*, but less pronounced than in *R. belforti*, which means that despite presenting a similar number of papillae the two species can be distinguished by the arrangement of these papillae in the anterior spiracle. The posterior spiracle of *R. belforti* is surrounded by circumspiracular tubercles like the larvae of other species. The size and position of the tubercles can be used as a taxonomic character to distinguish some species (Lopes and Leite, 1987; Szpila, 2010). Lopes and Leite (1987) observed elongated tubercles for *Oxysarcodexia paulistanensis*, similar to those observed for L2 and L3 *R. belforti*. These long tubercles,

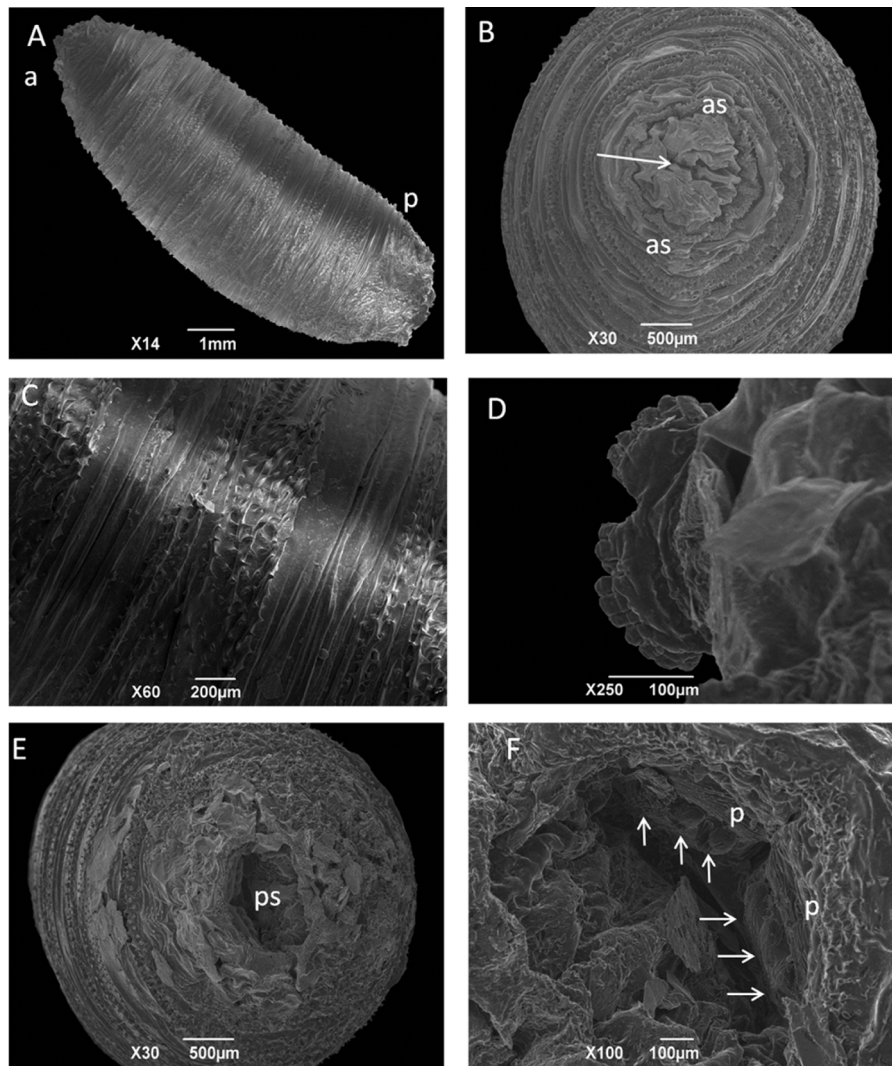


Fig. 4. Scanning electron micrographs of puparium of *Ravinia belforti* (Diptera: Sarcophagidae). (A) Full body puparium with the anterior (a) and posterior end (p). (B) Anterior end dorsal view with retracted pseudocephalon (arrow) and anterior spiracles (as). (C) Intersegmental spines. (D) Anterior spiracle. (E) Posterior end dorsal view showing the posterior spiracle (ps). (F) Posterior spiracle with three spiracular slits (arrows) in each peritreme (p).

surrounding the posterior spiracle differ from those seen in *P. (E.) collusor* and *P. (S.) lambens*, which have short tubercles (Mendonça et al., 2013; Vairo et al., 2015b).

