

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PALOMA MARTINS MENDONÇA

**IDENTIFICAÇÃO DE IMATUROS DE DÍPTEROS MUSCÓIDES
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E FORENSE
ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

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

Orientação: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

RIO DE JANEIRO
2010

M539

Mendonça, Paloma Martins

Identificação de imaturos de dípteros muscóides (díptera: calliphoridae) de importância sanitária e forense através da microscopia eletrônica de varredura / Paloma Martins Mendonça. – Rio de Janeiro, 2009.

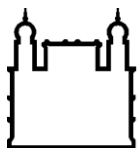
xiv, 65 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-graduação em Biologia Parasitária, 2010.

Bibliografia: f. 52-61

1. Imaturos. 2. Entomologia Forense. 3. Díptera. 4. Microscopia. 5. Eletrônica de varredura. I. Título.

CDD 595.70854



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PALOMA MARTINS MENDONÇA

**IDENTIFICAÇÃO DE IMATUROS DE DÍPTEROS MUSCÓIDES
(DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E FORENSE
ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

Orientação: Prof. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Aprovada em: 23 de março de 2010

EXAMINADORES:

Prof. Dra.: Teresa Cristina Monte Gonçalves - (Presidente)

Prof. Dra.: Suzana Côrte Real Faria – (Membro)

Prof. Dr.: José Mario d’Almeida – (Membro)

Rio de Janeiro, 23 de março de 2010.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus que me iluminou e tornou tudo isso possível.

Agradeço à Dra. Margareth Queiroz, minha querida orientadora, grande amiga e incentivadora, pela confiança e por todos os ensinamentos passados a mim durante a execução deste trabalho e muito antes dele, os quais certamente levarei por toda a minha vida. À Dra. Jacenir Reis Santos Mallet, pela orientação, credibilidade e por ter me apresentado as maravilhas da microscopia eletrônica de varredura.

Agradeço todos os estagiários e colegas do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses – Setor de Entomologia Médica e Forense pelo auxílio, críticas, sugestões e estímulo durante a execução do trabalho, principalmente Alexandre, André, Marcio, Rebecca, Renata e Thalita pela paciência, tolerância e compreensão nos momentos mais tensos. Agradeço em especial ao Rodrigo pelo auxílio nas coletas dos insetos, sem a ajuda dele, muita coisa não se realizaria e a Zeneida pela ajuda na manutenção das colônias.

Agradeço também a Adalberto José da Silva e a todos da Plataforma de Microscopia pela ajuda durante as observações, principalmente ao Romulo Custódio dos Santos pelo treinamento no uso do microscópio e à Dra. Suzana Côrte-Real Faria pela confiança.

Sou especialmente grata à minha família e meu noivo que compreenderam as ausências, me acompanharam nos finais de semana de experimentos, sempre me incentivaram e me deram apoio muito importante e essencial durante as fases mais difíceis desse trabalho. À minha amiga Mari, minha companheira de estudos e que me deu conselhos valiosos e muita força.

Agradeço à coordenação do Curso de Mestrado em Biologia Parasitária, bem como a todo o corpo docente por ter me oferecido um curso do qual me recordarei sempre. Agradeço também aos meus colegas de turma pela amizade.

E, finalmente, à Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro e estrutural para a realização desse trabalho. E ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela bolsa concedida.

ÍNDICE

1.	Introdução.	01
2.	Revisão de Literatura.	04
	2.1 - Os Insetos e a Entomologia Forense.	04
	2.2 - Família Calliphoridae.	05
	2.3 - Gênero <i>Chrysomya</i> e as Espécies de Importância Forense Introduzidas no Brasil.	08
	2.4 - Identificação de Dípteros Muscóides.	10
3.	Objetivo Geral.	13
4.	Objetivos Específicos.	14
5.	Metodologia.	15
6.	Resultados.	19
	6.1 – <i>Chrysomya albiceps</i>	23
	6.1.1 – Ovos.	23
	6.1.2 – Larvas de Primeiro Instar.	23
	6.1.3 – Larvas de Segundo Instar.	24
	6.1.4 – Larvas de Terceiro Instar.	24
	6.1.5 – Pupários.	25
	6.2 – <i>Chrysomya putoria</i>	31
	6.2.1 – Ovos.	31
	6.2.2 – Larvas de Primeiro Instar.	31
	6.2.3 – Larvas de Segundo Instar.	32
	6.2.4 – Larvas de Terceiro Instar.	32
	6.2.5 – Pupários.	33
	6.3 – <i>Chrysomya megacephala</i>	39
	6.3.1 – Ovos.	39
	6.3.2 – Larvas de Primeiro Instar.	39
	6.3.3 – Larvas de Segundo Instar.	39
	6.3.4 – Larvas de Terceiro Instar.	40

6.3.5 – Pupários.	41
7. Discussão.	47
8. Conclusões.	54
9. Referências Bibliográficas.	55

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 2.2.1 - Esquema do ovo de moscas do gênero <i>Chrysomya</i> , mostrando micrópila, área mediana e exocóron.	6
Figura 2.2.2 - Esquema da larva de mosca do gênero <i>Chrysomya</i> , mostrando região cefálica, espinhos cefálicos, espiráculo anterior, espinhos entre os segmentos e segmento anal.	7
Figura 2.2.3 - Esquema do pupário de mosca do gênero <i>Chrysomya</i> , mostrando região cefálica, espiráculo anterior, espinhos entre os segmentos, segmento anal e espiráculo posterior.	8
Figura 5.1 - Armadilha utilizada para coleta de dípteros muscóides.	16
Figura 5.2 - Gaiola utilizada na manutenção dos dípteros muscóides em laboratório.	16
Figura 5.3 - Recipientes plásticos para criação de imaturos de dípteros muscóides: menor contendo dieta e maior contendo a vermiculita. .	17
Tabela 6.1 - Resumo comparativo dos resultados referentes a ovos de <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Chrysomya putoria</i> e <i>Chrysomya megacephala</i> através da microscopia eletrônica de varredura.	19
Quadro 6.1 - Resumo comparativo dos resultados referentes a larvas de primeiro, segundo e terceiro instar de <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Chrysomya putoria</i> e <i>Chrysomya megacephala</i> através da microscopia eletrônica de varredura. ...	20
Quadro 6.2 - Resumo comparativo dos resultados referentes aos pupários de <i>Chrysomya albiceps</i> , <i>Chrysomya putoria</i> e <i>Chrysomya megacephala</i> através da microscopia eletrônica de varredura.	22

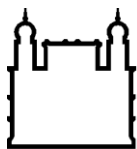
- Figura 6.1 - Micrografia eletrônica de varredura dos ovos de *Chrysomya albiceps*. A – Visão dorsal do ovo, porção posterior à esquerda (seta) e área mediana (am) ao longo do comprimento do ovo; B – Visão dorsal, área mediana (am) e as células coriônicas (cc); C – Porção final da área mediana (am) afilada (seta) próxima a extremidade posterior; D – Porção final da área mediana (am) bifurcada em forma de Y (setas) próxima a extremidade anterior e micrópila (m); E – Ilhas da área mediana sem anastomoses, mas com orifícios (seta); F – Detalhe do orifício da micrópila (seta). 26
- Figura 6.2 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de primeiro instar de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando fileiras de espinhos entre os segmentos (setas e detalhe), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm) e espinhos (e); C – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D – Visão geral da região cefálica, evidenciando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), dentes supra bucais (d) e o aparelho bucal (ab); E – Visão geral do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Detalhe do espiráculo posterior, mostrando a abertura espiracular (seta) e músculos de sustentação (ms). 27
- Figura 6.3 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando tubérculos (seta), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e) e cristas orais (co); C – Visão detalhada dos espinhos entre os segmentos do corpo da larva; D - Visão geral dos tubérculos, evidenciando a fileira de tubérculos duplos (setas); E – Visão detalhada do tubérculo, mostrando a coroa de espinhos no ápice (círculo); F – Visão geral da região anterior, mostrando o espiráculo anterior (seta); G – Detalhe do espiráculo anterior; H – Visão detalhada do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores com as duas aberturas espiraculares (setas), os músculos de sustentação (ms), os tubérculos dorsais internos (tdi) e tubérculos dorsais medianos (tdm). 28

- Figura 6.4 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de terceiro instar de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando tubérculos (setas) e região cefálica (rc); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e) e cristas orais (co); C – Visão detalhada da região cefálica, mostrando palpo maxilar (pm) e antena (a); D - Visão geral dos tubérculos, evidenciando a fileira de tubérculos duplos e a coroa de espinhos (setas); E – Detalhe do espiráculo anterior (seta); F – Visão geral do segmento anal, mostrando a localização das placas espiraculares (seta); G – Visão geral da placa espiracular, mostrando os espiráculos posteriores (setas), tubérculos dorsais internos (tdi) e tubérculo dorsal mediano (tdm); H – Visão detalhada do espiráculo posterior com as três aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms). 29
- Figura 6.5 - Micrografia eletrônica de varredura dos pupários de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do pupário mostrando os tubérculos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica retraída, mostrando espiráculo anterior (ea); C - Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); D – Visão geral do pupário, mostrando tubérculos curvados (setas); E – Detalhe dos tubérculos curvados com espinhos no ápice (círculo); F - Visão geral do segmento anal localizando as placas espiraculares (setas); G - Visão dos espiráculos posteriores com as três aberturas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi). 30
- Figura 6.6 - Micrografia eletrônica de varredura dos ovos de *Chrysomya putoria*. A – Visão dorsal do ovo, porção anterior a esquerda (seta) e área mediana (am) ao longo do comprimento do ovo; B – Visão dorsal, mostrando a área mediana (am) e as ornamentações das células coriônicas (cc); C – Detalhe da porção ventral do ovo, mostrando as ornamentações das células coriônicas (cc); D - Área mediana (am) próxima a extremidade posterior terminando de forma afilada (seta); E – Micrópila (seta) e área mediana terminando de forma arredondada (am); F – Micrópila (seta). 34

- Figura 6.7 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de primeiro instar de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando fileiras de espinhos entre os segmentos (setas e detalhe), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão geral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), dentes supra bucais (d) e o aparelho bucal (ab); C – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D – Visão detalhada dos espinhos do colar cefálico; E – Visão geral do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Detalhe dos espiráculos posteriores, mostrando as aberturas espiraculares (setas) e músculos de sustentação (ms). 35
- Figura 6.8 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e); cristas orais (co) e espiráculo anterior (ea); C – Visão detalhada dos espinhos entre os segmentos do corpo da larva; D - Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); E – Visão detalhada do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Visão detalhada das duas aberturas espiraculares (setas), dos músculos de sustentação (ms) e dos tubérculos dorsais internos (tdi). 36
- Figura 6.9 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de terceiro instar de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do corpo da larva mostrando espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a), palpo maxilar (pm), cristas orais (co), espinhos (e), espiráculo anterior (ea), dentes supra bucais (d) e aparelho bucal (ab); C - Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D - Detalhe do espiráculo anterior (ea); E – Visão detalhada dos espinhos entre os segmentos; F – Visão geral do segmento anal, mostrando a localização das placas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi); G – Visão detalhada do espiráculo posterior com as três aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms). 37

- Figura 6.10 - Micrografia eletrônica de varredura dos pupários de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do pupário mostrando os espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão detalhada da região cefálica retraída (seta) e do espiráculo anterior (ea); C – Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); D – Visão da região anterior retraída e espiráculo anterior (ea); E – Visão da região posterior com tubérculos e localização das placas espiraculares (seta); F - Visão geral do segmento anal, mostrando as placas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi); G - Visão dos espiráculos posteriores com as três aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms). 38
- Figura 6.11 - Micrografia eletrônica de varredura dos ovos de *Chrysomya megacephala*. A – Visão dorsal do ovo, porção anterior a esquerda (seta) e área mediana (am) ao longo do comprimento do ovo; B – Visão dorsal, mostrando a área mediana (am) arredondada próxima a extremidade posterior; C – Área mediana (am) bifurcada sob a forma de Y (setas) próxima a extremidade anterior; D – Ilhas da área mediana sem anastomoses; E – Micrópila (seta); F – Detalhe das ornamentações e orifício da micrópila (seta). 42
- Figura 6.12 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de primeiro instar de *Chrysomya megacephala*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando fileiras de espinhos entre os segmentos (setas e detalhe), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), dentes supra bucais (d) e aparelho bucal (ab); C – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D – Visão detalhada dos espinhos da região cefálica (e); E – Visão geral do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Detalhe dos espiráculos posteriores, mostrando as aberturas espiraculares (seta) e músculos de sustentação (ms). 43

- Figura 6.13 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Chrysomya megacephala*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão frontal detalhada da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), dentes supra bucais (d), aparelho bucal (ab), espinhos (e) e cristas orais (co); C – Visão detalhada dos espinhos do colar cefálico; D - Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); E – Visão detalhada do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Visão detalhada das duas aberturas espiraculares (setas) e músculos de sustentação (ms). 44
- Figura 6.14 - Micrografia eletrônica de varredura das larvas de terceiro instar de *Chrysomya megacephala*. A – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), cristas orais (co) e espiráculo anterior (ea); B – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); C – Visão detalhada da região cefálica, mostrando espiráculo anterior (ea), espinhos (e), aparelho bucal (ab) e cristas orais (co); D - Detalhe do espiráculo anterior (ea); E – Visão geral do segmento anal, mostrando a localização das placas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi); F – Visão detalhada dos espiráculos posteriores, mostrando as aberturas espiraculares (setas). 45
- Figura 6.15 - Micrografia eletrônica de varredura dos pupários de *Chrysomya megacephala*. A – Visão geral do pupário mostrando os espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); C – Visão detalhada das fileiras de espinhos entre os segmentos (e); D – Visão geral do segmento anal, mostrando as placas espiraculares (seta), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm) e dorsal externo (tde); E - Visão do espiráculo posterior, mostrando as aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms). 46



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

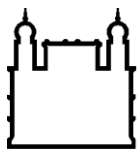
IDENTIFICAÇÃO DE IMATUROS DE DÍPTEROS MUSCÓIDES (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) DE IMPORTÂNCIA SANITÁRIA E FORENSE ATRAVÉS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paloma Martins Mendonça

Os dípteros muscóides são insetos com notável importância econômica e na entomologia médica e veterinária devido às diversas formas como eles podem estar relacionados ao homem, seja vetorando patógenos, causando miíases ou participando da degradação da matéria orgânica. A entomologia forense é uma ciência que estuda o papel dos insetos na decomposição de cadáveres e uma das principais aplicações destes nesta área é a estimativa do intervalo pós-morte, baseada no período mínimo de atividade dos insetos no corpo. No caso dos dípteros muscóides, que são os primeiros a chegar e podem ovipor logo após encontrar o cadáver, o conhecimento morfológico das fases imaturas desses insetos será mais uma ferramenta que auxiliará peritos e pesquisadores, pois em alguns casos, ovos e larvas são as únicas evidências presentes. A microscopia eletrônica de varredura é um instrumento que permite uma visualização mais detalhada dos caracteres morfológicos. Algumas espécies de muscóides destacam-se devido a sua preferência alimentar, pois buscam a matéria orgânica em decomposição para se alimentar, dentre elas podemos destacar os califorídeos *Chrysomy albiceps*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala*. Este trabalho teve como objetivo a identificação de ovos, larvas de primeiro, segundo e terceiro instar e pupários destas espécies de dípteros de grande importância forense e disseminadores de patógenos, através da utilização de microscopia eletrônica de varredura. Foram analisados 30 exemplares de cada estágio correspondente a cada espécie, provenientes de colônias de laboratório, estabelecidas a partir de adultos capturados no campus da Fundação Oswaldo Cruz, RJ. Ovos e larvas foram transferidos para placas de Petri contendo hidróxido de sódio e lavados com H₂O destilada. Depois foram fixados com solução de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio e pós-fixados em tetróxido de ósmio, desidratados em séries crescentes de acetona e submetidos ao método de secagem pelo ponto crítico usando CO₂ em aparelho de Balzers, montados em suportes metálicos e cobertos por ouro, para permitir a visualização ao microscópio eletrônico de varredura. Pupas com 48 a 72 horas de formação foram lavadas, congeladas e depois montadas em suportes metálicos e cobertas por ouro para observação. Neste trabalho foi observado que a linha mediana termina arredondada na porção anterior dos ovos de *C. putoria*, enquanto nas outras duas espécies esta termina bifurcada. As ornamentações da micrúpila são do tipo projeções nos ovos de *C. megacephala* e *C. albiceps* e do tipo depressões em *C. putoria*. O corpo da larva em todos os instares é muito semelhante entre as três espécies analisadas. No entanto, somente *C. albiceps* apresentou o tegumento recoberto por tubérculos organizados em fileiras ao longo do corpo da larva. No ápice dos tubérculos são encontrados espinhos que são característicos dessa espécie. Os pupários são formados a partir do endurecimento da cutícula da larva de terceiro instar, sendo assim, apresentaram estruturas muito semelhantes ao instar anterior. Este estudo permitiu destacar diversas características que podem ser utilizadas para identificar as espécies de importância sanitária e forense, além de fornecer subsídios para a elaboração de uma chave dicotômica específica para estes imaturos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IDENTIFICATION OF MUSCOIDS DIPTERANS IMMATURES (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) WITH SANITARY AND FORENSIC IMPORTANCE USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paloma Martins Mendonça

Muscoids diptera are insects with considerable economic importance and also in medical and veterinary entomology because of the way that they are related to man, as vectors of pathogens, causing myiasis or participating in organic matter degradation. Forensic entomology is a discipline that studies the role of insects in corpse's decomposition and one of the most common applications is to estimate postmortem interval by determining a minimum period of insect activity on a decomposing body. Flies are the first visitors to a dead body and are able to oviposit on carrion within a few hours after death. And the morphologic knowledge from imatures can be used as a tool in crime scene investigations because, sometimes, only eggs and larvae can be found in corpses. Scanning electron microscopy gives detailed information about morphologic characters. Some species of diptera are important because their larvae grow up at organic matter, such the blowflies *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria* and *Chrysomya megacephala*. The aim of this study was identify eggs, larvae of first, second and third instar and puparium of these species of flies of forensic importance and pathogens vectors, by using scanning electron microscopy. All the imatures examined in this study were obtained from culture set up from wild flies trapped at Fundação Oswaldo Cruz campus, Rio de Janeiro, RJ. Thirty samples from each species were observed. Eggs and larvae were transferred to a Petri dish with sodium hydroxid and then washed with destilated water. After it, imatures were fixed in glutaraldehyde in sodium cacodylate and postfixed in osmium tetroxide. They were dehydrated in a series of acetone for critical point drying, using CO₂ in Balzers apparatus. Specimens were adhered in metallic support and gold-coated for SEM examination. Pupae within 48 to 72 hours-age were washed, frozen and adhered in metallic support and gold-coated for SEM examination. Median area ends rounded anteriorly in *C. putoria*, whereas ended bifurcate in others species. Micropyle showed projections at *C. megecephala* and *C. albiceps*, but at *C. putoria*, micropyle was adorned by depressions. Larvae bodies were very similar among all the species analyzed. However, only *C. albiceps* body tegument was composed by tubercles organized in lines along larval body. At the apex of these tubercles some spines are only seen at this blowfly specie. The pupae are formed from the hardening of the cuticle of third instar larvae, thus, had structures very similar to the previous instar. This study helped to highlight many features that could be used to identify the species of sanitary and forensic importance, and provides subsidies for the development of a key to these specific immature.

1. Introdução

Os dípteros muscóides fazem parte do grupo de insetos de importância econômica e na entomologia médica e veterinária, devido às diversas maneiras que eles podem afetar o homem e os animais domésticos (Greenberg 1971 e 1973). De acordo com Freitas et al. (1982), os muscóides podem atuar como agentes irritantes e espoliadores, produtores de miíases, hospedeiros intermediários de diversos parasitas e vetores de agentes patogênicos.

Na natureza, as moscas, principalmente as larvas de algumas espécies, participam ativamente da degradação da matéria orgânica, desenvolvendo-se em diversos tipos de substratos, que vão desde tecidos vivos de animais e vegetais, carcaças de vertebrados e invertebrados a lixo urbano e fezes, atuando desta forma, como verdadeiras “lixerias naturais” (d’Almeida 1986).

Muitos desses insetos procuram estes meios, não só para a postura, como também, para a alimentação e sítio de cópula, o que permite que estas moscas assumam um papel de destaque em saúde pública, como potenciais vetores mecânicos de uma série de patógenos, tais como: enterovírus (vírus da poliomielite), enterobactérias (*Salmonella* (Salmon, 1886), *Shigella* (Shiga, 1898), *Escherichia* (Escherich, 1885)), cistos e oocistos de protozoários (*Entamoeba histolytica* (Schaudinn, 1903), *Giardia lamblia* (Kunstler, 1882), *Toxoplasma gondii* (Nicolle e Manceaux, 1909)), ovos de helmintos (*Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758), *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771), *Taenia* sp.) e fungos (Greenberg 1971 e 1973; Furlanetto et al. 1984; Queiroz et al. 1999; Oliveira et al. 2002; Maldonado e Centeno 2003).

Além de atuarem como vetores mecânicos, os dípteros muscóides de diversas famílias procuram o tecido animal para postura de seus ovos ou larvas, produzindo em alguns casos a destruição do tecido. De acordo com Zumpt (1965) Guimarães et al. (1983), Neves (1983) e Guimarães e Papavero (1999), algumas espécies de moscas causam miíases primárias, onde suas larvas desenvolvem-se em tecido vivo, chamadas de biontófagas; outras espécies causam miíases

secundárias, pois suas larvas necrobiontófagas desenvolvem-se em tecido necrosado (morto), mas no hospedeiro vivo, e ainda, existem espécies cujas larvas são necrófagas e desenvolvem-se em tecido morto (matéria orgânica em decomposição).

Algumas espécies de moscas apresentam grande importância para a Entomologia Forense, pois possuem especial atração por tecido morto. Esta ciência se caracteriza por estudar a fauna de insetos e outros artrópodes associados a eventos criminais, com o objetivo de investigar e descobrir informações úteis para a datação do intervalo pós-morte - IPM (Nuorteva 1977; Keh 1985; Smith 1986; Catts e Goff 1992).