Posterior spiracle slits of *R. belforti* are located inside an incomplete peritreme, as seen in many flesh flies: *S. (L.) ruficornis* (Singh et al., 2012), *S. (L.) dux* (Sukontason et al., 2003b), *P. (E.) collusor* (Mendonça et al., 2013) and *P. (S.) lambens* (Vairo et al., 2015b). Several Calliphoridae also have an incomplete peritreme (Liu and Greenberg, 1989; Mendonça et al., 2014), which does not make this feature unique for flesh flies. However, unlike other muscoid flies, the spiracular cavity of the species of Sarcophagidae is deeply internalized in the anal cavity, easily distinguishing flesh fly larvae from other families (Leite and Lopes, 1987; Mendonça et al., 2010; Velásquez et al., 2010; Szpila et al., 2015).

The shapes of both the peritremes and the spiracular slits have also been considered a taxonomic character by many authors (Ishijima, 1967; Nandi, 1980; Velásquez et al., 2010). However, Szpila et al. (2015) affirmed that this feature shows low taxonomic reliability due a clear intraspecific variation. The peritreme of *R. belforti* was not fully visible in almost all samples observed. Velásquez et al. (2010) reported something similar with the third instar of *Ravinia pernix*. This can mean a taxonomic feature for the *Ravinia* genus or only a condition related to the way the lar-

vae were killed and fixed, as suggested by Szpila et al. (2015). The two peritremes of *R. belforti* in the spiracular plate are in close proximity to each other, similar to what was observed by Mendonça et al. (2013) for *P. (E.) collusor*. The absence of the distance between the peritremes can distinguish *R. belforti* from species with greater distances, such as *S. (L.) dux*, *S. (L.) ruficornis* and *Sarcophaga (Boettcherisca) peregrina* (Sukontason et al., 2010).

The puparium of muscoid flies exhibits strong morphological similarities, which makes identification of the species difficult only through pupal morphology (Byrd and Castner, 2010). Because the morphology of the puparium is similar to the morphology of the third instar, some authors suggest that the key to species identification through the pupa is the pattern of intersegmental spines (Erzinçlioglu, 1985; Aspoas, 1991). However, one of the major features of *R. belforti* (flattened cephalic collar spines, with double, triple and quadruple tips) is barely visible on the puparium. The puparium intersegmental spines followed the pattern of single tips, very similar to other species of Sarcophagidae (Singh et al., 2012; Mendonça et al., 2013; Vairo et al., 2015b). In the puparia stage, the pseudocephalon is retracted, but the anterior spiracles are still visible, which helps identification. The anterior spiracles of *R. belforti* in the puparium kept the characteristic pattern of the species, with a strong central division. Samerjai et al. (2014) developed a pupar-

ium identification key for some species of the genus *Sarcophaga*, using the pattern of the posterior spiracle as the main feature. In all the samples observed of puparium, the spiracular plate was deeply internalized, making the analysis of the peritremes difficult.

5. Conclusion

This study provides data that can aid in the rapid diagnosis of the species *R. belforti*, which has medical-veterinary and forensic importance. Larvae of this species can be found both on corpses and human feces as well as indicate cases of abuse or neglect of the elderly, children and vulnerable persons. Besides the forensic importance, the preference for feces, combined with high synanthropy, makes this flesh-fly a carrier and transmitter of various bacteria that can affect human health.

The main morphological characteristics described in the present study and summarized by Singh et al. (2012) were effective for the distinction of *R. belforti* from other Sarcophagidae species considering the arrangement of the anterior spiracle, the number of papillae and the pattern of the spines of the thoracic segment. These results are important because it helps distinguish among *R. belforti*, *P. (E.) collusor* and *P. (S.) lambens* in places where these flesh flies have the same geographic distribution, as for example in some states of Brazil.

Acknowledgements

This work was supported by Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa (FAPERJ) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors are grateful to David Graham Straker for the English revision of the manuscript.

References

- Al-Mesbah, H., Al-Osaimia, Z., El-Azazy, O.M.E., 2011. Forensic entomology in Kuwait: the first case report. *Forensic Sci. Int.* 206, 25–26.
- Alves, A.C.F., Santos, W.E., Creão-Duarte, A.J., 2014. Diptera (Insecta) de importância forense da região neotropical. *Entomotropica* 29, 77–94.
- Amendt, J., Campobasso, C.P., Gaudry, E., et al., 2007. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *Int. J. Legal Med.* 121, 90–104.
- Amorim, J.A., Souza, C.M., Thyssen, P.J., 2014. Molecular characterization of *Peckia (Pattonella) intermutans* (Walker, 1861) (Diptera: Sarcophagidae) based on the partial sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase I gene. *J. Forensic Res.* 5, 227–232.
- Anderson, G.S., 1999. Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bear cubs. *J. Forensic Sci.* 44, 856–859.
- Aspoas, B.R., 1991. Comparative micromorphology of third instar larvae and the breeding biology of some Afrotropical Sarcophaga (Diptera: Sarcophagidae). *Med. Vet. Entomol.* 5, 437–445.
- Awad, A., Abdel-Salam, S., El-Ela, R.A., Abdel-Aal, A.A., Mohamed, D., 2003. Ultrastructure comparison of the sensory morphology of the first- and third-instar larvae of *Parasarcophaga argyrostoma* (Robineau-Desvoidy) (Diptera Sarcophagidae). *Egypt. J. Biol.* 5, 148–154.
- Barbosa, R.R., Mello-Patiu, C.A., Mello, R.P., Queiroz, M.M.C., 2009. New records of calyptrate dipterans (Fanniidae, Muscidae and Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 923–926.
- Barros, R.M., Mello-Patiu, C.A., Pujol-Luz, J.R., 2008. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Rev. Bras. Entomol.* 52, 606–609.
- Benecke, M., Lessing, R., 2001. Child neglect and forensic entomology. *Forensic Entomol.* 120, 155–159.
- Benecke, M., Josephi, E., Zweihoff, R., 2004. Neglect of elderly: forensic entomology cases and considerations. *Forensic Sci. Int.* 165, 195–199.
- Benecke, M., 1998. Six forensic entomology cases: description and commentary. *J. Forensic Sci.* 43, 797–805.
- Bonato, S.R., Carvalho, C.J.B., 1996. Análise morfológica das formas imaturas de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae). *Rev. Bras. Zool.* 13, 707–726.
- Braga, M.V., Pinto, Z.T., Queiroz, M.M.C., Matsumoto, N., Blomquist, G.J., 2013. Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: puparial cases from Sarcophagidae. *Acta Trop.* 128, 479–485.
- Byrd, J.H., Castner, J.L., 2010. *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, 2nd ed. CRC Press, Florida.
- Campobasso, C.P., Introna, F., 2001. The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. *Forensic Sci. Int.* 120, 132–139.
- Carvalho, L.M.L., Linhares, A.X., 2001. Seasonality of insect successions and pig carcass decomposition on a natural forest area in Southeastern Brazil. *J. Forensic Sci.* 46, 604–608.
- Carvalho, J.B.C., Mello-Patiu, C.A., 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev. Bras. Entomol.* 52, 390–406.
- Catts, E.P., Goff, M.L., 1992. Forensic entomology in criminal investigation. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 253–272.
- Cherix, D., Wyss, C., Pape, T., 2012. Occurrences of flesh flies (Diptera Sarcophagidae) on human cadavers in Switzerland, and their importance as forensic indicators. *Forensic Sci. Int.* 220, 158–163.
- Courtney, G.W., Sinclair, B.J., Meier, R., 2000. Morphology and terminology of Diptera larvae. In: Papp, L., Darvas, B. (Eds.), *Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera (with Special Reference to Flies of Economic Importance)*. Science Herald Press, Budapest, pp. 85–161.
- Dahlem, G.A., 1991. Order Diptera, Sarcophagidae (Oestroidea). In: Stehr, F.W. (Ed.), *Immature Insects*, vol 2. Kendal/Hunt Publishing Company, Dubuque, IA, pp. 871–873.
- Erzinçioğlu, Y.Z., 1985. Immature stages of British *Calliphora* and *Cynomya*, with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). *J. Nat. Hist.* 19, 69–96.