Segundo diversos autores, os muscóides são os primeiros insetos a chegarem aos cadáveres e desta forma podem ovipor logo após encontrá-lo (Smith 1986; Carvalho et al. 2000). Além disso, as larvas destes insetos desempenham uma importante função ecológica, sendo responsáveis por cerca de 90% da degradação da massa corpórea (Salviano et al. 1996) e podem ser encontradas na maioria dos cadáveres investigados (Souza 1994; Salviano et al. 1994; Oliveira-Costa 2003). Acredita-se que a decomposição do cadáver é mais rápida quando ocorre na presença de insetos (Payne 1965; Jirón e Cartín 1981).

A aplicação mais comum dos insetos na entomologia forense é a estimativa do intervalo pós-morte, que é o intervalo de tempo entre a morte e quando o corpo é encontrado. Isso pode ser determinado através do período mínimo de atividade do inseto no corpo em decomposição. Do mesmo modo, pode sugerir movimentações do cadáver após a morte, avaliação de ferimentos feitos no corpo, relacionar causas e circunstâncias em que ocorreu a morte, comparar um suspeito à cena do crime e, mais recentemente, na investigação de substâncias tóxicas (Catts e Goff 1992; Anderson 1997; Benecke 1998; Carvalho e Linhares 2001).

Algumas vezes, quando os tecidos ou líquidos corpóreos não estão mais disponíveis, imaturos de dípteros muscóides podem ser utilizados como fonte de material para a determinação de presença de substâncias tóxicas, drogas e até mesmo fármacos. Isto se deve ao fato de que tais organismos não metabolizam essas substâncias e estas permanecem nos tecidos, podendo ser identificadas muitos dias e até mesmo anos após a morte (Goff et al. 1989; Goff e Lord 1994; Introna et al. 2001; Campobasso et al. 2004; Oliveira et al. 2009).

De acordo com Bourel et al. (2003), embora os insetos ainda não sejam amplamente utilizados na determinação do intervalo pós-morte, estes devem ser

usados para complementar às técnicas tradicionais, que se tornam imprecisas à medida que este intervalo aumenta. Os métodos histológicos, químicos, bacteriológicos e fenômenos cadavéricos também são utilizados por legistas para a determinação do intervalo pós-morte. No entanto, 72-96 horas após a morte, os insetos servem como o instrumento de maior precisão para a estimativa do intervalo pós-morte (Kashyap e Pillai 1989).

Para que estas avaliações sejam feitas de forma correta é necessário o conhecimento da morfologia externa dos estágios imaturos depositados por estas moscas, pois, em algumas situações estes são as únicas evidências que restam nas carcaças (Smith 1986; Anderson 1999; Byrd e Castner 2000). Assim, os ovos, as larvas e as pupas de moscas que são encontrados nos cadáveres tornam-se mais um instrumento para auxiliar peritos e investigadores criminais durante as investigações jurídicas (Smith 1986).

No entanto, a diferenciação morfológica dos imaturos é muito difícil, uma vez que as espécies possuem características semelhantes, sendo praticamente indistinguíveis a olho nu e em alguns casos até mesmo através da microscopia óptica. Além disso, as chaves dicotômicas para identificação de imaturos de dípteros muscóides de diversas espécies de importância sanitária e forense são inexistentes na literatura.

Atualmente, os pesquisadores reconhecem que faltam observações sistemáticas que permitam o uso de insetos como indicadores do intervalo pós-morte, principalmente na Região Neotropical, onde a identificação de insetos associados a carcaças é escassa e tem recebido pouca atenção no Brasil.

2. Revisão de Literatura

2.1 – Os Insetos e a Entomologia Forense

Os insetos correspondem ao grupo de ser vivo mais diversificado e numeroso do planeta. São cerca de um milhão de espécies já descritas e acredita-se que para cada espécie descrita, outras cinco ainda sejam desconhecidas (Castner 2000).

Entomologia Forense é o estudo dos insetos e outros artrópodes associados a eventos criminais, com o objetivo de fornecer informações úteis à investigação (Keh 1985). Pode ser subdividida em três áreas: Urbana (abrange os insetos que afetam o homem e seu ambiente); Pragas de produtos armazenados (relacionada com insetos ou parte deles que são encontrados contaminando alimentos, por isso possuem grande importância econômica); Médico-Legal (relacionada com os componentes criminais do sistema legal, enfocando os insetos necrófagos) (Lord e Stevenson 1986).

Dentre os animais que participam na decomposição de cadáveres, os insetos também se destacam, pois algumas espécies são capazes de colonizar rapidamente diversos habitats devido a sua atração pelo odor exalado durante o processo de decomposição e ao fato de serem ágeis e bons voadores.

Recentemente, muitos estudos relacionados a entomofauna buscam definir grupos de insetos como indicadores forenses. Muitas espécies de Diptera pertencentes às famílias Calliphoridae, Sarcophagidae, Fanniidae, Muscidae, Drosophilidae, Phoridae e Phiophilidae têm sido associadas a corpos em decomposição por diversos pesquisadores de diferentes institutos de investigação criminal e de pesquisa (Smith 1986; Oliva 1997).

A definição de espécies indicadoras forenses é muito importante, uma vez que a maioria dos sinais da decomposição ocorre entre as primeiras 72-96 horas após a morte e durante esse período, o cadáver sofre alterações provocadas por variáveis intrínsecas ao próprio corpo e relacionadas ao meio ambiente (Henssge et al. 2000). Passado esse período e depois que a temperatura do corpo se iguala a

temperatura ambiente, assim como outros parâmetros avaliados, como rigidez cadavérica, mancha abdominal e livores se perdem, somente os insetos são capazes de determinar com precisão quando a morte ocorreu (Kashyap e Pillai 1989). Quando um corpo é encontrado dias ou semanas após a morte, em estágio avançado de decomposição, os métodos químicos, físicos e histológicos não são mais apropriados para determinar o intervalo pós-morte (Amendt et al. 2004).

2.2 – Família Calliphoridae

A família Calliphoridae é representada por 130 gêneros correspondendo a 1000 espécies no mundo (Greenberg e Kunich 2002). Somente no Novo Mundo, esta família está representada por 20 espécies endêmicas e 4 introduzidas, distribuídas em 7 gêneros: *Chloroprocta*, *Cochliomyia*, *Compsomyops*, *Chrysomya*, *Hemilucilia*, *Lucilia* e *Paralucilia*. De acordo com Baumgartner e Greenberg (1984), as quatro espécies de moscas do gênero *Chrysomya* que foram introduzidas nas Américas são *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1843), sendo que esta última não é encontrada no Brasil. Estas três primeiras espécies originalmente ocorriam na África e a última na Ásia Oriental e Austrália (Baumgartner 1993), representando as moscas-varejeiras mais abundantes e principais vetores de patógenos (Greenberg 1973). Segundo Prado e Guimarães (1982), a data provável da introdução foi calculada em 1975, coincidindo com a chegada de refugiados africanos, oriundos de Angola e Moçambique, cujos barcos aportaram no litoral sul do Brasil e atualmente, estas moscas encontram-se amplamente distribuídas por todo o Brasil.

As moscas varejeiras desempenham um papel muito importante, pois buscam preferencialmente a matéria orgânica animal em decomposição para se alimentar e fazer postura, apresentando grande importância para a entomologia forense (Norris 1965; Moura et al. 1997; Carvalho et al. 2000). Apesar disso, Ferreira et al. (1995) coletaram representantes dessas espécies sendo atraídas por material vegetal em decomposição em um pomar em Goiânia, Brasil. No entanto, esses autores ressaltam que a região onde o pomar está localizado encontra-se sob grande influência antrópica, com presença de casas, lanchonetes, açougue e outros locais que poderiam estar servindo para manutenção do ciclo de vida dessas espécies.

O ciclo de vida e habitat é bastante diversificado, até mesmo dentro do próprio gênero (Norris 1965). As moscas desse gênero colocam suas posturas em matéria orgânica animal em decomposição, pois são capazes de detectar o odor da putrefação a quilômetros de distância. Algumas substâncias químicas derivadas da amônia e sulfito são liberadas durante o processo de decomposição e auxiliam na formação da nuvem atrativa para as moscas (Hall 1995).

O vôo das moscas é orientado pelo odor e ao chegar ao local da carcaça, às fêmeas procuram por orifícios naturais ou artificiais, causados por facadas ou tiros e ovipõe cerca de 300 ovos por postura. A grande massa de ovos presente nos cadáveres é o resultado da tendência das fêmeas de ovipor umas próximas as outras, sejam da mesma espécie ou de espécies distintas (Cragg 1955; Browne 1958).

Os ovos dos califorídeos são indistinguíveis a olho nu ou através da microscopia óptica. De acordo com Greenberg and Kunich (2002), características como formato da borda, das ilhas e como a área mediana termina próxima a micrópila são diagnósticas para distinguir ovos das espécies de califorídeos, mas essas características só podem ser visualizadas em detalhes através da microscopia eletrônica de varredura. Erzinclioglu (1989) propõe um esquema dos ovos de dípteros califorídeos através da microscopia óptica, a partir do qual pode-se localizar as principais características destacadas por estes autores (figura 2.2.1).

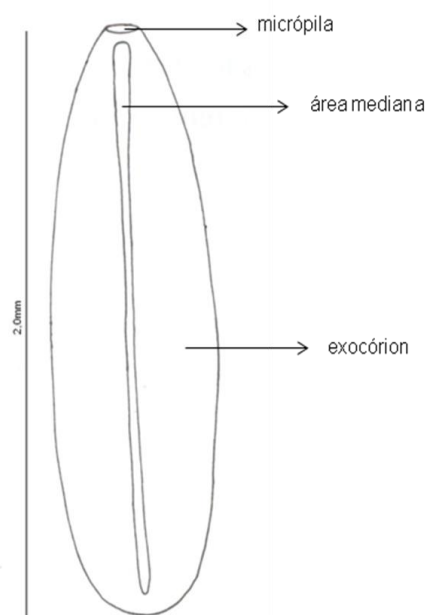


Figura 2.2.1: Esquema do ovo de moscas do gênero *Chrysomya*, mostrando micrópila, área mediana e exocócion.

Imagem: Erzinclioglu (1989)

Algumas horas depois da postura, as larvas eclodem dos ovos e começam a se alimentar imediatamente da matéria orgânica disponível no local da postura. Segundo Ferrar (1987), a dieta das larvas de califorídeos pode variar de hábitos saprófagos em lixo, carcaças, parasitas facultativos ou obrigatórios de aves e mamíferos.

As larvas possuem corpo vermiforme, com região anterior afilada e posterior truncada. Esse formato é o mais eficiente para que as larvas possam penetrar nos tecidos para se alimentar e, posteriormente se enterrar para pupar (Greenberg e Kunich 2002). Queiroz et al. (1997) descreveram as larvas de *C. albiceps* e destacam as principais características utilizadas para diferenciar os instares larvais, como região cefálica, espinhos do colar cefálico, espiráculo anterior, segmento anal e espiráculo posterior (figura 2.2.2).

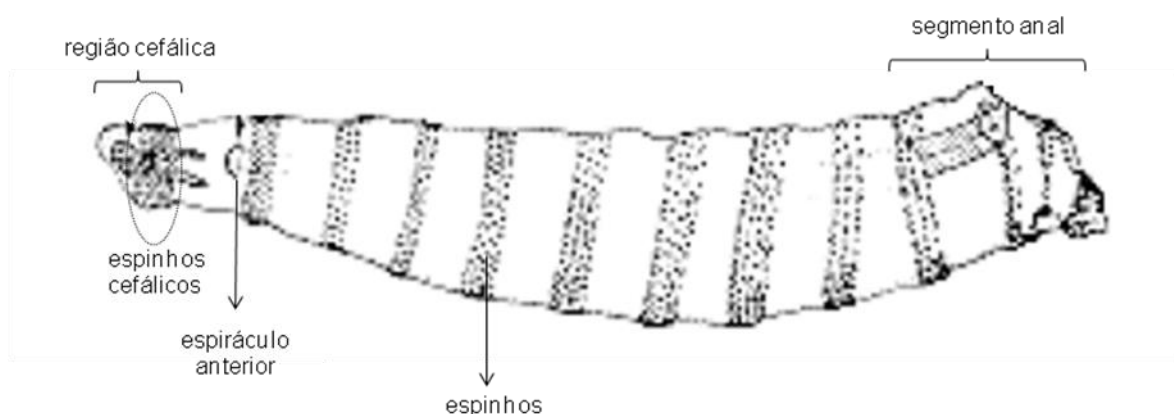


Figura 2.2.2: Esquema da larva de mosca do gênero *Chrysomya*, mostrando região cefálica, espinhos cefálicos, espiráculo anterior, espinhos entre os segmentos e segmento anal.

Imagem: Queiroz et al. (1997)

A duração dos três instares larvais também é variável devido a diversos fatores, como disponibilidade de alimento, competição entre as espécies na carcaça, temperatura, pluviosidade, umidade, dentre outros. Durante esse período de vida, as larvas se alimentam vorazmente, pois precisam adquirir o máximo de nutrientes necessários a metamorfose ocorrida na fase seguinte. Além disso, a competição na carcaça é muito intensa, seja com outras espécies de moscas ou outros insetos, assim como animais carnívoros.

Exceto por algumas características bastante peculiares, as larvas de califorídeos são muito parecidas entre si, gerando a necessidade da criação desses

imaturos até a fase adulta para que a identificação precisa seja realizada através das chaves dicotômicas disponíveis para adultos.

Após atingir seu estágio máximo de crescimento, as larvas abandonam o alimento e dispersam para se enterrar no solo, que é considerado um local seguro para pupação. O pupário tem o formato de barril e é bastante parecido com a larva de terceiro instar, pois é formado a partir do endurecimento e quitinização da cutícula do instar anterior (figura 2.2.3). Durante o processo de pupação, há o aumento da produção do hormônio ecdisona que é responsável por induzir os discos imaginais a formar estruturas essenciais ao inseto adulto.

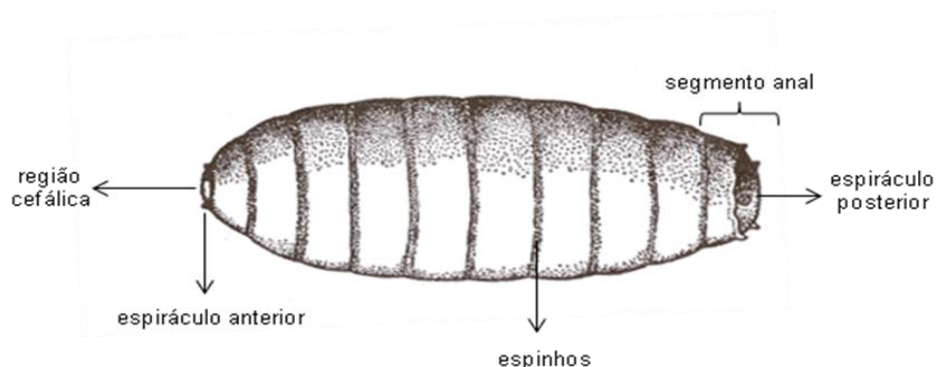


Figura 2.2.3: Esquema do pupário de mosca do gênero *Chrysomya*, mostrando região cefálica, espiráculo anterior, espinhos entre os segmentos, segmento anal e espiráculo posterior.

Imagem: Serra-Freire e Mello (2006)

Passados alguns dias como pupa, ocorre a emergência do adulto. O conhecimento da duração de cada estágio de vida é essencial para que essas moscas sejam utilizadas como fonte de informações para a perícia criminal, uma vez que esses dados, aliados a outras informações podem auxiliar na elucidação de um crime.

2.3 – Gênero *Chrysomya* e as Espécies de Importância Forense Introduzidas no Brasil

A elevada taxa de dispersão do gênero *Chrysomya* (2-3 km/dia) e o seu rápido crescimento populacional, que possivelmente se dá devido a sua alta capacidade adaptativa, têm suprimido populações de espécies nativas do continente americano (Guimarães et al. 1979). Baumgartner e Greenberg (1984) evidenciaram que, no Peru, a população de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) sofreu uma

redução, em 18 meses, de 89% para 0,2% após a invasão de *C. albiceps* e *C. putoria*.

C. albiceps pode ser considerada como a espécie de mosca mais importante para a entomologia forense, uma vez que sempre se destaca entre os dípteros coletados, seja usando como isca carcaças de animais, ou em coletas em cadáveres no Instituto Médico Legal, em Campinas, SP e Rio de Janeiro, RJ (Salviano et al. 1994; Salviano et al. 1996; Carvalho et al. 2000; Greenberg e Kunich 2002). Alguns autores indicam esta espécie como pioneira a chegar à carcaça. Na África do Sul, Braack e Retief (1986) relataram que, no verão, *C. albiceps* foi observada chegando ao cadáver poucos minutos após a morte, no entanto, só ovipondo no dia seguinte. No inverno, estes mesmos autores relataram o atraso de uma semana na chegada e postura dessa espécie. No Brasil, Carvalho et al. (2004) observaram esta espécie visitando a carcaça no segundo dia, no início da fase de inchamento e esta, junto com as outras espécies do mesmo gênero, foram as únicas a se desenvolverem na carcaça de porco.

A carcaça oferece recursos limitados gerando intensa competição. Desta forma, algumas espécies, como *C. albiceps* apresentam comportamento canibal ou predador, sendo capazes até mesmo de alterar a composição das espécies presentes nos cadáveres (Ullyett 1950; Faria et al. 2004). Faria et al. (1999), Andrade et al. (2002) e Reigada e Godoy (2005) observaram larvas de terceiro instar dessa espécie atacando larvas do mesmo estágio de *C. macellaria*, *C. putoria* e *C. megacephala*, indicando o impacto negativo da espécie predadora em relação as presas. Em estudos de laboratório, Gião e Godoy (2007) observaram que, na presença de larvas de terceiro instar dessa espécie, as fêmeas de *C. megacephala* não realizam posturas.

No âmbito da saúde pública, este díptero muscóide se destaca por ser importante veiculador de patógenos e apresentar larvas que são causadoras de miíases secundárias (Queiroz et al. 1997; Guimarães e Papavero 1999).

C. putoria apresenta alta densidade populacional e alto nível de sinantropia, com grande potencial de produzir miíases secundárias (James 1970; Linhares 1981). Esta espécie foi utilizada na determinação da presença de drogas em cadáveres, uma vez que é facilmente encontrada colonizando os mesmos (Carvalho e Linhares 2001). Além disso, Carvalho et al. (2000) consideraram como uma das espécies de califorídeos que atua como indicador de intervalo pós-morte e indicador forense para a região de Campinas, SP. Esta mosca, juntamente com *C. albiceps* foi a espécie

mais coletada em necrotério em Uganda, tendo colonizado 22 dos 33 corpos presentes no local (Lothe 1964).

Esta é uma espécie cosmopolita e apresenta preferência alimentar muito ampla, variando de fezes de animal e humanos, frutas e carcaças. São consideradas também espécies endófilas, pois frequentemente entram nas casas em busca de alimentos e locais para posturas (Baumgartner e Greenberg 1984).

C. megacephala é considerada a espécie de muscóide mais frequente nos centros urbanos (Guimarães et al. 1979; Prado e Guimarães 1982), pois se desenvolve com facilidade em fezes de humanos (Laurence 1981), carne em decomposição, gêneros alimentícios (Baumgartner e Greenberg 1984) e são bastante atraídas por fígado bovino e peixe (d'Almeida 1993). De acordo com Valgode et al. (1997), a elevada prevalência dessas moscas com relação às outras espécies aumenta os riscos para a saúde pública, pois produzem miíases facultativas no homem e nos animais (Zumpt 1965; Guimarães e Papavero 1999; Sukontason et al. 2005a).

Esta espécie é importante para a entomologia forense, pois foi observada por diversos autores visitando e ovipondo em carcaças de diferentes animais. No Havaí, em uma área de floresta tropical, foi a primeira espécie a chegar e ovipor em carcaças de gatos e porcos do mato, conforme relatado por Tullis e Goff (1987). No Brasil, foi encontrada colonizando cadáveres, poucos dias após a morte, além de carcaças de porcos (Carvalho et al. 2004; Oliveira-Costa e Mello-Patiu 2004).

Essas espécies do gênero *Chrysomya* são atraídas por matéria orgânica em decomposição e colocam suas posturas nos cadáveres. No entanto, as fases imaturas são praticamente indistinguíveis, gerando assim erros na datação do intervalo pós-morte.

2.4 – Identificação de Dípteros Muscóides

Tradicionalmente, a identificação de dípteros muscóides ocorre baseada em caracteres morfológicos dos adultos, no entanto, a maioria dos espécimes encontrados junto aos cadáveres corresponde aos imaturos. Os estudos visando a identificação das espécies enquanto ainda estão nas suas fases imaturas são poucos e basicamente restritos a insetos de outras regiões do mundo (Greenberg e Szyska 1984; Queiroz e Carvalho 1987; Erzindlioglu 1989; Liu e Greenberg 1989; Queiroz et al. 1997; Oliveira et al. 2007).

Sendo assim, rotineiramente, criam-se estes imaturos até que alcancem a fase adulta para a identificação baseada em chaves dicotômicas clássicas específicas para esse estágio de vida (Mello 2003; Carvalho e Mello-Patiu 2008). No entanto, caso os fatores abióticos, como luminosidade, temperatura e umidade não sejam mantidos similares aqueles da região de onde as larvas foram retiradas, podem ocorrer imprecisões com relação à determinação do intervalo pós-morte, além da morte dos ovos e larvas. Em alguns casos, os espécimes são coletados no local do crime por pessoas não treinadas que matam e fixam o material, impedindo a finalização do seu desenvolvimento e, conseqüentemente, a identificação das espécies envolvidas no caso.

Nos casos em que a entomologia forense é aplicada, se faz necessário a identificação rápida e precisa das espécies envolvidas e a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) poderá facilitar a identificação e permitir a determinação do intervalo pós-morte.

Atualmente, esta técnica vem sendo utilizada por diversos autores na identificação de ovos, larvas e pupas de dípteros muscóides (Kitching 1976; Greenberg e Szyska 1984; Liu e Greenberg 1989; Peterson e Newman 1991; Greenberg e Singh 1995; Sukontason et al. 2004b, 2005b e 2006; Thyssen e Linhares 2007; Mendonça et al. 2008).

A microscopia eletrônica de varredura tem se destacado por permitir uma melhor visualização da morfologia externa dos imaturos, que possuem grande valor diagnóstico na entomologia forense, facilitando assim uma identificação mais precisa das inúmeras espécies de moscas. No entanto, esses trabalhos são realizados principalmente com espécies australianas (Kitching 1976), britânicas (Erzincliglu 1989), peruanas (Greenberg e Szyska 1984), norte-americanas (Liu e Greenberg 1989; Greenberg e Singh 1995) e tailandesas (Sukontason et al. 2004a e 2004b, 2005b e 2006). Greenberg e Kunich (2002) reuniram chaves dicotômicas de diversas espécies de imaturos e adultos de moscas do mundo, conjugado com informações relativas à biologia das principais espécies. No entanto, nenhuma chave é fornecida com espécies coletas no Brasil, apesar de diversos estudos com espécies da família Sarcophagidae (Lopes e Rios Leite 1987, 1989; Rios Leite e Lopes 1987, 1989) É importante a realização de estudos em diversas regiões do mundo, uma vez que de acordo com Greenberg e Singh (1995) pode haver diferenças morfológicas entre diversas populações dos dípteros analisados, principalmente em amostras distantes geograficamente e temporalmente.

De acordo com Carvalho et al. (2004), os adultos das famílias Calliphoridae são os colonizadores iniciais das carcaças, chegando ao local logo depois da sua exposição. Desta forma, se for feita corretamente a identificação dos imaturos, combinada aos relatos presentes na literatura sobre o tempo de desenvolvimento embrionário de cada espécie e as condições ambientais do local, será possível o cálculo aproximado do início da colonização (Oliveira-Costa e Mello-Patiu 2004).

3. Objetivo Geral

Fornecer subsídios para a identificação dos estágios imaturos de dípteros muscóides da família Calliphoridae de importância sanitária e forense através da microscopia eletrônica de varredura.

4. Objetivos Específicos

Caracterizar a micrópila, formato da linha e das ilhas da área mediana e células do exocócion dos ovos de califorídeos das espécies *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala* através da microscopia eletrônica de varredura.

Caracterizar o tegumento, padrão de espinhos, região cefálica (antena, palpos maxilares e cristas orais), espinhos do colar cefálico, espiráculos anteriores e posteriores, peritremas e placas espiraculares das larvas e pupários de califorídeos das espécies *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala* através da microscopia eletrônica de varredura.

5. Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, Setor de Entomologia Médica e Forense do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz.

Neste estudo foram utilizados ovos, larvas de primeiro, segundo e terceiro instar e pupários dos dípteros muscóides das espécies *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala*.

Os muscóides foram provenientes das colônias mantidas em laboratório, a partir de adultos capturados no campus da Fundação Oswaldo Cruz, no bairro de Manguinhos, Rio de Janeiro, através de armadilhas descritas em Barbosa et al. (2009).

Os insetos foram capturados utilizando-se como isca para atrair as moscas, carcaças de porcos domésticos (*Sus scrofa*), com aproximadamente 15 kg. O porco recém-morto foi adquirido de comerciantes que vendem diretamente para o consumo humano e colocado dentro da armadilha, já utilizada em experimentos de Entomologia Forense no campus da Fiocruz. A armadilha consistia em uma estrutura metálica, confeccionada com vergalhão, sob a forma piramidal, com 1,50m de altura e 1,00m de base, coberta por um tecido de algodão preto, com a parte inferior confeccionada com tecido de náilon branco, para permitir a entrada de luz. Na parte superior da pirâmide, foi encaixado um tubo de PVC com uma janela central coberta por náilon que serviu como coletor dos insetos. Sob a armadilha, diretamente no chão era colocada a carcaça do porco e sobre esta, uma grade metálica cúbica (70 cm x 70 cm x 50 cm) a fim de evitar a ação de animais carniceiros que pudessem remover a carcaça (figura 5.1).

Os insetos adultos capturados foram levados ao laboratório, anestesiados em congelador por cinco minutos e posteriormente identificados através de análise

morfológica utilizando chaves dicotômicas clássicas (Mello 2003; Carvalho e Mello-Patiu 2008).

Depois, as espécies de interesse foram transferidas para gaiolas de madeira (30 cm x 30 cm x 30 cm) revestidas com tela de náilon para criação dos insetos (figura 5.2). Durante três dias, os dípteros receberam somente água e açúcar que foram mantidos nas gaiolas por todo o tempo da criação. A partir do quarto dia, foi introduzida a carne bovina moída putrefata que serviu como fonte de alimentação, estimulante para postura e substrato para a oviposição. As gaiolas eram mantidas em temperatura ambiente, 24 – 28 °C e com umidade relativa entre 60 ± 10%.



Figura 5.1: Armadilha utilizada para coleta de dípteros muscóides.

Imagem: Margareth M. C. Queiroz



Figura 5.2: Gaiola utilizada na manutenção de dípteros muscóides no laboratório.

Imagem: Paloma M. Mendonça

As posturas obtidas foram transferidas para uma dieta que consistia de carne bovina moída em início de decomposição, na proporção de 1g de dieta para cada larva. Esta dieta foi colocada em recipientes plásticos (5 cm x 7 cm) e estes foram introduzidos em outros recipientes maiores (10 cm x 10 cm), contendo vermiculita como substrato de pupação. Este último foi coberto com tecido de náilon preso por elástico (figura 5.3). Após a emergência, os adultos foram sexados e alocados em gaiolas como as descritas anteriormente.



Figura 5.3: Recipientes plásticos para criação de imaturos de dípteros muscóides: menor contendo dieta e maior contendo a vermiculita.

Imagem: André C. L. Silva

Aos novos indivíduos emergidos foram oferecidos água e açúcar e a partir do quarto dia de vida dos adultos, também foi acrescentada a carne bovina moída putrefata, durante quatro dias, visando o desenvolvimento dos ovaríolos. A carne foi reintroduzida no 14^o dia pós-emergência para servir como substrato para oviposição. Os experimentos foram realizados com imaturos pertencentes a segunda e terceira geração (F₂ e F₃) criada em laboratório.

A postura obtida foi dividida em duas partes. Da primeira parte foram retirados os ovos e o restante foi criado conforme a rotina da colônia, a fim de que fosse possível a retirada das larvas a cada instar. Para a identificação dos instares larvais, foram observadas as aberturas espiraculares em microscópio estereoscópio.

As larvas foram mortas em água quente (75-80 °C) por cinco minutos. Ovos, larvas de todos os instares e pupários foram lavados em solução de hidróxido de sódio a 2% durante cinco minutos com o objetivo de remover todos os resíduos de dieta ou vermiculita presente na superfície dos espécimes.

Os ovos e as larvas foram fixadas com uma solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7.2, posteriormente foram lavadas três

vezes durante cinco minutos neste mesmo tampão. Depois, foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão, mantidas por uma hora no escuro, em seguida o excesso do tetróxido de ósmio foi retirado através de lavagens no tampão cacodilato de sódio 0,1M. Após este procedimento, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (7,5, 15, 30, 50, 70, 90 e 100%) permanecendo 10 minutos em cada concentração. Ao final desta etapa, as amostras foram submetidas ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂ superseco em aparelho de Balzers (Hayat 1970).

Os pupários foram mantidos em refrigerador por aproximadamente dez minutos, para que as pupas em seu interior morressem e não foram submetidos a nenhum processo de fixação, pós-fixação e secagem, uma vez que a cutícula é formada por quitina que é uma substância rígida, dispensando a necessidade da fixação.

Todos os imaturos (ovos, larvas e pupários) foram aderidos em fita dupla-face, montados em suportes metálicos e cobertos por uma fina camada de ouro (20-30nm) para que permitisse a visualização em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV da Plataforma de Microscopia do Instituto Oswaldo Cruz.

Neste experimento foram utilizados aproximadamente 30 exemplares de cada estágio correspondente a cada espécie de dípteros muscóides. As micrografias obtidas no microscópio foram transferidas diretamente ao computador. A nomenclatura utilizada para a identificação dos imaturos segue a proposta por McAlpine (1981) e Margaritis (1985).

6. Resultados

Na tabela 6.1 e quadros 6.1 e 6.2 encontram-se o resumo comparativo dos resultados referentes a ovos, larvas de primeiro, segundo e terceiro instar e pupários, respectivamente, das espécies do gênero *Chrysomya* analisados.

Tabela 6.1: Resumo comparativo dos resultados referentes a ovos de *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala* através da microscopia eletrônica de varredura.

	Área Mediana			Células coriônicas	Micrópila
	Extremidade anterior	Extremidade posterior	Ilhas		
<i>Chrysomya albiceps</i>	bifurcada	Afilada	sem junções com orifícios	bordas lisas	ornamentações tipo projeção
<i>Chrysomya putoria</i>	arredondada	Afilada	sem junções sem orifícios	bordas destacadas	ornamentações tipo depressão
<i>Chrysomya megacephala</i>	bifurcada	Arredondada	sem junções sem orifícios	bordas lisas	ornamentações tipo projeção

Quadro 6.1: Resumo comparativo dos resultados referentes a larvas de primeiro, segundo e terceiro instar de *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala* através da microscopia eletrônica de varredura.

	Instar	Corpo		Região cefálica			Tegumento	Espinhos entre segmentos	Espiráculo		Peritrema
		Anterior	Posterior	Antenas	Palpos maxilares	Espinhos do colar			Anterior	Posterior	
<i>Chrysomya albiceps</i>	1º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	afilados (ventral) robustos (dorsal)	liso	ponta afilada	Ausente	1 abertura	não visível
	2º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	2 ou 3 pontas robustos	tubérculos coroa de espinhos	robustos	10-12 ramificações	2 aberturas	aberto convexo
	3º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	2 ou 3 pontas robustos	protuberâncias e tubérculos desenvolvidos	robustos	10-12 ramificações	3 aberturas	aberto convexo
<i>Chrysomya putoria</i>	1º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	achatados em placas	liso	pouco desenvolvidos	Ausente	1 abertura	não visível
	2º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	torção diagonal	liso	1 a 3 pontas	11-12 ramificações	2 aberturas	aberto
	3º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	torção diagonal	liso	1 a 3 pontas	11-12 ramificações	3 aberturas	aberto

<i>Chrysomya megacephala</i>	1º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	1 ou 2 pontas robustos	liso	Pouco desenvolvidos	Ausente	1 abertura	não visível
	2º	afilado	truncado	dorsal abaulada	ventral 5 papilas	Achatados e robustos	liso	1 ou 2 pontas	10 ramificações	2 aberturas	aberto
	3º	afilado	truncado	Dorsal abaulada	Ventral 5 papilas	Achatados e robustos	liso	1 ou 2 pontas	10 ramificações	3 aberturas	aberto

Quadro 6.2: Resumo comparativo dos resultados referentes aos pupários de *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya putoria* e *Chrysomya megacephala* através da microscopia eletrônica de varredura.

	Corpo		Região cefálica			Tegumento	Espinhas entre segmentos	Espiráculo		Peritrema
	Anterior	Posterior	Antenas	Palpos maxilares	Espinhas do colar			Anterior	Posterior	
<i>Chrysomya albiceps</i>	retraído	truncado	não visível	não visível	não visível	protuberâncias evidentes tubérculos curvados	poucos	10-12 ramificações	3 aberturas	aberto
<i>Chrysomya putoria</i>	retraído	truncado	não visível	não visível	não visível	liso	poucos	11-12 ramificações	3 aberturas	placa destacada
<i>Chrysomya megacephala</i>	retraído	truncado	não visível	não visível	não visível	dobras	poucos	10 ramificações	3 aberturas	placa destacada

6.1 - *Chrysomya albiceps*

6.1.1 - Ovos

O ovo desta espécie é alongado, de forma cilíndrica e apresenta a extremidade anterior mais afilada e a posterior mais arredondada (figura 6.1A). As células coriônicas são lisas, com bordas pouco delimitadas e possuem a forma poligonal (figura 6.1B). A linha mediana se estende por quase totalidade do comprimento do ovo e termina de forma afilada na extremidade posterior, enquanto na extremidade oposta, próxima a região da micrópila, esta linha termina bifurcada, em forma de Y (figura 6.1C e 6.1D). As ilhas localizadas dentro da linha mediana são projeções individuais e não apresentam anastomoses, mas alguns orifícios podem ser vistos (figura 6.1E). A micrópila é ornamentada, com o orifício de penetração do espermatozóide em posição central rodeado por pequenas projeções (figura 6.1F).

6.1.2 - Larvas de Primeiro Instar

O corpo da larva é composto por doze segmentos, sendo um cefálico, três torácicos e oito abdominais, ornamentados por fileiras de espinhos de diferentes tamanhos e formatos localizados no limite de cada segmento (figura 6.2A). Os espinhos que delimitam a região cefálica e o primeiro segmento torácico são afilados na região ventral e robustos na região dorsal (figura 6.2B).

A região cefálica é pouco desenvolvida e dividida longitudinalmente em duas regiões, gerando dois lobos. Em cada lobo, encontram-se, as antenas na porção dorsal e, ventralmente, os palpos maxilares (figura 6.2B). Os palpos maxilares são compostos por cinco estruturas sob a forma de papilas (figura 6.2C). Ainda na região cefálica, é possível observar os dentes supra bucais e o aparelho bucal (figura 6.2D).

O tegumento que recobre o corpo da larva é liso sem a presença de tubérculos ou projeções. Os espiráculos anteriores ainda não podem ser visualizados neste instar por ainda estarem em processo de formação. Os espinhos localizados entre os segmentos do corpo da larva apresentam apenas uma ponta afilada.

A extremidade posterior é constituída por um par de tubérculos ventrais medianos, tubérculos anais e um par de espiráculos contendo apenas uma única abertura espiracular, fortemente sustentada pelos músculos espiraculares de sustentação (figura 6.2E e 6.2F).

6.1.3 - Larvas de Segundo Instar

O corpo da larva apresenta os segmentos intercalados por fileiras de espinhos mais desenvolvidos. Na região cefálica, as antenas e os palpos encontram-se mais desenvolvidos, sendo mais facilmente visualizados. Além deles, também é possível observar, com mais detalhes as cristas orais que se apresentam sob a forma de lâminas (figura 6.3A e 6.3B).

Os espinhos que delimitam a região cefálica são mais robustos com duas ou três pontas e dispostos em fileiras (figura 6.3C). Os espinhos que delimitam os outros segmentos são muito semelhantes aqueles observados na região cefálica, podendo apresentar também duas ou três pontas e disposição sob a forma de fileiras, no entanto, são menos robustos.

O tegumento encontra-se repleto de protuberâncias. Em cada segmento, são observadas estruturas denominadas tubérculos que estão organizados ventralmente em três pares (ventro-lateral, latero-ventral e ventro-mediano), sendo o par mais externo apresentando um segundo tubérculo em início de formação (figura 6.3D). Na extremidade de cada tubérculo são encontradas coroas de espinhos robustos e com a ponta bastante afilada (figura 6.3E).

O espiráculo anterior pode ser facilmente visualizado no segundo segmento larval ou primeiro segmento torácico, próximo a fileira de espinhos. Este espiráculo é composto por 10-12 ramificações espiraculares, cada uma com uma abertura na porção apical (figura 6.3F e 6.3G).

No último segmento larval pode ser observado um par de espiráculos posteriores, com duas aberturas cada e o peritrema aberto, além dos músculos de sustentação da placa espiracular. Este segmento apresenta ainda três pares de tubérculos dorsais (dorsal interno, mediano e externo) (figura 6.3H), três pares ventrais (ventral interno, mediano e externo) e um par de tubérculos anais.

6.1.4 - Larvas de Terceiro Instar

A larva possui uma região cefálica afilada e os segmentos do corpo bastante demarcados, onde podem ser visualizados os tubérculos mais desenvolvidos do que no instar anterior (figura 6.4A). As cristas orais apresentam semelhança morfológica com os instares anteriores e envolvem toda a região cefálica, assim como os espinhos que separam esta região no primeiro segmento torácico (figura 6.4B). Os

palpos e antenas estão totalmente desenvolvidos (figura 6.4C).

As protuberâncias que recobrem todo o tegumento do corpo da larva encontram-se bem visíveis, assim como os tubérculos simples e a fileira dupla. Nesse instar, é possível observar com mais clareza a coroa de espinhos presente no ápice dos tubérculos simples e duplos (figura 6.4D).

O espiráculo anterior é muito semelhante ao encontrado na larva de segundo instar, com 10-12 ramificações espiraculares (figura 6.4E). O segmento anal é curto, com tubérculos bastante desenvolvidos envolvendo a região das placas espiraculares (figura 6.4F). Nestas placas, o peritrema é aberto e situado em uma posição convexa na região médio-apical do disco espiracular, como no segundo instar (figura 6.4G). Os tubérculos dorsais (dorsal interno, mediano e externo) (figura 6.3H), ventrais (ventral interno, mediano e externo) e anais mais desenvolvidos. Como característica do terceiro instar, cada espiráculo é composto por três aberturas espiraculares com cicatrizes ecdisiais e músculos de sustentação mais desenvolvidos (figura 6.4H).

6.1.5 - Pupários

O pupário apresenta características muito semelhantes as da larva de terceiro instar (figura 6.5A). No entanto, os segmentos cefálicos são retraídos levando ao deslocamento do espiráculo anterior à porção mais anterior do pupário (figura 6.5B). Nenhuma estrutura da região cefálica pode ser visualizada. O espiráculo anterior também apresenta 10-12 ramificações espiraculares, com a abertura central em cada uma delas (figura 6.5C).

As protuberâncias que recobrem o tegumento são mais evidentes e os tubérculos são acentuadamente recurvados em direção a região posterior do pupário (figura 6.5D). A coroa de espinhos mantém-se intacta, ou seja, não apresenta enrugamentos como o restante dos tubérculos (figura 6.5E).

Os tubérculos do segmento anal permanecem rígidos, não se apresentando tão enrugados quanto aqueles localizados no restante do pupário (figura 6.5F). A placa espiracular é muito semelhante aquela observada na larva de terceiro instar, com o peritrema aberto e três aberturas espiraculares. Os tubérculos encontram-se mais desenvolvidos tanto os dorsais quanto os ventrais (figura 6.5G).

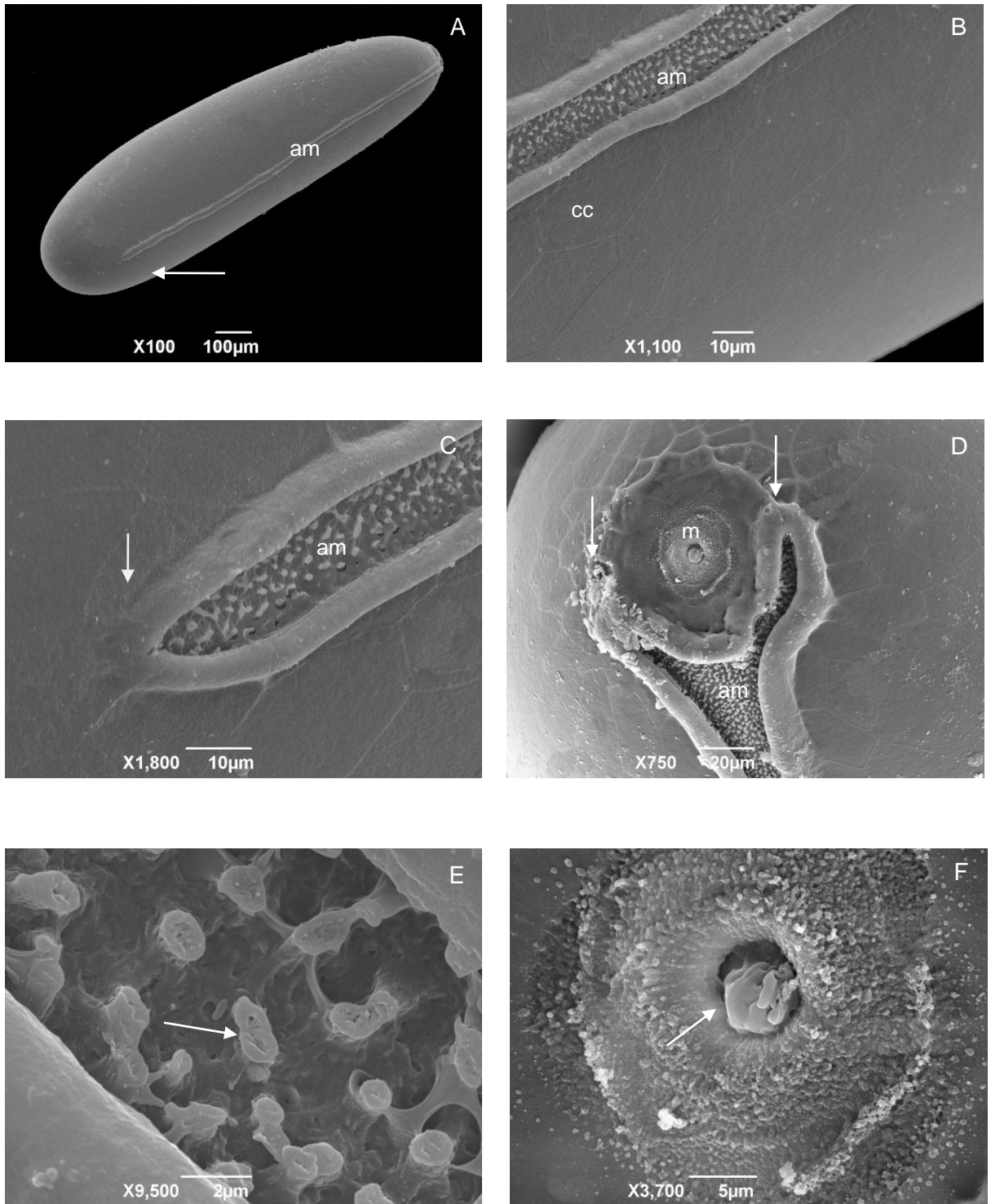


Figura 6.1: Micrografia eletrônica de varredura dos ovos de *Chrysomya albiceps*. A – Visão dorsal do ovo, porção posterior à esquerda (seta) e área mediana (am) ao longo do comprimento do ovo; B – Visão dorsal, área mediana (am) e as células coriônicas (cc); C – Porção final da área mediana (am) afilada (seta) próxima a extremidade posterior; D – Porção final da área mediana (am) bifurcada em forma de Y (setas) próxima a extremidade anterior e micrúpila (m); E – Ilhas da área mediana sem anastomoses, mas com orifícios (seta); F – Detalhe do orifício da micrúpila (seta).