- Greenberg, B., Kunich, J.C., 2002. *Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators*. Cambridge University Press.
- Hayat, M.A., 1970. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* 270, 313–321.
- Introna, F., Campobasso, C.P., Di Fazio, A., 1998. Three case studies in forensic entomology from southern Italy. *J. Forensic Sci.* 43, 210–214.
- Ishijima, H., 1967. Revision of the third stage larvae of synanthropic flies of Japan (Diptera: Anthomyiidae, Muscidae, Calliphoridae and Sarcophagidae). *Jpn. J. Sanit. Zool.* 18, 47–100.
- Kano, R., Sato, K., Tange, H., 1951. Notes on the flies of medical importance in Japan: Part 2. The larvae of *Sarcophaga* known in Japan. *Jpn. J. Exp. Med.* 20, 115–131.
- Kather, R., Martin, S.J., 2012. Cuticular hydrocarbon profiles as a taxonomic tool: advantages, limitations and technical aspects. *Physiol. Entomol.* 37, 25–32.
- Leite, A.C.R., Lopes, H.S., 1987. Second contribution to the knowledge of the larvae of the Raviniini (Diptera, Sarcophagidae) based on observations using scanning electron microscope. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 219–226.
- Linhares, A.X., 1981. Synantropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 25, 189–215.
- Liu, D., Greenberg, B., 1989. Immature stages of some flies of forensic importance. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82, 80–93.
- Lopes, H.S., Leite, A.C.R., 1987. Third contribution to the knowledge of the Raviniini (Diptera, Sarcophagidae), based on observations of the larvae, using scanning electron microscope. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 407–413.
- McAlpine, J.F., Peterson, B.V., Shewell, G.E., Teskey, J.H., Vockeroth, J.R., Wood, D.M., 1981. *Manual of Nearctic Diptera*, vol. 1. Research Branch Agriculture, Ottawa, Canada, pp. 674 (Monograph # 27).
- Mello-Patiu, C.A., Soares, W.F., Silva, K.P., 2009. Espécies de Sarcophagidae (Insecta: Diptera) registradas no Estado do Rio de Janeiro. *Arquivos do Museu Nacional* 67, 173–188.
- Mendonça, P.M., Santos-Mallet, J.R., Queiroz, M.M.C., 2010. Ultramorphological characteristics of immature stages of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera Calliphoridae), a fly specie of forensic importance. *Microsc. Res. Tech.* 73, 779–784.
- Mendonça, P.M., Barbosa, R.R., Cortinhas, L.B., Santos-Mallet, J.R., Queiroz, M.M.C., 2013. Ultrastructure of immature stages of *Peckia (Euboetcheria) collusor* (Diptera: Sarcophagidae). *Acta Trop.* 128, 522–527.
- Mendonça, P.M., Barbosa, R.R., Cortinhas, L.B., Santos-Mallet, J.R., Queiroz, M.M.C., 2014. Ultrastructure of immature stages of *Cochliomyia macellaria* (Diptera Calliphoridae), a fly of medical and veterinary importance. *Parasitol. Res.* 113, 3675–3683.
- Nakano, A., Honda, J., 2015. Use of DNA sequences to identify forensically important fly species and their distribution in the coastal region of Central California. *Forensic Sci. Int.* 253, 1–13.
- Nandi, B.C., 1980. Studies on the larvae of flesh flies from India (Diptera Sarcophagidae). *Orient. Insects* 14, 303–323.
- Nassu, M.P., Thyssen, P.J., Linhares, A.X., 2014. Developmental rate of immature of two fly species of forensic importance: *Sarcophaga (Liopygia) ruficornis* and *Microcerella halli* (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitol. Res.* 113, 217–222.
- Oliveira, T.C., Vasconcelos, S.D., 2010. Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil and its implications for forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 198, 97–102.
- Oliveira-Costa, J., Mello-Patiu, C.A., 2004. Application of forensic entomology to estimate of the postmortem interval (PMI) in homicide investigations by the Rio de Janeiro Police Department in Brazil. *Forensic Med. Toxicol.* 5, 40–44.
- Oliveira-Costa, J., Mello-Patiu, C.A., Lopes, S.M., 2001. Dípteros muscóides associados com cadáveres humanos na cena da morte no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional* 464, 1–6.
- Otranto, D., Stevens, J.R., 2002. Molecular approaches to the study of myiasis-causing larvae. *Int. J. Parasitol.* 32, 1345–1360.