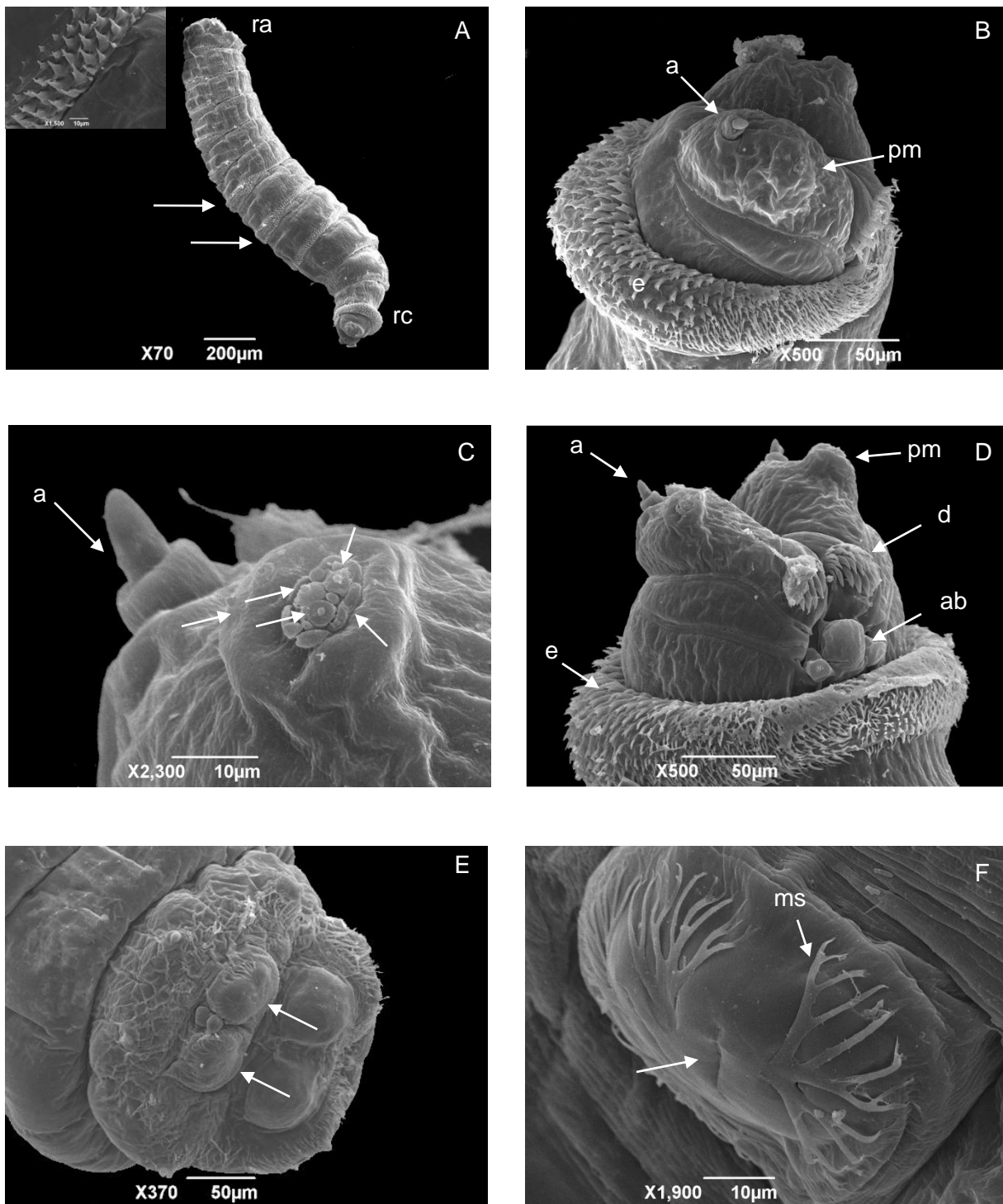


Figura 6.2: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de primeiro instar de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando fileiras de espinhos entre os segmentos (setas e detalhe), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm) e espinhos (e); C – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D – Visão geral da região cefálica, evidenciando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), dentes supra bucais (d) e o aparelho bucal (ab); E – Visão geral do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Detalhe do espiráculo posterior, mostrando a abertura espiracular (seta) e músculos de sustentação (ms).

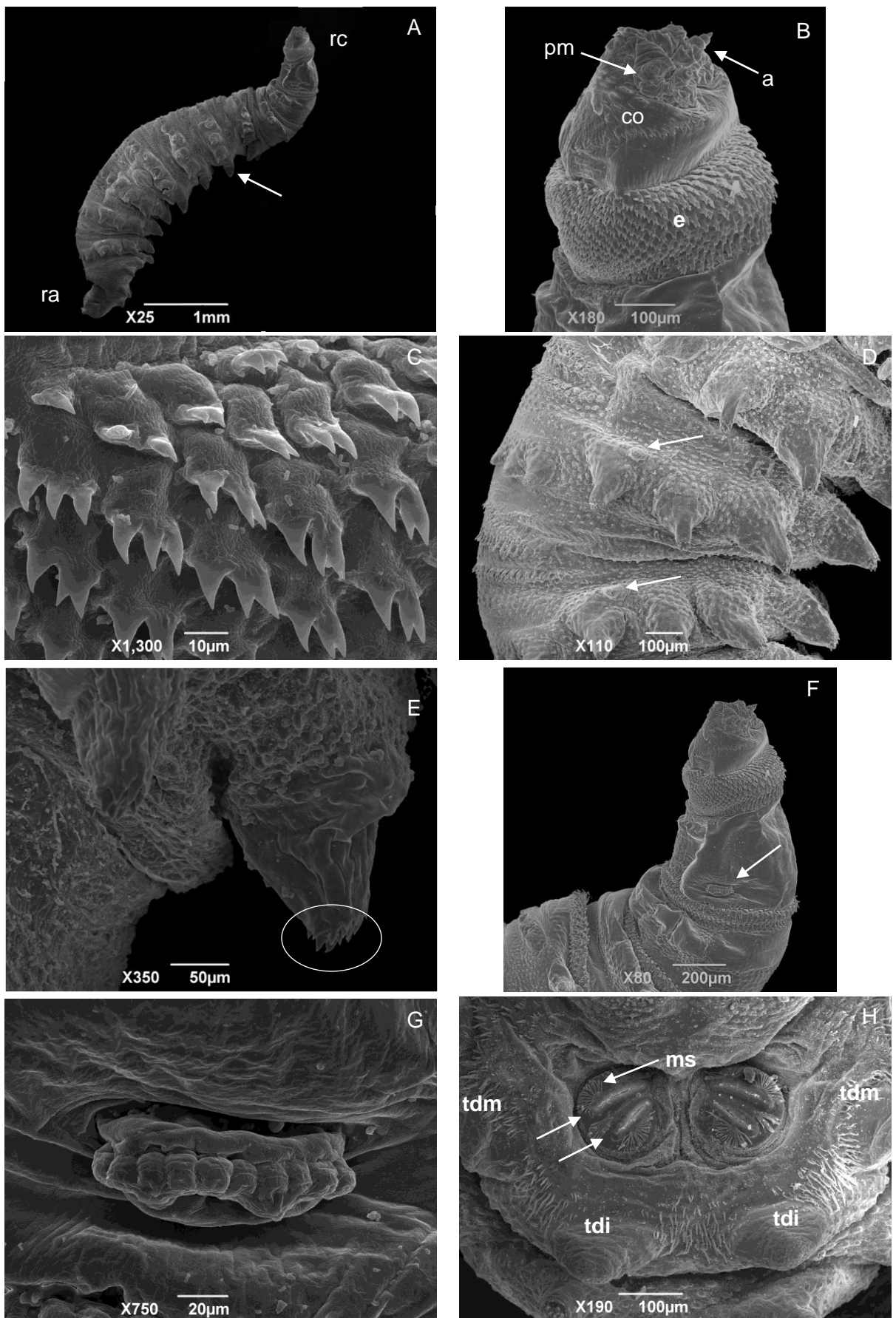


Figura 6.3: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando tubérculos (seta), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e) e cristas orais (co); C – Visão detalhada dos espinhos entre os segmentos do corpo da larva; D – Visão geral dos tubérculos, evidenciando a fileira de tubérculos duplos (setas); E – Visão detalhada do tubérculo, mostrando a coroa de espinhos no ápice (círculo); F – Visão geral da região anterior, mostrando o espiráculo anterior (seta); G – Detalhe do espiráculo anterior; H – Visão detalhada do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores com as duas aberturas espiraculares (setas), os músculos de sustentação (ms), os tubérculos dorsais internos (tdi) e tubérculos dorsais medianos (tdm).

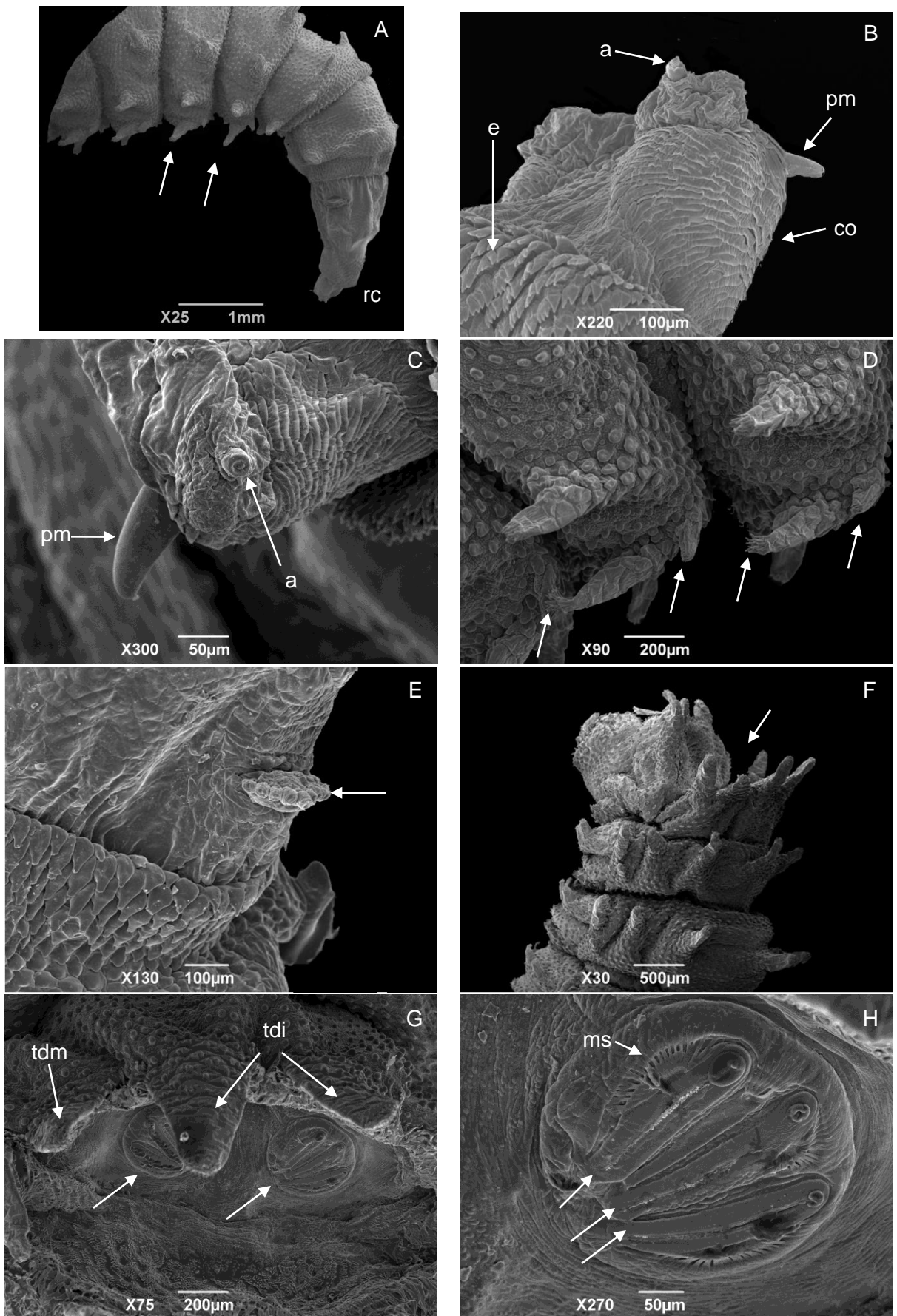


Figura 6.4: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de terceiro instar de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando tubérculos (setas) e região cefálica (rc); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e) e cristas orais (co); C – Visão detalhada da região cefálica, mostrando palpo maxilar (pm) e antena (a); D - Visão geral dos tubérculos, evidenciando a fileira de tubérculos duplos e a coroa de espinhos (setas); E – Detalhe do espiráculo anterior (seta); F – Visão geral do segmento anal, mostrando a localização das placas espiraculares (seta); G – Visão geral da placa espiracular, mostrando os espiráculos posteriores (setas), tubérculos dorsais internos (tdi) e tubérculo dorsal mediano (tdm); H – Visão detalhada do espiráculo posterior com as três aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms).

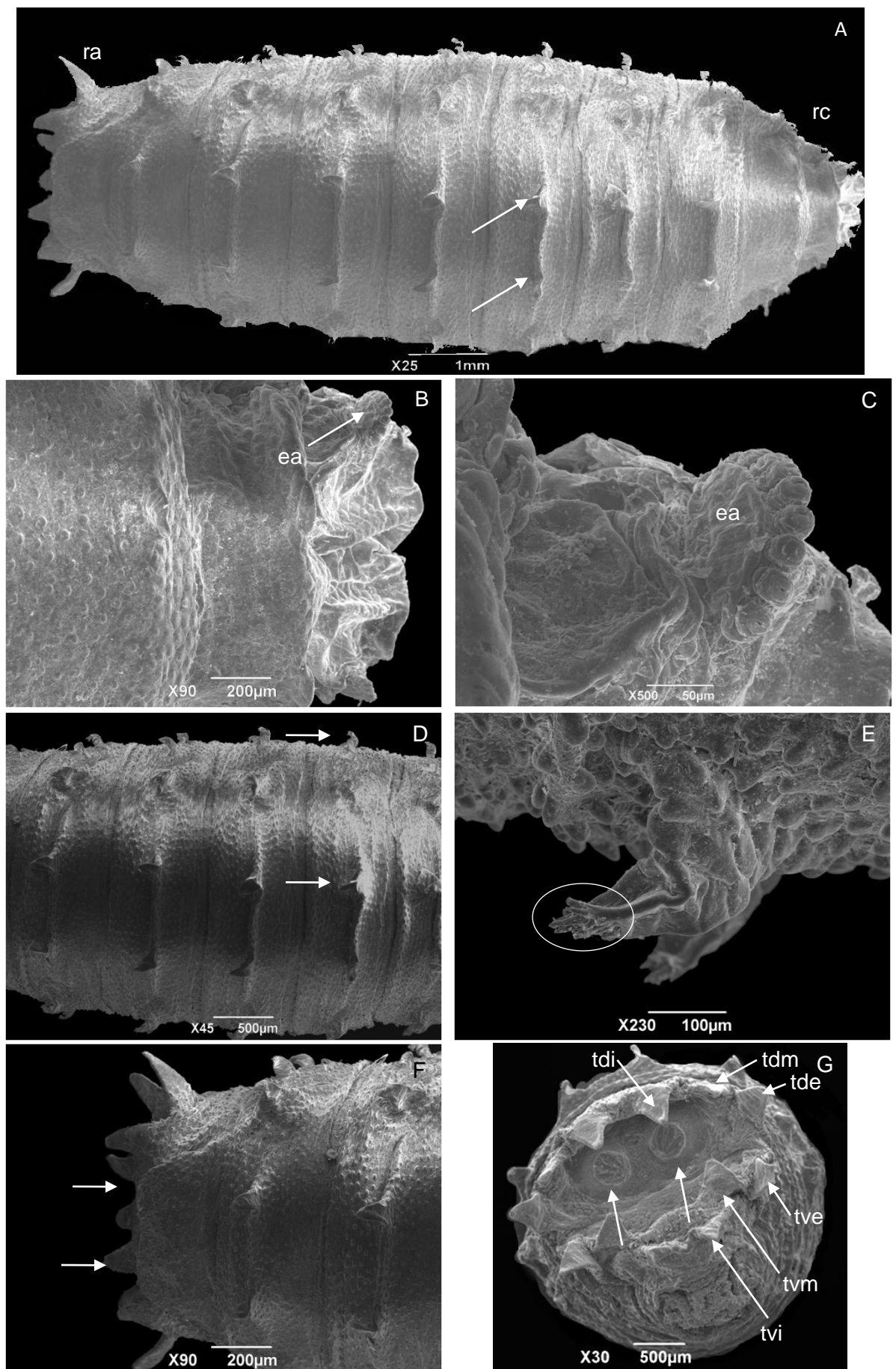


Figura 6.5: Micrografia eletrônica de varredura dos pupários de *Chrysomya albiceps*. A – Visão geral do pupário mostrando os tubérculos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica retraída, mostrando espiráculo anterior (ea); C - Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); D – Visão geral do pupário, mostrando tubérculos curvados (setas); E – Detalhe dos tubérculos curvados com espinhos no ápice (círculo); F - Visão geral do segmento anal localizando as placas espiraculares (setas); G - Visão dos espiráculos posteriores com as três aberturas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi).

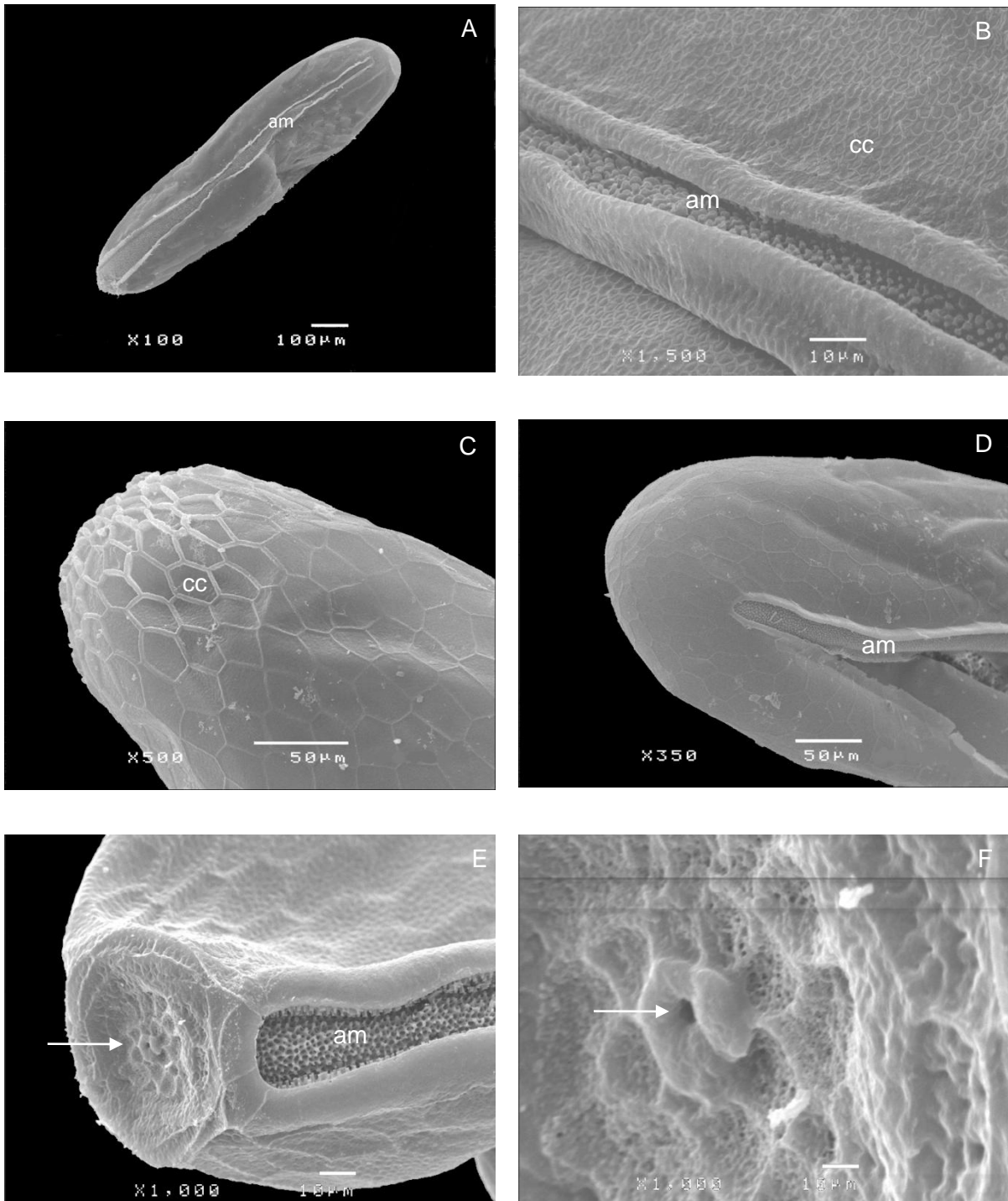


Figura 6.6: Micrografia eletrônica de varredura dos ovos de *Chrysomya putoria*. A – Visão dorsal do ovo, porção anterior a esquerda (seta) e área mediana (am) ao longo do comprimento do ovo; B – Visão dorsal, mostrando a área mediana (am) e as ornamentações das células coriônicas (cc); C – Detalhe da porção ventral do ovo, mostrando as ornamentações das células coriônicas (cc); D - Área mediana (am) próxima a extremidade posterior terminando de forma afilada (seta); E – Micrópila (seta) e área mediana terminando de forma arredondada (am); F – Micrópila (seta).

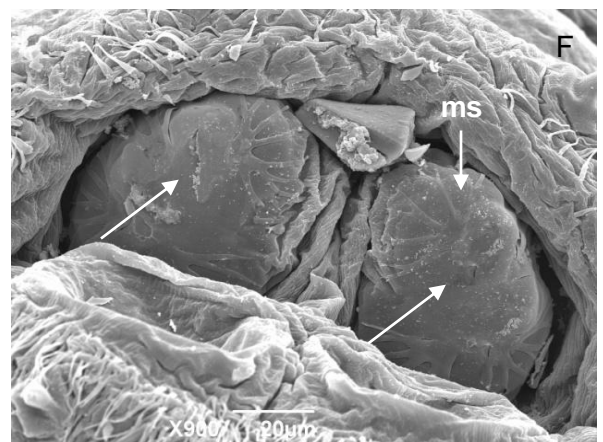
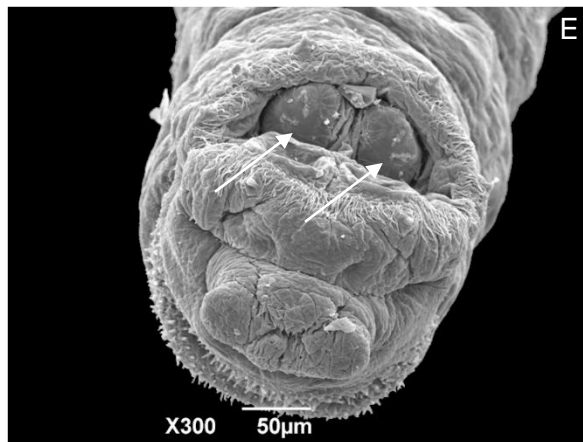
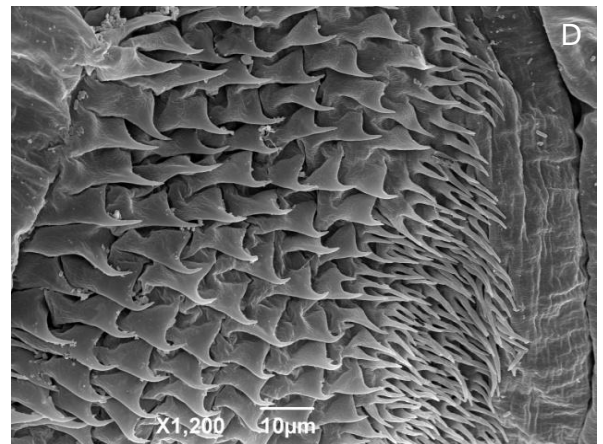
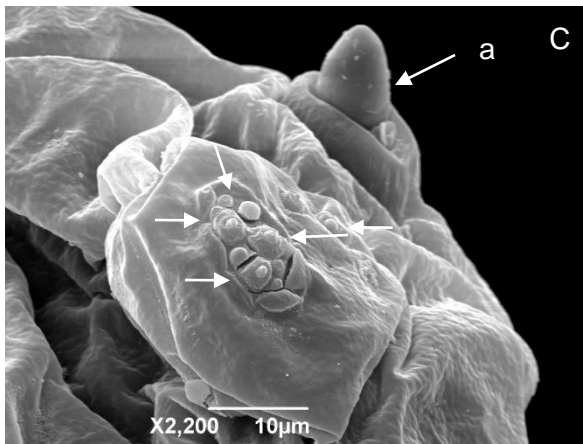
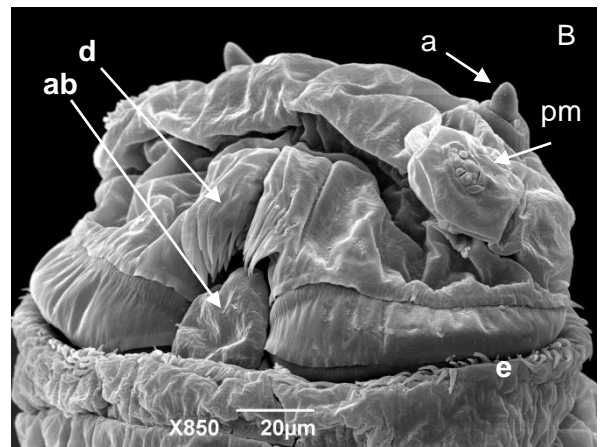
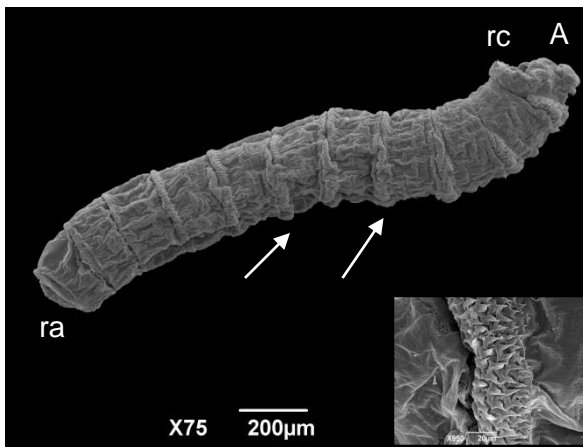


Figura 6.7: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de primeiro instar de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando fileiras de espinhos entre os segmentos (setas e detalhe), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão geral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), dentes supra bucais (d) e o aparelho bucal (ab); C – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D – Visão detalhada dos espinhos do colar cefálico; E – Visão geral do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Detalhe dos espiráculos posteriores, mostrando as aberturas espiraculares (setas) e músculos de sustentação (ms).

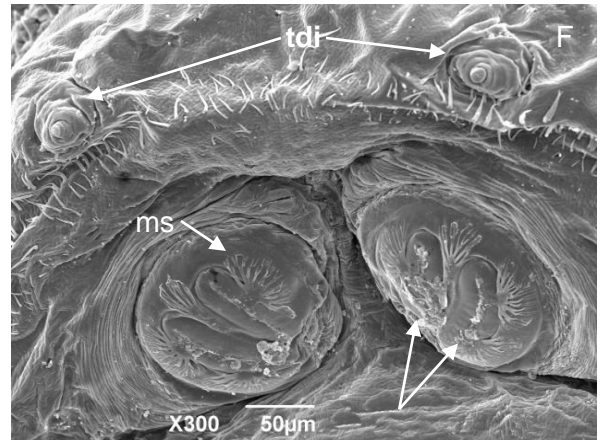
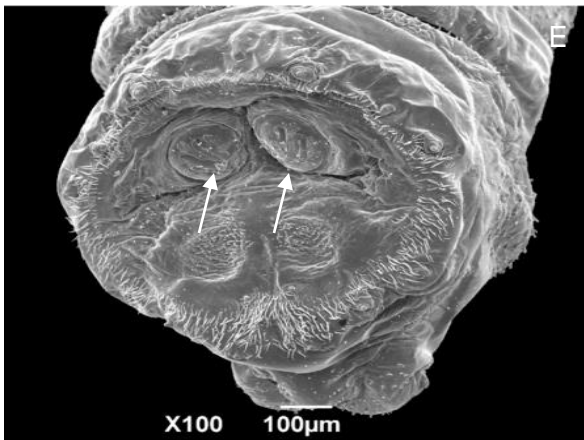
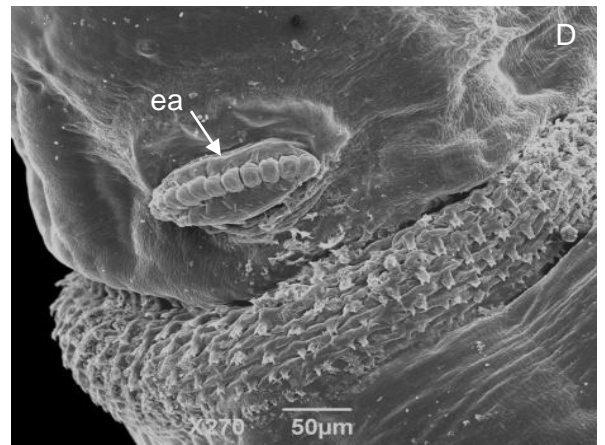
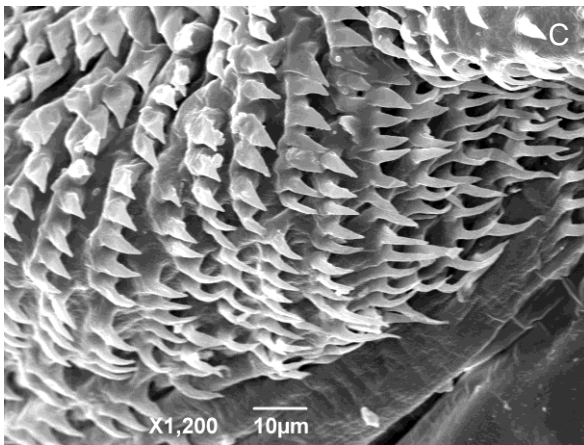
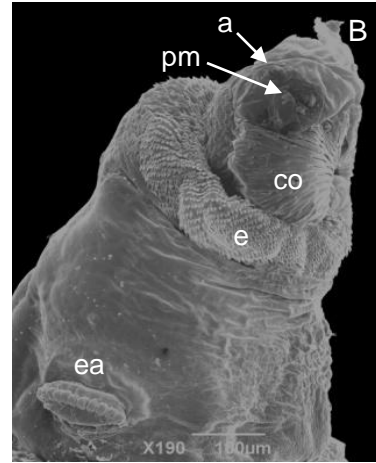
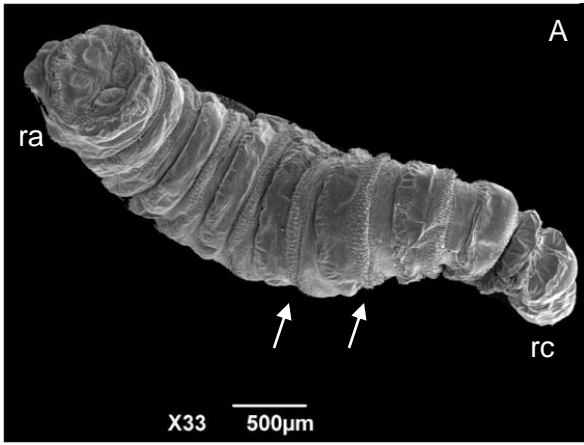


Figura 6.8: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e); cristas orais (co) e espiráculo anterior (ea); C – Visão detalhada dos espinhos entre os segmentos do corpo da larva; D - Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); E – Visão detalhada do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Visão detalhada das duas aberturas espiraculares (setas), dos músculos de sustentação (ms) e dos tubérculos dorsais internos (tdi).

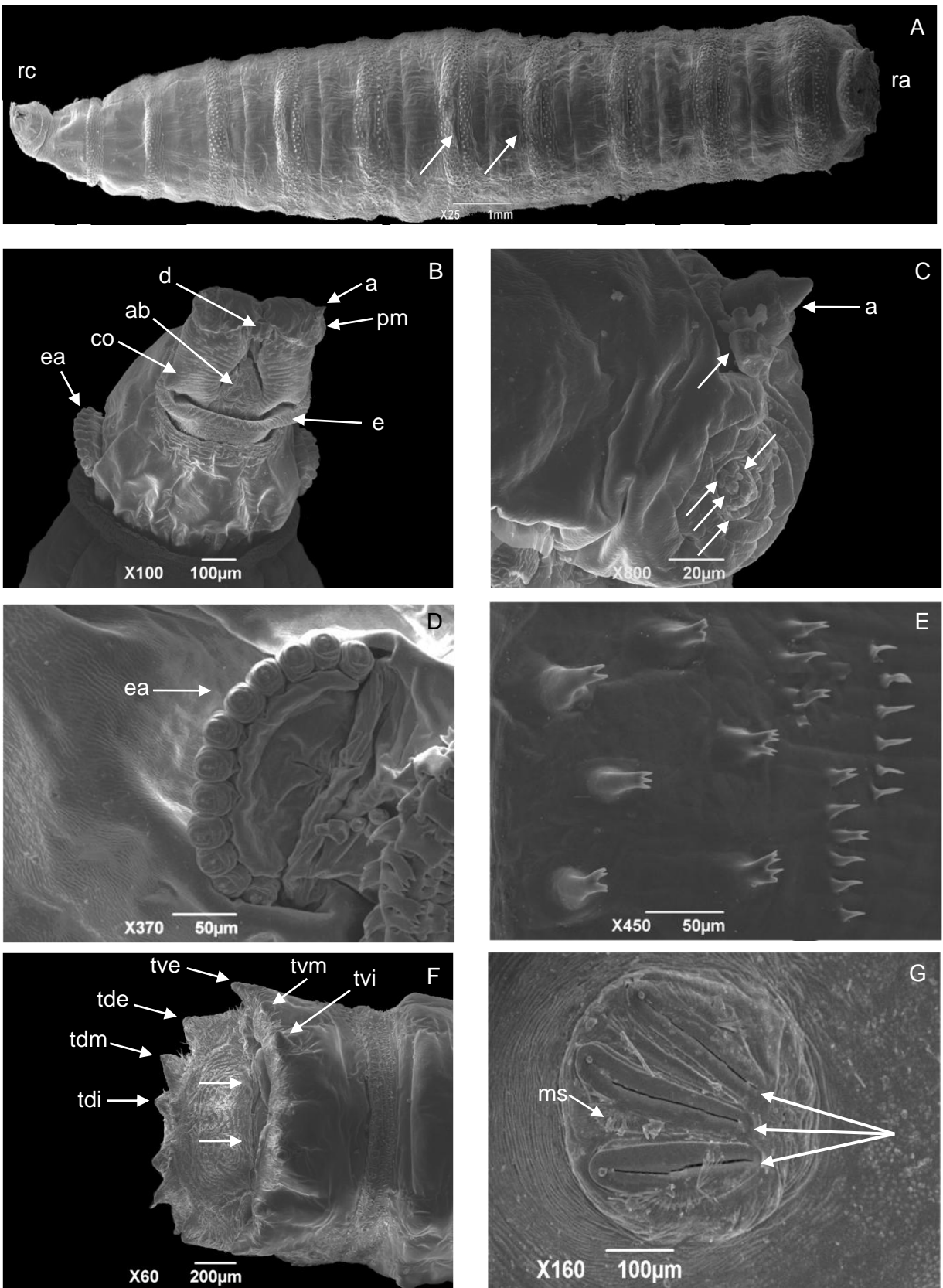


Figura 6.9: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de terceiro instar de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do corpo da larva mostrando espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a), palpo maxilar (pm), cristas orais (co), espinhos (e), espiráculo anterior (ea), dentes supra bucais (d) e aparelho bucal (ab); C - Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D - Detalhe do espiráculo anterior (ea); E – Visão detalhada dos espinhos entre os segmentos; F – Visão geral do segmento anal, mostrando a localização das placas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi); G – Visão detalhada do espiráculo posterior com as três aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms).

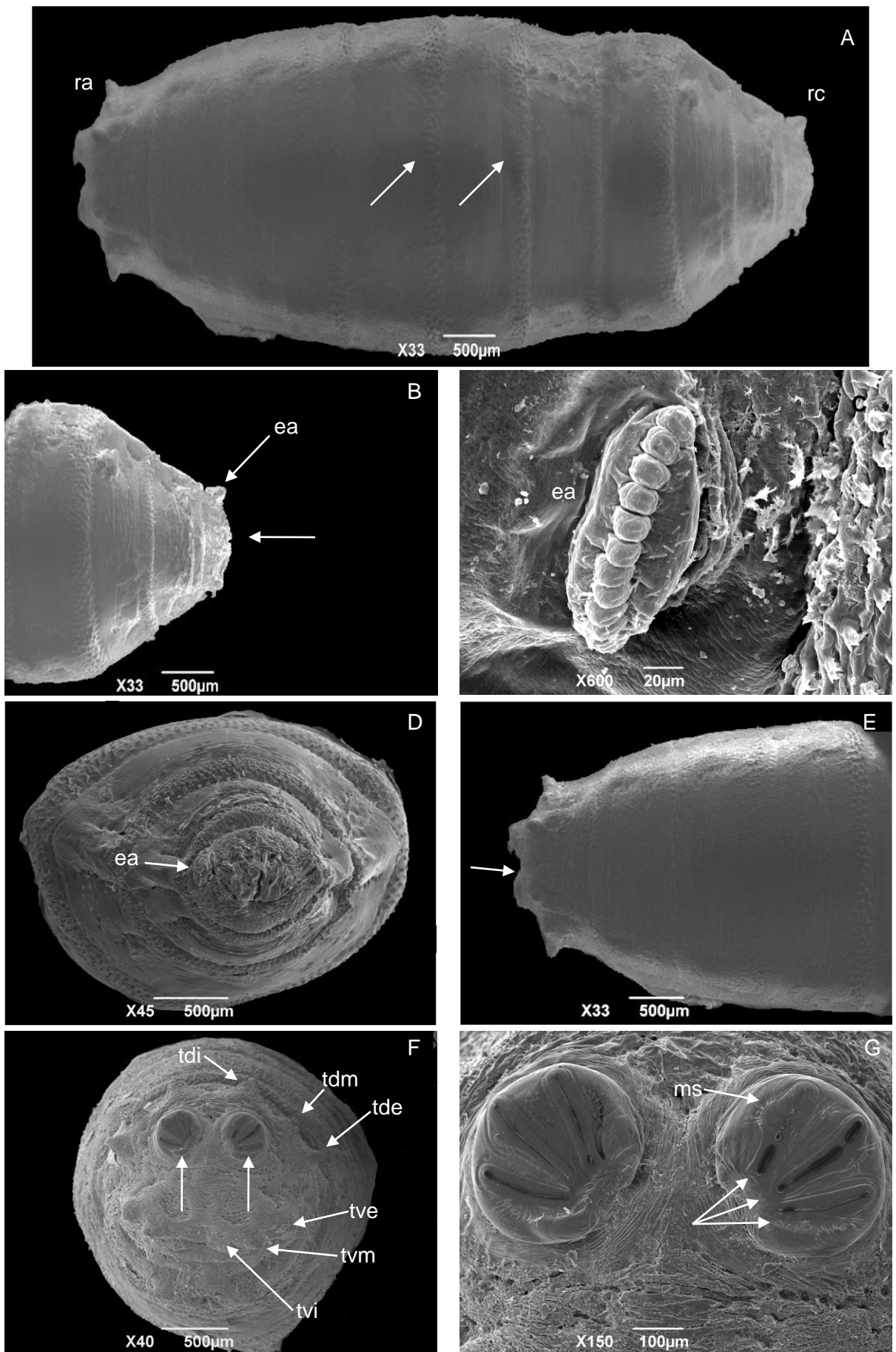


Figura 6.10: Micrografia eletrônica de varredura dos pupários de *Chrysomya putoria*. A – Visão geral do pupário mostrando os espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão detalhada da região cefálica retraída (seta) e do espiráculo anterior (ea); C – Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); D – Visão da região anterior retraída e espiráculo anterior (ea); E – Visão da região posterior com tubérculos e localização das placas espiraculares (setas); F - Visão geral do segmento anal, mostrando as placas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi); G - Visão dos espiráculos posteriores com as três aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms).

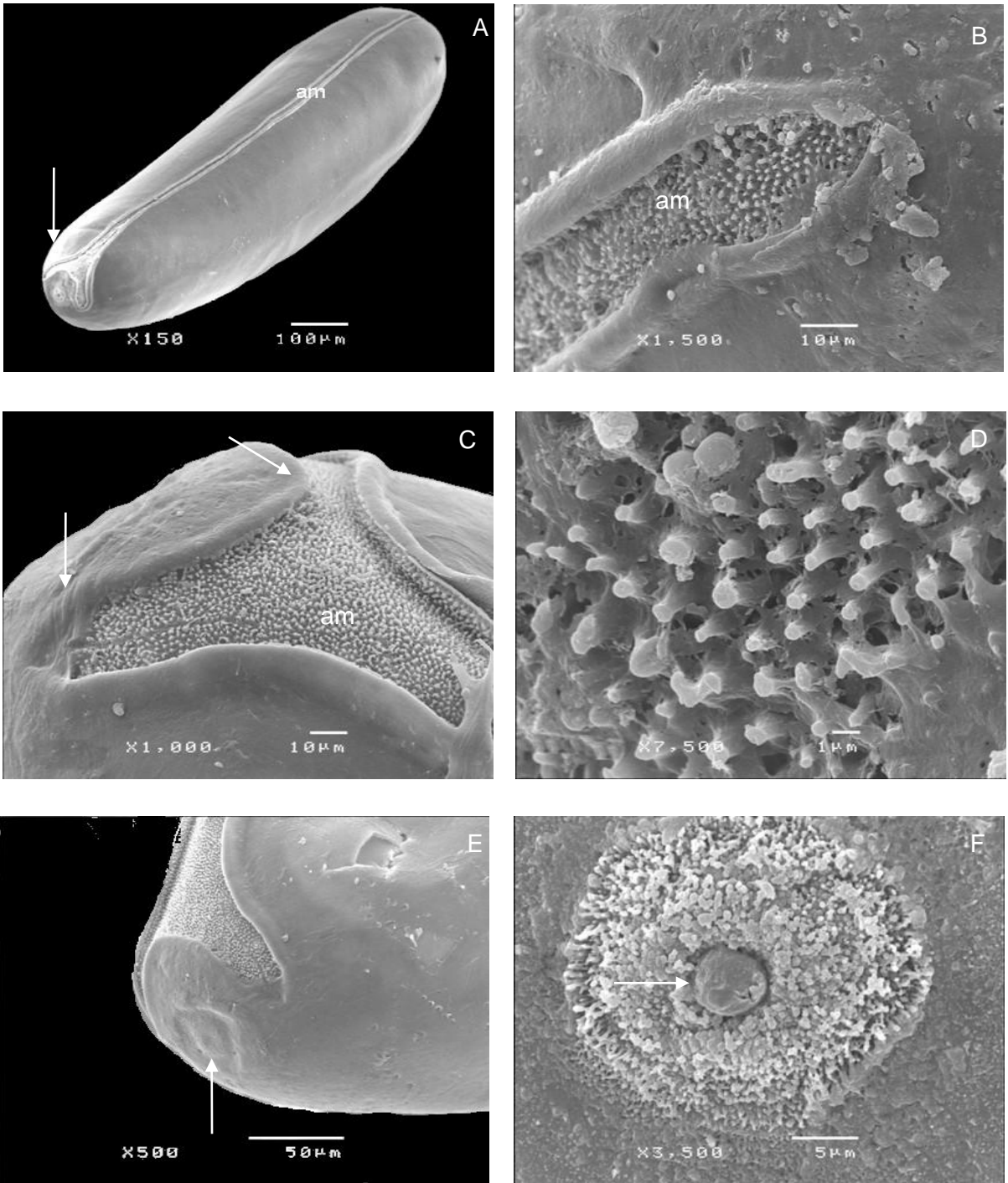


Figura 6.11: Micrografia eletrônica de varredura dos ovos de *Chrysomya megacephala*. A – Visão dorsal do ovo, porção anterior a esquerda (seta) e área mediana (am) ao longo do comprimento do ovo; B – Visão dorsal, mostrando a área mediana (am) arredondada próxima a extremidade posterior; C – Área mediana (am) bifurcada sob a forma de Y (setas) próxima a extremidade anterior; D – Ilhas da área mediana sem anastomoses; E – Micrópila (seta); F – Detalhe das ornamentações e orifício da micrópila (seta).