- Paños-Nicolás, A., Arnaldos, M.I., García, M.D., Ubero-Pascal, N., 2015. *Sarcophaga (Liosarcophaga) tibialis* Macquart 1851 (Diptera: Sarcophagidae): micromorphology of preimaginal stages of a fly of medical and veterinary interest. *Parasitol. Res.* 114.
- Pujol-Luz, J.R., Francez, P.A.d.C., Ururahy-Rodrigues, A., Constantino, R., 2008. The Black Soldier-fly, *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae), used to estimate the postmortem interval in a case in Amapá State, Brazil. *J. Forensic Sci.* 53, 476–478.
- Queiroz, M.M.C., Milward-De-Azevedo, E.M.V., 1991. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Rev. Bras. Zool.* 8, 75–84.
- Rosa, T.A., Babata, M.L.Y., Souza, C.M., Sousa, D., Mello-Patiu, C.A., Vaz-de-Mello, F.Z., Mendes, J., 2011. Arthropods associated with pig carrion in two vegetation profiles of Cerrado in the State of Minas Gerais, Brazil. *Rev. Bras. Entomol.* 55, 424–434.
- Ruiz-Martinez, I., Soler-Cruz, M.D., Benitez-Rodriguez, R., Perez-Jimenez, J.M., Diaz-Lopez, M., 1989. Postembryonic development of *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner, 1862) (Diptera: Sarcophagidae). *J. Parasitol.* 75, 531–539.
- Salviano, R.J.B., Mello, R.P., Beck, L.C.N.H., d'Almeida, J.M., 1996. Aspectos Bionômicos de *Squamatoides trivittatus* (Diptera, Sarcophagidae) sob condições de laboratório. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 249–254.
- Samerjai, C., Sanit, S., Sukontason, K., Klong-klaew, T., Kurahashi, H., Tomberlin, J.K., Morakote, N., Wannasan, A., Sukontason, K.L., 2014. Morphology of puparia of flesh flies in Thailand. *Trop. Biomed.* 31, 351–361.
- Singh, D., Garg, R., Wadhawan, B., 2012. Ultramorphological characteristics of immature stages of a forensically important fly *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius) (Diptera: Sarcophagidae). *Parasitol. Res.* 110, 821–831.
- Smith, K.G.V., 1986. *A Manual of Forensic Entomology*, British Museum (Natural History). Cornell University Press, London.
- Sukontason, K., Sukontason, K.L., Piangjai, S., 2003a. Scanning electron microscopy of third-instar sarcophagid (Diptera: Sarcophagidae) recovered from a mummified human corpse in Thailand. *Rev. Inst. Med. Trop.* 45, 95–98.
- Sukontason, K., Sukontason, K.L., Piangjai, S., Chaiwong, T., Boonchu, N., Kurahashi, H., Vogtsberger, R.C., 2003b. Larval ultrastructure of *Parasarcophaga dux* (Thomson) (Diptera: Sarcophagidae). *Micron* 34, 359–364.
- Sukontason, K., Bunchu, N., Chaiwong, T., Moophayak, K., Sukontason, K.L., 2010. Forensically important flesh fly species in Thailand: morphology and developmental rate. *Parasitol. Res.* 106, 1055–1064.
- Szpila, K., Richet, R., Pape, T., 2015. Third instar larvae of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) of forensic importance—critical review of characters and key for European species. *Parasitol. Res.* 114, 2279–2289.