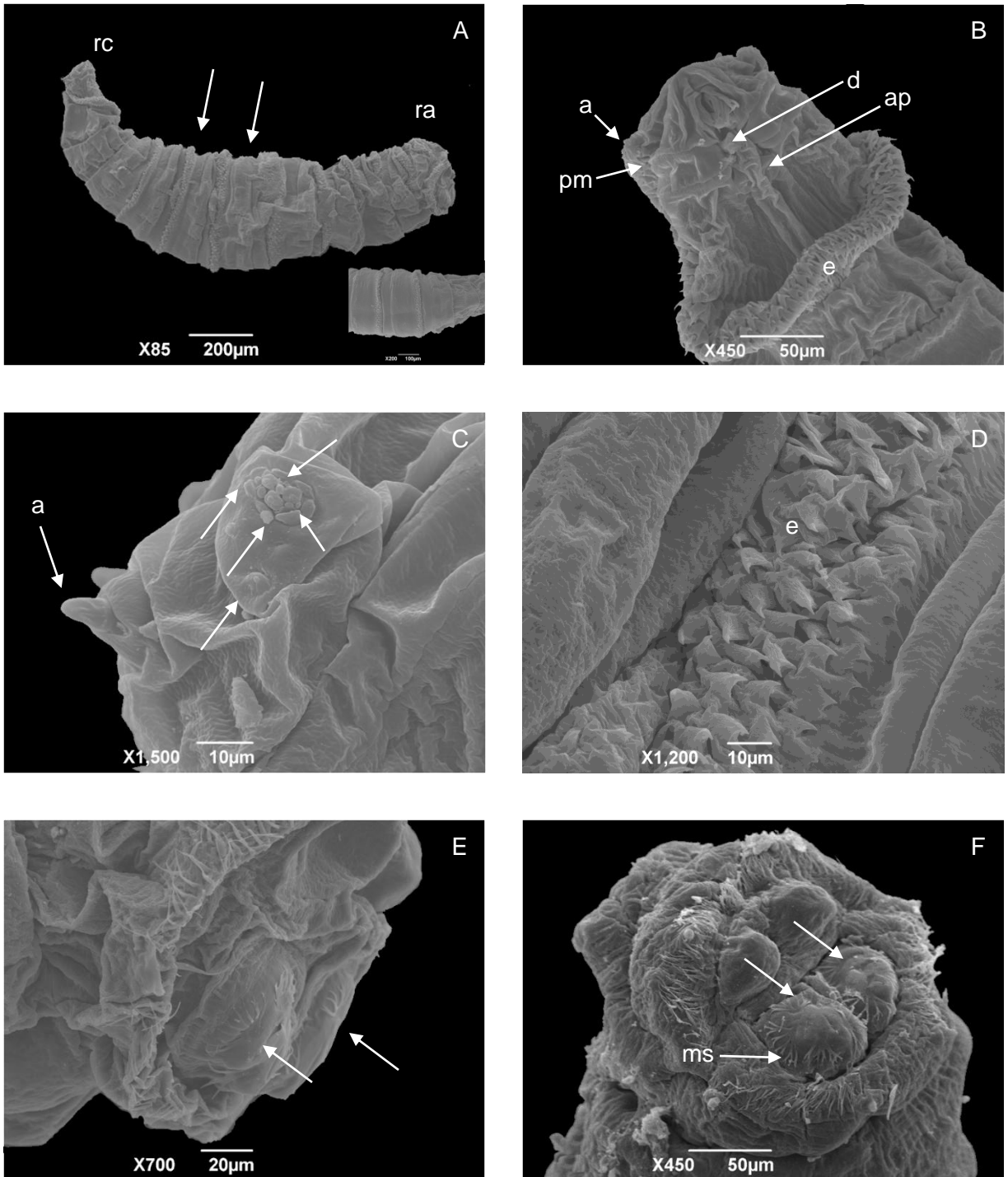


Figura 6.12: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de primeiro instar de *Chrysomya megacephala*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando fileiras de espinhos entre os segmentos (setas e detalhe), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), dentes supra bucais (d) e aparelho bucal (ab); C – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); D – Visão detalhada dos espinhos da região cefálica (e); E – Visão geral do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Detalhe dos espiráculos posteriores, mostrando as aberturas espiraculares (seta) e músculos de sustentação (ms).

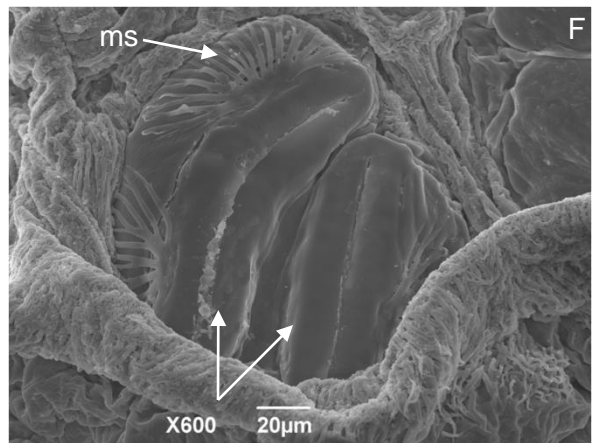
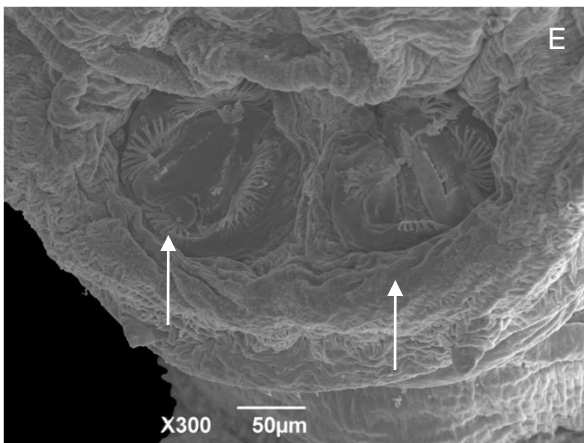
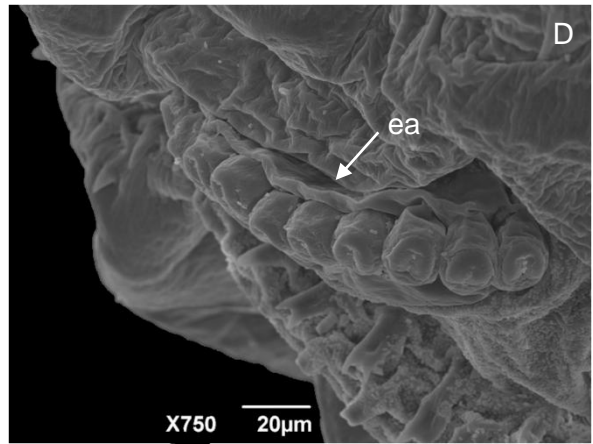
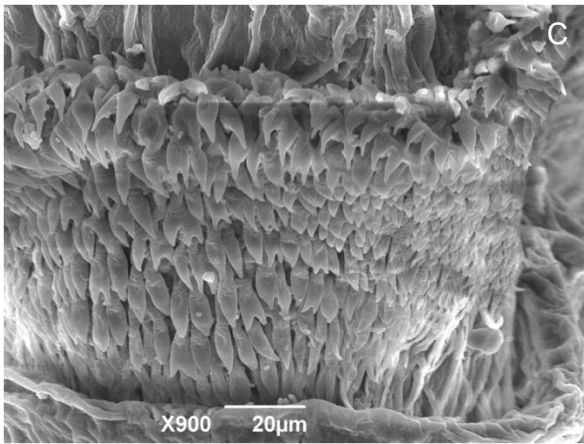
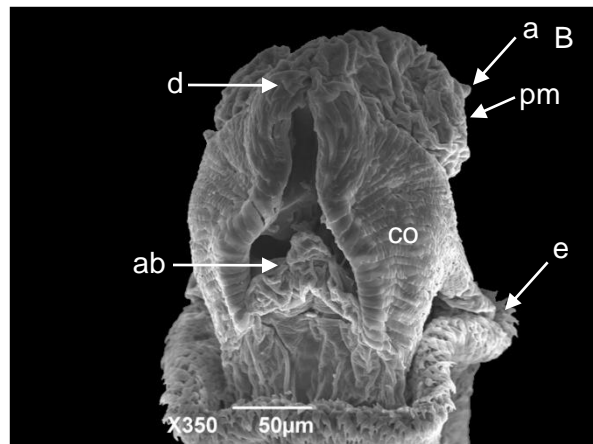
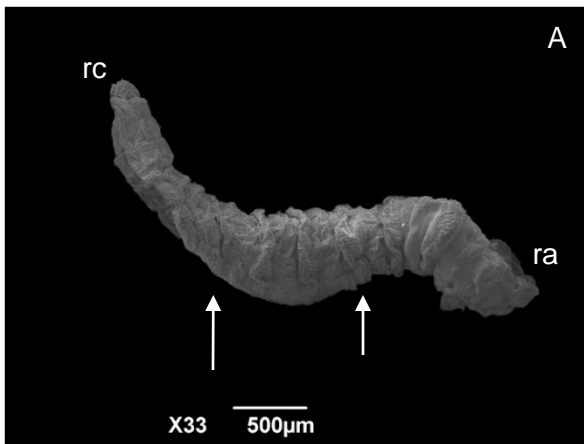


Figura 6.13: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de segundo instar de *Chrysomya megacephala*. A – Visão geral do corpo da larva, mostrando espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão frontal detalhada da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), dentes supra bucais (d), aparelho bucal (ab), espinhos (e) e cristas orais (co); C – Visão detalhada dos espinhos do colar cefálico; D - Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); E – Visão detalhada do segmento anal, destacando os espiráculos posteriores (setas); F – Visão detalhada das duas aberturas espiraculares (setas) e músculos de sustentação (ms).

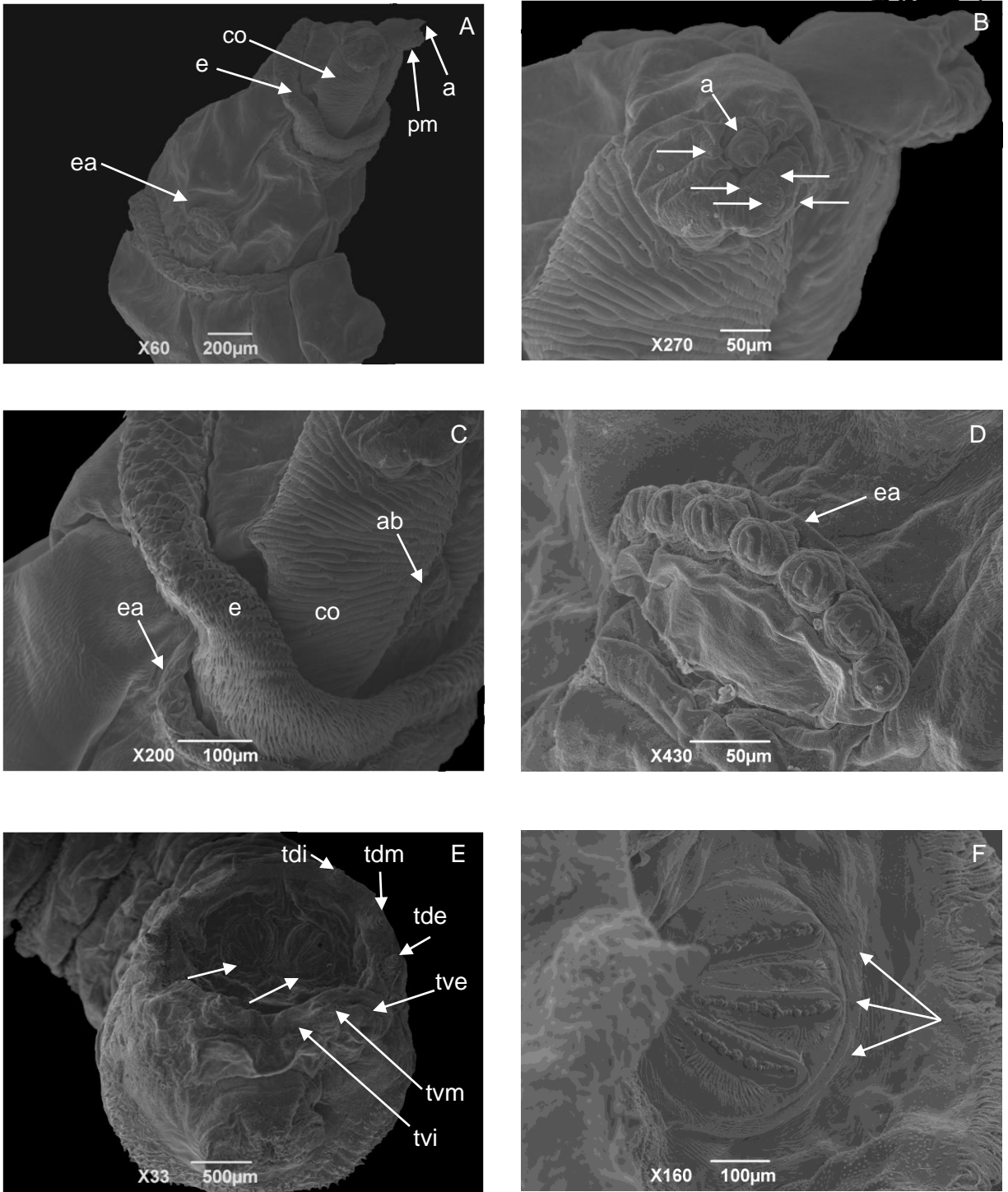


Figura 6.14: Micrografia eletrônica de varredura das larvas de terceiro instar de *Chrysomya megacephala*. A – Visão lateral da região cefálica, mostrando antena (a), palpo maxilar (pm), espinhos (e), cristas orais (co) e espiráculo anterior (ea); B – Visão detalhada da região cefálica, evidenciando antena (a) e papilas do palpo maxilar (setas); C – Visão detalhada da região cefálica, mostrando espiráculo anterior (ea), espinhos (e), aparelho bucal (ab) e cristas orais (co); D - Detalhe do espiráculo anterior (ea); E – Visão geral do segmento anal, mostrando a localização das placas espiraculares (setas), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm), dorsal externo (tde), tubérculo ventral externo (tve), ventral mediano (tvm) e ventral interno (tvi); F – Visão detalhada dos espiráculos posteriores, mostrando as aberturas espiraculares (setas).

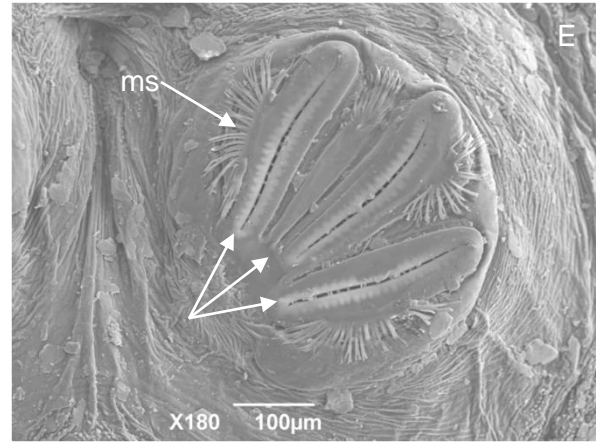
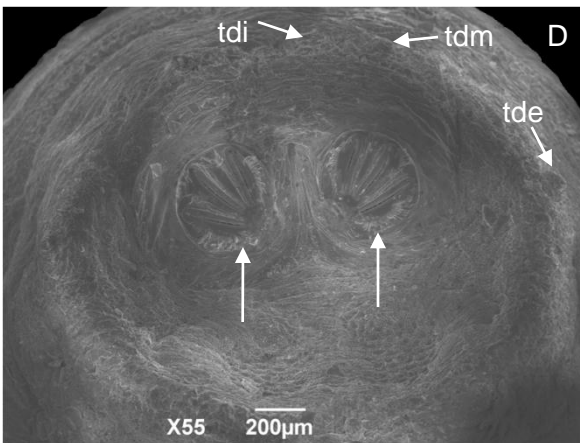
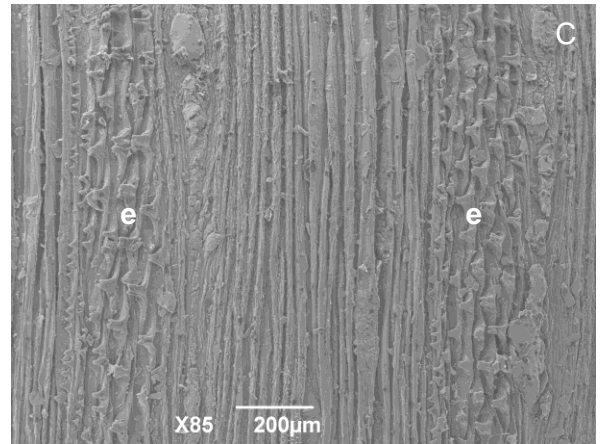
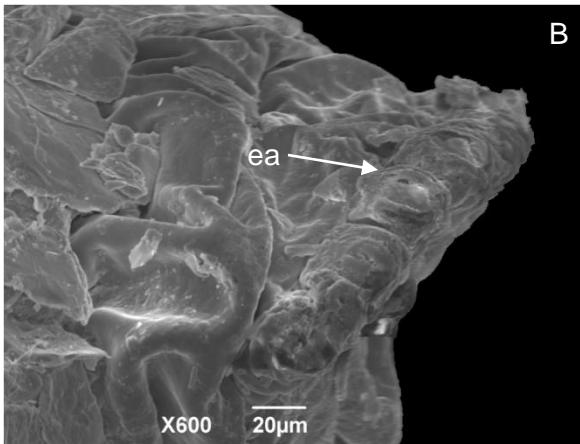
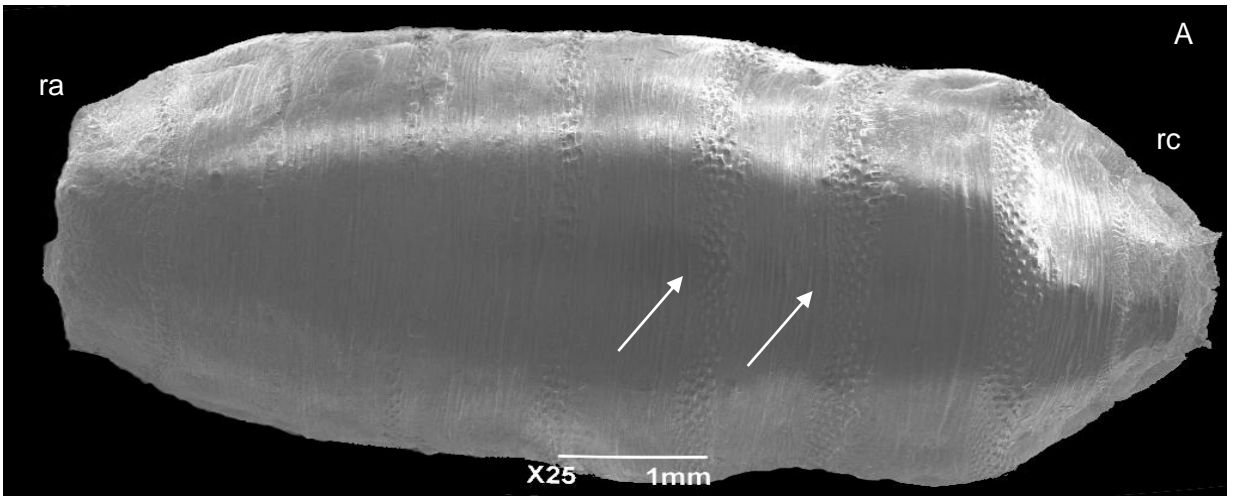


Figura 6.15: Micrografia eletrônica de varredura dos pupários de *Chrysomya megacephala*. A – Visão geral do pupário mostrando os espinhos entre os segmentos (setas), região cefálica (rc) e região anal (ra); B – Visão detalhada do espiráculo anterior (ea); C – Visão detalhada das fileiras de espinhos entre os segmentos (e); D – Visão geral do segmento anal, mostrando as placas espiraculares (seta), tubérculo dorsal interno (tdi), dorsal mediano (tdm) e dorsal externo (tde); E - Visão do espiráculo posterior, mostrando as aberturas espiraculares (setas) e os músculos de sustentação (ms).

FIGURA 6.1 – OVOS DE *C. albiceps*

FIGURA 6.2 – L1 DE *C. albiceps*

FIGURA 6.3 – L2 DE *C. albiceps*

FIGURA 6.4 – L3 DE *C. albiceps*

FIGURA 6.5 – PUPÁRIO DE *C. albiceps*

6.2 - *Chrysomya putoria*

6.2.1 - Ovos

O ovo é alongado, de forma cilíndrica e apresenta a extremidade anterior mais afilada (figura 6.6A). As células coriônicas apresentam as bordas bastante visíveis e destacadas do restante do exocócion, tanto na região ventral quanto na dorsal (figura 6.6B). Além disso, é possível observar a forma poligonal dessas células (figura 6.6C). A linha mediana se estende por quase totalidade do comprimento do ovo e termina de forma afilada na extremidade posterior, enquanto na extremidade oposta, próxima a região da micrópila, esta linha termina arredondada (figura 6.6D e 6.6E). As ilhas localizadas dentro da linha mediana são projeções individuais e não apresentam junções (figura 6.6E). A micrópila é bastante ornamentada, com o orifício de penetração do espermatozóide em posição central rodeado por pequenas depressões (figura 6.6F).

6.2.2 - Larvas de Primeiro Instar

O corpo da larva desta espécie, assim como de todos os outros dípteros muscóides é composto por doze segmentos, sendo um cefálico, três torácicos e oito abdominais. O tegumento que recobre o corpo da larva é liso, mas pequenos espinhos são observados no limite de cada segmento (figura 6.7A).

A região cefálica é pouco desenvolvida e nela são visualizadas as antenas na porção dorsal e, ventralmente, os palpos maxilares. Ainda é possível observar os dentes supra bucais e o aparelho bucal (figura 6.7B). Os palpos maxilares também são compostos por cinco estruturas sob a forma de papilas (figura 6.7C).

Os espinhos que compõem o colar cefálico são achatados, em forma de placas na porção mais próxima a região cefálica e mais afilados na porção oposta, ou seja, aquela mais próxima aos segmentos torácicos (figura 6.7D).

Os espiráculos anteriores ainda não podem ser visualizados neste instar por ainda estarem em processo de formação.

A extremidade posterior é constituída por tubérculos que circundam a placa espiracular, onde está localizado o par de espiráculos posteriores (figura 6.7E). Cada espiráculo é composto por uma única abertura espiracular em forma de fenda envolta por músculos de sustentação (figura 6.7F).

6.2.3 - Larvas de Segundo Instar

O corpo da larva apresenta os segmentos intercalados por fileiras de espinhos pouco desenvolvidos (figura 6.8A). Na região cefálica, as antenas e os palpos encontram-se mais desenvolvidos, sendo facilmente visualizados. Além deles, também é possível observar, com detalhes as cristas orais que se apresentam sob a forma de lâminas (figura 6.8B).

Os espinhos que compõem o colar cefálico são mais robustos organizados em fileiras dispostas em diagonal com relação ao corpo da larva (figura 6.8C). Os espinhos que delimitam os outros segmentos são muito semelhantes aqueles observados na região cefálica, podendo apresentar uma, duas ou três pontas e disposição sob a forma de fileiras, no entanto, são menos robustos.

O espiráculo anterior pode ser facilmente visualizado neste instar, no segundo segmento larval ou primeiro segmento torácico. Nesta espécie, o espiráculo é composto por 11-12 ramificações espiraculares, cada uma com uma abertura na porção apical (figura 6.8D).

No último segmento larval está localizado o par de espiráculos posteriores, com duas aberturas cada e o peritrema aberto, além dos músculos de sustentação da placa espiracular (figura 6.8E). Este segmento possui cerdas e ainda três pares de tubérculos dorsais (dorsal interno (figura 6.8F), mediano e externo), três pares ventrais (dorsal interno, mediano e externo) e um par de tubérculos anais.

6.2.4 - Larvas de Terceiro Instar

A larva possui uma região cefálica afilada e o segmento anal truncado (figura 6.9A). A região cefálica encontra-se totalmente desenvolvida, assim como as cristas orais, as antenas, os palpos maxilares, aparelho bucal e dentes supra bucais (figura 6.9B e 6.9C).

O espiráculo anterior é muito semelhante ao encontrado na larva de segundo instar, com 11-12 ramificações espiraculares (figura 6.9D).

O tegumento que recobre o corpo da larva é liso com espinhos entre os segmentos, assim como nos outros instares larvais. Esses espinhos apresentam de uma a três pontas, dispostos em fileiras ao longo de todo o corpo da larva no limite de cada segmento (figura 6.9E).

O segmento anal é truncado, com os tubérculos bastante desenvolvidos

(dorsal interno, dorsal mediano, dorsal externo, ventral externo, ventral mediano e ventral interno) envolvendo a região das placas espiraculares (figura 6.9F). O peritrema é aberto e, como característica do terceiro instar, cada espiráculo é composto por três aberturas espiraculares com cicatrizes ecdisiais e músculos de sustentação mais desenvolvidos (figura 6.9G).

6.2.5 - Pupários

O pupário é muito semelhante à larva de terceiro instar, no entanto a região cefálica é retraída (figura 6.10A). Nenhuma estrutura da região cefálica pode ser visualizada (figura 6.10B). O espiráculo anterior também apresenta 11-12 ramificações espiraculares, com a abertura central em cada uma delas (figura 6.10C e 6.10D).

O tegumento que recobre o pupário apresenta os mesmos espinhos observados no estágio anterior (figura 6.10E). O segmento anal é truncado e os tubérculos são rígidos, servindo como proteção a placa espiracular. Esta é ligeiramente destacada do tegumento, se localizando no ápice de uma pequena protuberância (figura 6.10F). Os tubérculos são pouco desenvolvidos (figura 6.10F). O peritrema é aberto e as três aberturas espiraculares são bem visíveis, assim como os músculos de sustentação (figura 6.10G).

FIGURA 6.6 – OVO DE *C. putoria*

Figura 6.7 – L1 de *C. putoria*

Figura 6.8 – L2 de *C. putoria*

Figura 6.9 – L3 de *C. putoria*

Figura 6.10 – pupários de *C. putoria*

6.3 - *Chrysomya megacephala*

6.3.1 - Ovos

O ovo desta espécie de mosca apresenta as células do exocóron lisas e a área mediana se estende por todo o comprimento do ovo (figura 6.11A). Na região posterior, esta termina de forma arredondada (figura 6.11B) enquanto, na região anterior, a área mediana termina de forma bifurcada, próxima a micrópila (figura 6.11C). No interior da área mediana, encontram-se ilhas com projeções individualizadas e sem anastomoses (figura 6.11D). A micrópila é bastante característica, sendo o entorno do orifício de penetração do espermatozóide ornamentado com projeções (figura 6.11E e 6.11F).

6.3.2 - Larvas de Primeiro Instar

O corpo da larva desta espécie de díptero muscóide também é composto por doze segmentos, sendo um cefálico, três torácicos e oito abdominais. O tegumento que recobre o corpo da larva é liso, mas pequenos espinhos são observados no limite de cada segmento (figura 6.12A).

A região cefálica é pouco desenvolvida e afilada, com relação aos segmentos anais. Nela, são visualizadas as antenas na porção dorsal e, ventralmente, os palpos maxilares, além dos espinhos que delimitam a região cefálica e região torácica. Além dos dentes supra bucais e o aparelho bucal (figura 6.12B). Os palpos maxilares também são compostos por cinco estruturas sob a forma de papilas (figura 6.12C). Os espinhos do colar cefálico são pouco achatados e possuem uma ou duas pontas afiladas (figura 6.12D).

Os espiráculos anteriores ainda não podem ser visualizados neste instar por ainda estarem em processo de formação.

No segmento anal são observados pequenos tubérculos que envolvem a placa espiracular, onde está localizado o par de espiráculos posteriores (figura 6.12E), onde pode-se visualizar uma única abertura espiracular (figura 6.12F).

6.3.3 - Larvas de Segundo Instar

O corpo da larva apresenta os segmentos intercalados por fileiras de espinhos pouco desenvolvidos (figura 6.13A). A região cefálica é afilada e nela

podem-se observar facilmente as antenas e os palpos mais desenvolvidos. Além deles, também é possível visualizar, com detalhes as cristas orais que se apresentam sob a forma de lâminas paralelas, os dentes supra bucais e o aparelho bucal (figura 6.13B).

Os espinhos que compõem o colar cefálico são pouco achatados e robustos, organizados de maneira aleatória e apresentam uma ou duas pontas (figura 6.13C). Nos outros segmentos, os espinhos são muito semelhantes aqueles observados na região cefálica, podendo apresentar também uma ou duas pontas.

O espiráculo anterior pode ser facilmente visualizado neste instar no segundo segmento larval ou primeiro segmento torácico. Nesta espécie, o espiráculo é composto por 10 ramificações espiraculares, cada uma com uma abertura na porção apical (figura 6.13D).

No último segmento larval está localizado o par de espiráculos posteriores, com duas aberturas cada e o peritrema aberto, além dos músculos de sustentação da placa espiracular (figura 6.13E e 6.13F).

6.3.4 - Larvas de Terceiro Instar

A região cefálica da larva encontra-se totalmente desenvolvida, tornando visíveis as antenas, palpos maxilares, espinhos do colar cefálico e espiráculo anterior (figura 6.14A). As papilas dos palpos maxilares também encontram-se em destaque (figura 6.14B), assim como as cristas orais dispostas sob a forma de lâminas paralelas (figura 6.14C).

O espiráculo anterior é muito semelhante ao encontrado na larva de segundo instar, com 10 ramificações espiraculares (figura 6.14D).

O segmento anal é curto, com os tubérculos pouco desenvolvidos envolvendo a região das placas espiraculares (figura 6.14E). O peritrema é aberto e, como característica do terceiro instar, cada espiráculo é composto por três aberturas espiraculares com cicatrizes ecdisiais e músculos de sustentação mais desenvolvidos (figura 6.14F).

6.3.5 - Pupários

O pupário de *C. megacephala* é muito semelhante a larva de terceiro instar, no entanto a região cefálica é ligeiramente retraída (figura 6.15A). Nenhuma estrutura da região cefálica pode ser visualizada. O espiráculo anterior também

apresenta 10 ramificações espiraculares, com a abertura central em cada uma delas (figura 6.15B).

O tegumento que recobre o pupário apresenta os mesmos espinhos observados no estágio anterior, no entanto, podem ser observadas as dobras do tegumento da larva de terceiro instar que deu origem ao pupário (figura 6.15C). O segmento anal é truncado e os tubérculos são rígidos e pequenos, servindo como proteção a placa espiracular (figura 6.15D). Esta placa é ligeiramente destacada do tegumento, se localizando no ápice de uma pequena protuberância. O peritrema é aberto e as três aberturas espiraculares são bem visíveis (figura 6.15E).

Figura 6.11 – Ovos de *C. megacephala*

Figura 6.12 – L1 de *C. megacephala*

Figura 6.13 – L2 de *C. megacephala*

Figura 6.14 – L3 de *C. megacephala*

Figura 6.15 – Pupário de *C. megacephala*

7. Discussão

A morfologia geral dos imaturos dos dípteros muscóides foi descrita por diversos autores através da microscopia óptica (Hinton 1981; Erzincioğlu 1989; Queiroz et al. 1997; Sukontason et al. 2004a; Oliveira et al. 2007) e da microscopia eletrônica de varredura (Greenberg e Szyska 1984; Erzincioğlu 1989; Liu e Greenberg 1989; Mendonça et al. 2008). Neste trabalho, foram encontradas diversas similaridades em relação à forma e a outros caracteres observados nos imaturos das diferentes espécies estudadas quando comparados a dados da literatura.

Os resultados relacionados a morfologia dos ovos encontrados neste estudo estão de acordo com Hinton (1960), que relata que os ovos dos dípteros muscóides são estruturas alongadas, revestidas por células coriônicas que se apresentam distintas de acordo com a sua localização, se na porção interna da área mediana ou recobrando o restante do ovo. A camada mais externa do ovo ou exocócion é rígida o suficiente para proteger o embrião do ressecamento. A área mediana apresenta-se diferenciada sob a forma de uma abertura dorsal que vai da extremidade anterior a posterior do ovo, formada por estruturas interconectadas, denominadas ilhas, e pilares, gerando espaços abertos denominados aerópilos (Greenberg e Kunich 2002; Erzincioğlu 1989). A organização dessas estruturas faz com que o interior da área mediana se assemelhe a uma esponja, retendo o ar nos aerópilos, permitindo as trocas gasosas do embrião com o meio. A área mediana está presente em diversas famílias de dípteros ciclorafores terrestres.

Neste trabalho foi observado que a largura e o formato da porção superior das ilhas internas à área mediana podem variar entre as espécies de dípteros muscóides, bem como a presença ou ausência de anastomoses (junções) e de orifícios nesta região. Com relação a estas características, este trabalho corrobora os resultados de Greenberg e Singh (1995) observados para o gênero *Chrysomya*, que descreveu ilhas sem anastomoses e sem orifícios em *C. putoria*. Além disso, esses autores evidenciaram orifícios no ápice das ilhas de *C. albiceps*, também observado neste trabalho. Já David et al. (2008) analisaram ovos de

C. megacephala e relataram a ausência de orifícios e anastomoses no ápice das ilhas da área mediana, corroborando os resultados aqui descritos.

Chapman (1998) relatou que os limites das células foliculares que deram origem ao exocóron tornam-se visíveis através de um processo denominado densificação (Mazur et al. 1989), onde ocorre um aumento da densidade do córon ainda durante a fase de desenvolvimento. Esse padrão de ornamentação foi observado em *C. putoria*, mas não foi relatado por outros autores nesta mesma espécie, uma vez que tais autores limitaram-se apenas a observar estruturas relacionadas ao comprimento e forma da área mediana e micrópila (Prins 1982; Liu e Greenberg 1989; Greenberg e Singh 1995). No entanto, dentre as três espécies que compõem o gênero *Chrysomya*, somente em *C. putoria* foi observada a presença de bordas elevadas, o que reforça a utilização destas ornamentações como auxílio na diferenciação desta espécie de dípteros muscóides de importância forense.

De acordo com Erzinclioglu (1989), diversos caracteres dos ovos de dípteros muscóides apresentam grande valor diagnóstico na identificação desses insetos de importância forense, dentre estes, a forma com que a área mediana se apresenta próxima à micrópila ou na região posterior, se termina bifurcada, arredondada ou afilada. A micrópila se localiza na região anterior do ovo, composta por um orifício por onde os espermatozoides penetram até chegar ao oviduto onde ocorre a fertilização. Neste estudo, foi observada a área mediana terminando de forma bifurcada na porção anterior em *C. albiceps* e *C. megacephala* e arredondada em *C. putoria*. Na extremidade oposta, foi observado que ela termina afilada em *C. albiceps* e *C. putoria*, enquanto que em *C. megacephala* esta termina arredondada. Desta forma, é possível concluir que a observação combinada das estruturas da área mediana permite a diferenciação das três espécies do gênero *Chrysomya* presentes no Brasil.

A micrópila das espécies estudadas é bastante ornamentada, característica anteriormente relatada por outros autores (Liu e Greenberg 1989; Greenberg e Singh 1995; Mendonça et al. 2009). No entanto, somente através da microscopia eletrônica de varredura ficou evidenciado a diferença no tipo de ornamentação no entorno da micrópila. Neste estudo, pode-se observar que em *C. albiceps* e *C. megacephala* as ornamentações são projeções ao redor da micrópila com um único orifício, enquanto em *C. putoria* estas se encontram sob a forma de depressões, que circundam também um único orifício. David et al. (2008) relataram a presença de dois orifícios na micrópila circundada por projeções em

C. megacephala. De acordo com Margaritis (1985), a micrópila está associada a canais que levam o espermatozóide diretamente ao oócito e esta estrutura pode ser constituída por uma ou mais perfurações ligadas a diversos canais que passam pelas camadas coriônicas, que se fundem, formando apenas um canal que alcança o oócito.

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram os descritos por Degrugillier e Grosz (1981), que relataram que os ovos dos dípteros muscóides da família Calliphoridae são depositados em grupos sobre o substrato de oviposição, com área mediana orientada para fora do mesmo, onde as massas de ovos se mantêm unidas devido a uma camada adesiva constituída, provavelmente, por uma mucoproteína secretada pelas glândulas acessórias das fêmeas e logo após a oviposição, esta substância seca e torna-se rígida, dificultando assim a separação destes ovos do substrato.

A estrutura geral das larvas das espécies analisadas neste estudo é muito semelhante aquela relatada para as outras espécies de dípteros muscóides. De acordo com Guimarães e Amorim (2006), o corpo das larvas assemelha-se a um cone, com a abertura bucal na extremidade afilada e o segmento anal, assim como o espiráculo posterior estão situados na extremidade truncada. Ainda segundo esses autores, não existe evidência de cabeça esclerotizada, sendo o aparelho bucal constituído apenas por um par de ganchos curvos, denominados mandíbulas onde podem ser observados dentes em algumas espécies. Segundo Greenberg e Kunich (2002), esta forma de corpo é ergonomicamente a mais eficiente para alimentação no tecido e enterramento para pupação.

As larvas do gênero *Chrysomya* foram estudadas por diversos autores, basicamente utilizando a microscopia óptica com o objetivo de analisar e descrever os instares larvais, espiráculos e o esqueleto céfalofaringeano (Zumpt 1956 e 1965; Queiroz e Carvalho 1987; Queiroz et al. 1997; Oliveira et al. 2007), mas algumas estruturas externas são visíveis apenas através da microscopia eletrônica de varredura.

A diferenciação dos instares larvais das três espécies estudadas é difícil, principalmente entre *C. putoria* e *C. megacephala* que apresentam o tegumento liso, com poucas ornamentações. Já *C. albiceps* apresenta o tegumento bastante característico, com tubérculos ao longo do corpo. No entanto, com o auxílio da microscopia eletrônica de varredura, algumas estruturas características dessas espécies podem ser identificadas.

A região cefálica das espécies estudadas é muito semelhante, assim como de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero (Baumgartner e Greenberg 1984). Nela, pode-se observar a antena ou órgão dorsal que possui a forma abaulada muito similar ao observado em *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e acredita-se que também seja um receptor com função olfativa, como nos muscídeos (Chu-Wang e Axtell 1971). Os palpos maxilares ou órgão terminal são estruturas pequenas, em formato de flor, que apresentam cinco papilas dispostas concentricamente. Estas estruturas teriam função de quimio e mecano-receptor, assim como relatado por Chu-Wang e Axtell (1972) para *M. domestica*. Todas as espécies aqui observadas apresentaram estas estruturas muito parecidas.

Somente a partir do segundo instar é possível visualizar o espiráculo anterior das larvas. De acordo com Kitching (1976), este é composto por ramificações espiraculares também denominadas papilas dispostas em linha ou de forma irregular. O número de papilas pode variar de um a quatro ou 30 até mais, sendo essa uma característica importante na diferenciação entre espécies (Guimarães e Amorim 2006). Neste estudo, foram observadas 10-12 ramificações espiraculares nas larvas de segundo e terceiro instar de *C. albiceps*. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Queiroz et al. (1997) e Queiroz e Carvalho (1987) que descreveram os instares larvais desta espécie usando microscopia óptica.

As ramificações espiraculares em *C. putoria* variaram entre 11 e 12 aberturas em nossas observações, no entanto, Oliveira et al. (2007) descreveram 10 ou 11 ramificações e Queiroz e Carvalho (1987) observaram 11 ramificações, isso nos leva a inferir que dentro dessa espécie existe uma variação maior na quantidade de ramificações espiraculares do que na espécie anterior.

Em *C. megacephala*, foram observadas por Queiroz e Carvalho (1987) 12 ramificações espiraculares e em nossos estudos, apenas 10 ramificações. No entanto, os estudos realizados por esses autores foram feitos na região Sul do Brasil, local da provável introdução dessa espécie no Continente Americano (Prado e Guimarães 1982) e apenas 10 anos após seu primeiro relato na região. Sukontason et al. (2003a) relataram 11 papilas nesta mesma espécie coletada na Tailândia. Esses dados reforçam a necessidade de estudos morfológicos com espécies cosmopolitas coletadas em diferentes regiões do mundo, uma vez que, de acordo com Greenberg e Singh (1995), pode haver diferenças morfológicas entre as populações de dípteros estudados. Essas alterações podem demonstrar as

alterações sofridas pelas espécies ao longo dos anos, visando melhor sobrevivência no novo habitat.

Não há diferenciação com relação ao número ou disposição das ramificações espiraculares presentes no espiráculo anterior de acordo com o instar analisado em nenhuma das espécies estudadas, inclusive nos pupários. No entanto, a posição dos espiráculos no pupário fica ligeiramente alterada, uma vez que a região cefálica se retrai para a formação da pupa e o espiráculo anterior se desloca para o ápice do pupário, dando a impressão de que a cabeça está ausente.

Os espiráculos posteriores, localizados no último segmento larval podem apresentar-se juntos ou separados e servem como forma de identificação do instar larval para as moscas da família Calliphoridae. Apresenta uma abertura espiracular em larvas de primeiro instar, duas aberturas em larvas de segundo instar e três aberturas em larvas de terceiro instar e pupários. Essa abertura é em forma de fenda, circundada por um peritrema que pode ser aberto (incompleto) ou fechado (completo) e ainda pode apresentar um pequeno botão chamado cicatriz ecdisial. A disposição dessas estruturas é utilizada para diferenciar gêneros e espécies da família Calliphoridae (Guimarães e Amorim 2006).

Todas as espécies estudadas apresentam as aberturas espiraculares correspondentes com o instar em que se encontram. Em *C. albiceps*, os espiráculos posteriores estão localizados em um peritrema aberto e a cicatriz ecdisial está presente, assim como observado por Queiroz et al. (1997) e Queiroz e Carvalho et al. (1987) através da microscopia óptica. Nesta espécie também foram observados os músculos de sustentação dos espiráculos posteriores bastante desenvolvidos já a partir do primeiro instar, no entanto, essas estruturas só foram observadas a partir do terceiro instar através da microscopia óptica (Queiroz et al. 1997).

O peritrema de *C. putoria* é aberto com a presença da cicatriz espiracular. Esses dados corroboram aqueles observados por Greenberg e Szyska (1984) e Oliveira et al. (2007) que descreveram o peritrema como incompleto e convexo. O peritrema de *C. megacephala* também é aberto e com a presença da cicatriz ecdisial.

O pupário das espécies *C. putoria* e *C. megacephala* foi estudado por Amorim e Ribeiro (2001) e estes autores relatam como principal característica para diferenciar essas espécies a distância entre o peritrema. No entanto, de acordo com Mendonça et al. (2009), a disponibilidade e qualidade de alimento durante a fase larval, influi diretamente no tamanho das larvas e, conseqüentemente, dos pupários,

impossibilitando a utilização da distância entre o peritrema como característica diagnóstica.