- Szpila, K., 2010. Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance. In: Amendt, J., Goff, M.L., Campobasso, C.P., Grassberger, M. (Eds.), *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer, Dordrecht, pp. 43–56.
- Ubero-Pascal, N., Arnaldos, M.I., López-Esclapez, R., García, M.D., 2010. Microscopy and forensic entomology. In: Mendez-Vilas, A., Dias, J. (Eds.), *Microscopy. Science, Technology, Applications and Education*, pp. 1548–1556.
- Ubero-Pascal, N., Paños, Á., García, M.D., Presa, J.J., Torres, B., Arnaldos, M.I., 2015. Micromorphology of immature stages of *Sarcophaga (Liopygia) cultellata* Pandellé, 1896 (Diptera: Sarcophagidae), a forensically important fly. *Microsc. Res. Tech.* 78, 148–172.
- Uni, S., Shinonaga, S., Nishio, Y., Fukunaga, A., Iseki, M., Okamoto, T., Ueda, N., Miki, T., 1999. Ophthalmomyiasis caused by *Sarcophaga crassipalpis* (Diptera: Sarcophagidae) in a hospital patient. *J. Med. Entomol.* 36, 906–908.
- Vairo, K.P., Corrêa, R.C., Lecheta, M.C., Caneparo, M.F., Mise, K.M., Preti, D., de Carvalho, C.J.B., Almeida, L.M., Moura, M.O., 2015a. Forensic use of a subtropical blowfly: the first case indicating minimum postmortem interval (mPMI) in southern Brazil and first record of *Sarconesia chlorogaster* from a human corpse. *J. Forensic Sci.* 60, S257–S260.
- Vairo, K.P., Queiroz, M.M.C., Mendonça, P.M., Barbosa, R.R., Carvalho, C.J.B., 2015b. Description of immature stages of the flesh fly *Peckia (Sarcodexia) lambens* (Wiedemann) (Diptera: Sarcophagidae) provides better resolution for taxonomy and forensics. *Trop. Zool.* 28, 114–125.
- Vairo, K.P., 2011. *Sarcophagidae* (Diptera) de potencial interesse forense de Curitiba, Paraná: chave pictórica para as espécies e morfologia dos estágios imaturos de *Sarcodexia lambens* (Wiedemann). In: *Dissertation*. Universidade Federal do Paraná.
- Velásquez, Y., Magaña, C., Martínez-Sánchez, A., Rojo, S., 2010. Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Med. Vet. Entomol.* 24, 293–308.
- Wells, J.D., Stevens, J.R., 2008. Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 103–120.
- Zimin, L.S., 1948. Key to the third instar larvae of synanthropic flies of Tadzhikistan. *Opred. Faune SSSR* 28, 1–114.
- d'Almeida, J.M., Mello, R.P., 1996. Comportamento de dípteros muscóides frente a substratos de oviposição em laboratório, no Rio de Janeiro, RJ. *Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 137–138.
- d'Almeida, J.M., Salviano, R.J.B., 1996. Feeding preference of the larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) and *Ravinia belforti* (Prado e Fonseca) (Diptera: Sarcophagidae) concerning different diets. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 137–138.
- da-Silva-Xavier, A., Barbosa, R.R., Barbosa, C.G., Queiroz, M.M.C., 2015. Bionomy of two flies of sanitary and forensic importance: *Peckia (Sarcodexia) lambens* (Wiedemann) and *Oxysarcodexia amorosa* (Schiner) (Diptera, Sarcophagidae). *Rev. Bras. Entomol.* 59, 229–233.