Os instares larvais são muito semelhantes dentro das espécies, no entanto ao compararmos as espécies entre si, as principais diferenças são observadas nos espinhos presentes no colar cefálico. Sukontason et al. (2004a) reiteram essa observação realizada por Shinoga e Kano (1974) que relatam que a maioria das características diagnósticas podem ser observadas nos espinhos entre os segmentos, enquanto o número de ramificações presentes nos espiráculos anteriores devem ser utilizado como característica complementar. Isso corrobora os resultados encontrados, uma vez que foram observadas variações entre o número de ramificações dentro da mesma espécie.

Os espinhos do colar cefálico de *C. albiceps* são mais afilados na região ventral e robustos na região dorsal, no entanto na medida em que a larva segue seu desenvolvimento, os espinhos vão se tornando mais robustos e o número de pontas também aumenta. Esses espinhos não foram observados por Queiroz e Carvalho (1987) e nem por Queiroz et al. (1999), uma vez que estas estruturas só podem ser visualizadas com mais clareza através da microscopia eletrônica de varredura.

Em *C. putoria*, os espinhos não alteram muito o formato, mas ocorre uma torção em sentido diagonal do colar. Oliveira et al. (2007) também observaram espinhos robustos e sem alterações ao longo do desenvolvimento, no entanto não relataram a torção do colar. Em *C. megacephala* não houve diferenciação dos espinhos de acordo com o desenvolvimento larval, também observado por Sukontason et al. (2003a).

No tegumento da larva de *C. albiceps* foi observada a presença de tubérculos, ausentes nas duas outras espécies estudadas. Esses tubérculos vão se tornando maiores a medida que o desenvolvimento larval ocorre. Nas larvas de primeiro instar, são praticamente imperceptíveis, no segundo instar são maiores e facilmente identificados e é possível observar uma pequena protuberância que irá formar uma fileira dupla de tubérculos na região lateral do corpo na larva de terceiro instar. No ápice destes tubérculos encontram-se uma coroa de espinhos com a ponta bastante afilada.

Chrysomya villeneuvei Patton, 1922 e *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842) (Diptera: Calliphoridae) são espécies cujas larvas são muito semelhantes a *C. albiceps*, no entanto nunca foram relatadas no Brasil (Baumgartner e Greenberg

1984), mas, segundo Mariluis e Schnack (1989) esta última espécie está presente em Buenos Aires, na Argentina.

Diversos autores descreveram estas duas espécies, buscando caracteres específicos para cada uma delas e a principal diferença foi observada nos tubérculos (Queiroz et al. 1999; Grassberg et al. 2003; Sukontason et al. 2005b; 2006). Sukontason et al. (2005b), através da microscopia óptica, relataram que os tubérculos de *C. villeneuvi* são robustos e com pequenos espinhos ao longo do tubérculo e uma pequena coroa no ápice, enquanto em *C. rufifacies*, os espinhos são mais finos e muito mais numerosos (Sukontason et al. 2003b). As larvas de *C. albiceps* não apresentam espinhos distribuídos ao longo dos tubérculos, estes estão restritos a coroa presente no ápice. Estas características também estão presentes nos pupários. Sukontason et al. (2006) descreveram os pupários das duas espécies e encontraram resultados semelhantes aos já observados para as larvas. Os pupários de *C. albiceps* também apresentaram os tubérculos organizados de maneira semelhante às larvas. Sendo assim, nas regiões onde estas três espécies convivem, a principal forma de diferenciação de larvas e pupários devem ser realizadas através dos espinhos presentes nos tubérculos.

Os pupários são frequentemente encontrados nas cenas de crime, onde o corpo encontra-se em estágio mais avançado de decomposição. Algumas vezes as larvas já não estão mais presentes e uma segunda onda de colonização se inicia. Sendo assim, a identificação correta dos pupários auxilia bastante na datação do intervalo pós-morte. De um modo geral, as características dos pupários são muito semelhantes aquelas observadas nas larvas de terceiro instar, uma vez que este é formado pelo endurecimento da cutícula deste instar.

A caracterização dos ovos, larvas e pupários de insetos de importância sanitária e forense fornece subsídios para auxiliar pesquisadores (entomólogos) e profissionais da área criminal nas investigações. Através do uso da técnica de microscopia eletrônica de varredura, já conhecida por tais profissionais, aliada a informações detalhadas sobre a morfologia dos imaturos frequentemente encontrados nos locais de crime é possível identificá-los e determinar o intervalo pós-morte. Desta forma, a elaboração de uma chave dicotômica que reúna características para cada espécie encontrada no Brasil é essencial para facilitar a identificação destes imaturos.

8. Conclusões

A – No ovo, a porção final da área mediana é uma característica que pode ser utilizada para identificar espécies de dípteros muscóides e esta pode ser melhor visualizada através da microscopia eletrônica de varredura.

B – A forma das ilhas da área mediana e as bordas elevadas das células do exocócion são características utilizadas para identificar espécies de dípteros muscóides visíveis apenas através da microscopia eletrônica de varredura.

C – As larvas de dípteros muscóides são muito semelhantes, mas através da microscopia eletrônica de varredura é possível destacar características exclusivas de cada espécie estudada.

D – O número de aberturas espiraculares no espiráculo anterior isoladamente não é suficiente para identificar as espécies de dípteros muscóides, sendo necessária a observação de outras características.

E – Os espinhos do colar cefálico, visíveis apenas através da microscopia eletrônica de varredura parecem ser a melhor característica para diferenciar as larvas das espécies de dípteros muscóides.

F – A presença de tubérculos no tegumento é uma característica que pode ser utilizada para diferenciar as espécies do gênero *Chrysomya* no Brasil, no entanto, dentre as espécies cosmopolitas que apresentam tubérculos, a diferenciação deve ser realizada através dos espinhos presentes nestes tubérculos.

G – A diferenciação dos pupários pode ser feita através dos espinhos presentes no tegumento, bem como de dobras do tecido dos pupários.

9. Referências Bibliográficas

- Amendt J, Krettek R, Zehner R. Forensic Entomology. *Naturwiss* 2004; 91: 51-65.
- Amorim JA, Ribeiro OB. Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96(6): 781-784.
- Anderson GS. The use of insects to determine time of decapitation: a case study from British Columbia. *J For Sci* 1997; 42: 947-950.
- Anderson GS. Wildlife forensic entomology: determining time of death in two illegally killed black bear cubs. *J For Sci* 1999; 44: 856-859.
- Andrade JB, Rocha FA, Rodrigues P, Rosa GS, Faria LDB, Von Zuben CJ, Rossi MN, Godoy WAC. Larval dispersal and predation in experimental populations of *Chrysomya albiceps* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 1137-40.
- 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(6): 923-26.
- Baumgartner DL, Greenberg B. The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the new world. *J Med Entomol* 1984; 21:105-113.
- Baumgartner DL. Review of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol* 1993, 30: 338-352.
- Benecke M. Six forensic entomology cases: description and commentary. *J Forensic Sci* 1998; 43: 797-805. Erratum: *J For Sci* 46: 1303.
- Bourel B, Callet B, Hédouin V, Gosset D. Flies Eggs: a New Method for the Estimation of Short-term Post-mortem Interval? *For Sci Intern* 2003; 135: 27-34.

- Braack LEO, Retief PF. Dispersal, density and habitat preference of the blowflies *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Chrysomya marginalis* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Onderstepoort J Vet Res 1986; 53: 13-18.
- Browne LB. The choice of communal oviposition sites by the Australian sheep blowfly (*Lucilia cuprina*). Austral J Zool 1958; 6: 241-247.
- Byrd JH, Castner JL. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Washington: CRC Press. 2000.
- Campobasso CP, Gherardi M, Caligara M, Sironi L, Introna F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: A comparative study. Int J Leg Med 2004; 118: 210-14.
- Carvalho LML, Thyssen PJ, Linhares AX, Palhares FAB. A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion and Human Corpses in Southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2000; 95 (1):135-138.
- Carvalho LML, Linhares AX. Seasonality of insect successions and pig carcass decomposition on a natural forest area in southeastern Brazil. J For Sci 2001; 46: 604-608.
- Carvalho LML, Thyssen PJ, Goff ML, Linhares AX. Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in a urban area of southeastern Brazil. J For Med Toxicol 2004; 5(1): 33-39.
- Carvalho CJB, 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.
- Castner JL. General entomology and arthropod biology. In: Byrd JH, Castner JL, eds. Forensic Entomology. Washington: CRC Press 2000. p. 17-42.
- Catts EP, Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. Annu Rev Entomol 1992; 37:253-272.
- Chapman RF. The Insects: Structure and function. UK. Cambridge Uni Press. 1998.
- Chu-Wang IW, Axtell RC. Fine structure of the dorsal organ of the house fly larva, *Musca domestica*. L Z Zellforsch 1971; 117: 17-34.
- Chu-Wang IW, Axtell RC. Fine structure of the ventral organ of the house fly larva, *Musca domestica*. L Z Zellforsch 1972; 130: 489-495.

Cragg JB. The natural history of sheep blowflies in Britain. *Ann Appl Biol* 1955; 42; 197–207.

d'Almeida JM. Substratos utilizados para a criação de Dípteros Caliptrados em uma Área Rural do Estado do Rio de Janeiro. *Arq Univ Fed Rur Rio de Janeiro* 1986; 9 (1-2):13-22.

d'Almeida JM. Capture of caliptrate flies with different breeding substrates on beaches in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88(2): 215-20.

David JA, Rocha T, Caetano FH. Ultramorphological characteristics of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) eggs and its eclosion. *Micron* 2008; 39(8): 1134-1137.

Degrugillier ME, Grosz SG. Effect of female accessory gland ablation on fertility of screw-worms, stable flies, and face flies. *Ann Entomol Soc Am* 1981;74:217-221.

Erzinclioglu YZ. The value of chorionic structure and size in the diagnosis of blowfly eggs. *Med Vet Entomol* 1989; 3:281-285.

Faria LDB, Orsi L, Trinca LA, Godoy WAC. Larval predation by *Chrysomya albiceps* on *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria*. *Ent Exp App* 1999; 90: 149–55.

Faria LDB, Godoy WAC, Trinca LA. Dynamics of handling time and functional response by larvae of *Chrysomya albiceps* (Dipt., Calliphoridae) on different prey species. *J Appl Entomol* 2004; 128(6): 432-36.

Ferrar P. A guide to the breeding habits and immatures stages of Diptera Cyclorrhapha. 1987. Entomonograph, Scandinavian Science Press.

Ferreira MJM, Santos BB, Cunha HF. Flutuação populacional de espécies de *Chrysomya* Robineau-Desvoidy (Diptera: Calliphoridae) em pomar de Goiânia, Goiás, Brasil. *Rev Bras Biol* 1995; 12(3): 557-562.

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

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

Gião JZ, Godoy WAC. Ovipositional Behavior in Predator and Prey Blowflies. *J Ins*

Behaviour 2007; 20(1): 77-86.

Goff ML, Lord WD. Entomotoxicology: a new area for forensic investigations. Am J For Med Pathol 1994; 15: 51-57.

Goff ML, Omori AI, Goodbrod JR. Effect of cocaine in tissue on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). J Med Entomol 1989; 26: 91-93.

Grassberg M, Friedrich E, Reiter C. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new Forensic Indicator in Central Europe. Int J Legal Med 2003; 117: 75-81.

Greenberg B. Flies and Diseases. Vol. I: Ecology, Classification and Biotic Associations. NJ. Ed. Princeton University. 1971.

Greenberg B. Flies and Diseases. Vol. II: Biology and Diseases Transmission. NJ. Ed. Princeton University. 1973.

Greenberg B, Szyska ML. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). Ann Entomol Soc Am 1984; 77: 488-517.

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

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

Guimarães JH, Prado AP, Buralli GM. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* R.D. (Diptera: Calliphoridae) in Brazil. Rev Brasil Entomol 1979; 23: 245-255.

Guimarães JH, Papavero N, Prado AP. As Miíases na Região Neotropical. Rev Bras Zool 1983; 1(4): 239-416.

Guimarães JH, Papavero N. Myiasis in Man and Animals in the Neotropical Region. NY. Ed. Plêiade. 1999.

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

Hall MJR. Trapping the flies that cause myiasis: Their responses to host stimuli. Ann Trop Med Parasitol 1995; 89: 333-357.

- Hayat MA. Principles and Techniques of Electron Microscopy. Biological Applications. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 1970.
- Henssge C, Althaus L, Bolt J, Freislederer A, Haffner HT, Henssge CA, Hoppe B, Schneider V. Experiences with a compound method for estimating the time since death. II. Integration of non-temperature-based methods. Int J Legal Med 2000; 113(6): 320-31.
- Hinton HE. A fly larva that tolerates dehydration and temperatures of -270 °C to +102 °C. Nature (London) 1960; 188: 336-337.
- Hinton HE. Biology of insect eggs. Pergamon Press, Oxford. 1981.
- Introna F, Campobasso CP, Goff ML. Entomotoxicology. Forensic Sci Int 2001; 15:120(1): 42-47.
- James MT. Family Calliphoridae. In: A catalogue of the America South of the United States, São Paulo, Mus Zool USP, 1970; Fasc. 108: 88p.
- Jirón LF, Cartín VM. Insect succession in the decomposition of a mammal in Costa Rica. J New York Entomol Soc 1981; 89:158-165.
- Kashyap VP, Pillai VV. Efficacy of entomological method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. For Sci Int 1989; 40: 245-50.
- Keh B. Scope and applications of Forensic Entomology. Ann Rev Entomol 1985; 30: 137-154.
- Kitching RL. The immature stages of the Old-World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Velleneuve, with comparative notes on other Australasian species of *Chrysomya*. Bull Entomol Res 1976; 66: 195-203.
- Laurence BR. Geographical expansion range of *Chrysomya* blowflies. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 1981; 75(1): 130-31.
- Linhares AX. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. Rev Bras Entomol 1981; 25(3): 189-215.
- Liu D, Greenberg B. Immature stages of some flies of forensic importance. Ann Entomol Soc Am 1989; 82: 80-93.

- Lopes HS, Rios Leite AC. 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(3): 407-13.
- Lopes HS, Rios Leite AC. Morphology of the egg of *Sarcodexia lambens* (Diptera: Sarcophagidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; 84(4): 497-500.
- Lord WD, Stevenson JR. Directory of forensic entomologists. Am Reg Prof Entomol 1986; p. 42.
- Lothe F. The use of larval infestation in determining time of death. Med Sci Law. 1964; 4: 113-115.
- Maldonado MA, Centeno N. Quantifying the potential pathogens transmission of the blowflies (Diptera: Calliphoridae). Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98(2): 213-216.
- Margaritis LH. Structure and Physiology of Eggshell. In: Kerkut GA, Gilbert LI org. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. v.I. Embryogenesis and Reproduction. Pergamon Press, Oxford, UK. 1985.
- Mariluis JC, Schnack JA. Ecology of the Blowflies of an Eusynanthropic Habitat near Buenos Aires (Diptera: Calliphoridae). Eos 1989; 65: 93-101.
- Mazur GD, Regier JC, Mafatos CF. Morphogenesis of silkmoth chorion sequential modification of an early helicoidal framework through expansion and densification. Tissue Cell 1989; 21: 227-242.
- McAlpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey JH, Vockeroth JR, Wood DN. 1981. Manual of Nearctic Diptera, Ottawa.
- Mello RP. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorhapha) Encontradas no Brasil. Entomol Vect 2003, 10(2): 255-268.
- Mendonça PM, Santos-Mallet JR, Mello RP, Gomes L, Queiroz MMC. Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations. Micron 2008; 39: 802-807.
- Mendonça PM, Queiroz MMC, d'Almeida, JM. Rearing *Chrysomya megacephala* on artificial diets composed of varying concentrations of albumin. Braz Arch Biol Tech 2009; 52: 421-426.

- Moura MO, Carvalho CJB, Monteiro-Filho ELA. A Preliminary Analysis of Insects of Medical-Legal Importance in Curitiba, State of Paraná. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92(2): 269-274.
- Neves DP. Parasitologia Humana. RJ. Ed. Atheneu. 1983.
- Norris KR. The Bionomics of Blowflies. Ann Rev Entomol 1965; 10:47-68.
- Nuorteva P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeshi CG, Eckert WG, Tedeshi LG org. Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards. v. II. London, 1977.
- Oliva A. Insectos de interés forense de Buenos Aires (Argentina). Primeira lista ilustrada y dados bionomicos. Rev Mus Argentino Cienc Nat "Bernardino Rivadavia" 1997; 7: 13-59.
- Oliveira HG, Gomes G, Morlin JJ, Von Zuben CJ, Linhares AX. The Effect of Buscopan® on the Development of the Blow Fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae) J For Sci 2009; 54(1): 202-06.
- Oliveira MS, Mello RP, Queiroz MMC. Morfologia e duração dos instares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), em laboratório. Rev Bras Biol 2007; 51(2): 239-245.
- Oliveira VC, Mello RP, d'Almeida JM. Dípteros Muscóides como Vetores Mecânicos de Ovos de Helmintos em Jardim Zoológico, Brasil. Rev Saúde Pub 2002; 36(5): 614-620.
- 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. J For Med Toxicol 2004; 5(1): 40-44.
- Oliveira-Costa J. Entomologia Forense - quando os insetos são vestígios. Campinas, 2003.
- Payne JA. A summer carrion of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. Ecology 1965; 46:592-602.
- Peterson RD, Newman Junior SM. Chorionic structure of the egg of the screwworm *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol 1991; 28: 152-160.

Prado AP, Guimarães JH. Estado atual da dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). Rev Bras Ent 1982; 26: 225-231.

Prins AJ. Morphological and biological notes on six south African blowflies (Diptera: Calliphoridae) and their immatures stages. Ann S Afr Mus 1982; 90: 201-217.

Queiroz MMC, Mello RP, Lima MM. Morphological aspects of the larval instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) reared in the laboratory. Mem Inst Oswaldo Cruz 1997; 92(2): 187-196.

Queiroz MMC, Norberg NA, Maure EAP, Toledo RF, Gazêta GS, Dutra AEA, Rodrigues-Guimarães R. Veiculação de bactérias patogênicas por moscas sinantrópicas coletadas em restaurantes, hospitais e feiras da Baixada Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil. [Apresentação no XIV Congresso Latinoamericano de Parasitologia; 1999. Acapulco, Guerrero; México].

Queiroz SM, Carvalho CJB. Chave Pictórica e Descrição de Larvas de 3º instar de Diptera (Calliphoridae, Muscidae e Fannidae) em Vazadouros e Resíduos Sólidos Domésticos em Curitiba, PR. Ann Soc Entomol Bras 1987; 16: 165-188.

Reigada C, Godoy WAC. Dispersal and predation behavior in larvae of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). J Ins Beh 2005; 18: 543–55.

Rios Leite AC, 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(2): 219-26.

Rios Leite AC, Lopes HS. Scanning electron microscopy of the first instar larvae of *Sarcodexia lambens* and *Peckia chrysostoma* (Diptera: Sarcophagidae). Mem Inst Oswaldo Cruz 1989; supl IV: 303-07.

Salviano RJB, Mello RP, Beck LCNH, Ferreira A. Calliphoridae (Diptera) associated with human corpses in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Entomol y Vect 1996; 3 (5): 145-146.

Salviano RJB, Mello RP, Santos RFS, Beck LCNH, Ferreira A. Ocorrência de dípteros caliptrados em cadáver humano. [Apresentação no XX Congresso Brasileiro de Zoologia; 1994. Rio de Janeiro, RJ].

Serra-Freire NM, Mello RP. Entomologia & Acarologia na Medicina Veterinária. Rio de Janeiro. LF Livros. 2006.

Shinonaga S, Kano B. Studies on the flies occurring from the excrement of pasturing cattle and other herbivorous animals. III. On the 3rd stage larvae of the genus *Morellia* R-D from Japan (Diptera: Muscidae). Jpn J Sanit Zool 1974; 25: 211-215.

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

Souza AM. Sucessão entomológica na decomposição de carcaça animal, com ênfase nas famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera). Campinas; 1994 [Tese de Mestrado].

Sukontason KL, Sukontason K, Piangjai S, Boonchu N, Chaiwong T, Vogtsberger RC, Kuntalue B, Thijuk N, Olson JK. Larval morphology of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) using scanning electron microscopy. J Vector Ecol 2003a; 28(1): 47-52.

Sukontason KL, Sukontason K, Lertthamngtham S, Kuntalue B, Thijuk N, Vogtsberger RC, Olson JK. Surface ultrastructure of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) larvae (Diptera: Calliphoridae). J Med Entomol 2003b; 40: 259-267.

Sukontason K, Sukontason KL, Ngern-Klun R, Sripakdee D, Piangjai S. Differentiation of the third instar of forensically important fly species in Thailand. Ann Ent Soc Am 2004a; 97(6): 1069-1075.

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

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

Sukontason K, Sukontason KL, Piangjai S, Narongchai P, Samai W, Noppawan B, Sripakdee D, Ngern-Klun R, Siriwattanarungsee S. Morphology of second and third instars of *Chrysomya villeneuvei* Paton (Diptera: Calliphoridae), a fly species of forensic importance. For Sci Int 2005b; 154: 195-199.

Sukontason KL, Narongchai P, Kanchai C, Vichairat K, Piangjai S, Boonsriwong W, Sripakdee D, Chaiwong T, Kuntalue B, Siri wattanarungsee S, Sukontason K. Morphological comparison between *Chrysomya rufifacies* (Macquart) and *Chrysomya villeneuvei* Patton (Diptera: Calliphoridae) puparia, forensically important blow flies. For Sci Int 2006; 164: 230-234.

Thyssen PJ, Linhares AX. First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). Biol Res 2007; 40(3): 271-80.

Tullis K, Goff ML. Arthropod succession in exposed carrion in a tropical rainforest on O'ahu Island, Hawaii. J Med Entomol 1987; 24(3): 332-339.

Ulyett GC. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. Phil Trans Real Soc London 1950; 234: 77-174.

Valgode MA, Coelho VMA, Queiroz MMC. Levantamento da fauna de califorídeos (Diptera: Calliphoridae) na Área de Reflorestamento da Universidade Iguazu – UNIG. Revista UNIG 1997;1: 57-58.

Zumt F. Calliphoridae I: Calliphorini and Chrysomyiini. Explor Parc Natn Albert Miss G F de Witte 1956; 87:1-200.

Zumt F. Myiasis in Man and Animals in the Old World. London. Ed. Butterworths. 1965.