

Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais-FCBA
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade-PPGECB

Análise do perfil químico cuticular de imaturos e adultos da
mosca varejeira de importância forense *Chrysomya megacephala*
(Calliphoridae: Diptera): implicações para estimativa do Intervalo
Pós-Morte

Michele Castro de Paula

Dourados - MS
Março de 2018

Universidade Federal da Grande Dourados
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
Programa de Pós-Graduação em
Entomologia e Conservação da Biodiversidade

Michele Castro de Paula

ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE IMATUROS E
ADULTOS DA MOSCA VAREJEIRA DE IMPORTÂNCIA FORENSE
Chrysomya megacephala (Calliphoridae: Diptera): IMPLICAÇÕES PARA
ESTIMATIVA DO INTERVALO PÓS-MORTE

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE.
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação

Orientador: William Fernando Antonialli Junior

Coorientadora: Claudia Andrea Lima Cardoso

Dourados – MS

Março de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

P324a Paula, Michele Castro de
Análise do perfil químico cuticular de imaturos e adultos da mosca varejeira de importância forense *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae: Diptera) : implicações para estimativa do Intervalo Pós-Morte / Michele Castro de Paula. –2018.
77 f. il.

Orientador: William Fernando Antoniali Junior.
Coorientadora: Claudia Andrea Lima Cardoso.
Tese (Doutorado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade)–
Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

1. Insetos necrófagos. 2. Hidrocarbonetos cuticulares. 3. Intervalo Pós-Morte Mínimo (IPMmin) – Perícia criminal. 4. Entomologia forense. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com dados fornecidos pelo autor

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

"ANÁLISE DO PERFIL QUÍMICO CUTICULAR DE IMATUROS E ADULTOS
DA MOSCA VAREJEIRA DE IMPORTÂNCIA FORENSE *Chrysomya
megacephala*: IMPLICAÇÕES PARA ESTIMATIVA DO INTERVALO PÓS-
MORTE".

Por

MICHELE CASTRO DE PAULA

Tese apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de
DOUTORA EM ENTOMOLOGIA E CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
Área de Concentração: Biodiversidade e Conservação



Dr. William Fernando Antoniali Junior
Orientador/Presidente – UEMS



Dr.^a Viviana de Oliveira Torres
Membro Titular – UFGD



Dr. Váiter Vieira Alves Junior
Membro Titular – UFGD



Dr.^a Patricia-Jacqueline Thyssen
Membro Titular – Unicamp



Dr. Jairo Campos Gaona
Membro Titular – UFGD

Aprovada em: 13 de março de 2018.

Biografia do Acadêmico

Michele Castro de Paula, nascida em 23 de agosto de 1987, mãe Aparecida Franco de Castro e pai Sergio de Paula Ribeiro, cursou o ensino fundamental e médio na escola Estadual Austrílio Capilé Castro, Nova Andradina-MS (1994-2005). Cursou Graduação no Centro Universitário da Grande Dourados- UNIGRAN (2007-2011). Desenvolvi iniciação científica (2011), trabalhando com formigas arborícolas, buscando entender se a fenologia das árvores influenciava sua riqueza e abundância. Cursei Mestrado em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, pela Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - FCBA da Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD (2012-2014) e, nesta etapa investiguei a ação das formigas na decomposição de carcaças e seu impacto frente ao principal grupo de importância forense, as moscas varejeiras. A dissertação rendeu um artigo Intitulado “Action of Ants on Vertebrate Carcasses and Blow Flies (Calliphoridae)”, publicado na revista *Journal of Medical Entomology* com fator de Impacto 1.650. E durante o doutorado foram publicados mais dois artigos sendo um deles referente ao primeiro Capítulo da tese, Intitulado “Chemotaxonomic profile and intraspecific variation in the blow fly of forensic interest *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)” também publicado na revista *Journal of Medical Entomology*, e o último publicado na revista *Neotropical Entomology* com fator de Impacto de 0.756 Intitulado “Variation in Venoms of *Polybia Paulista* Von Ihering and *Polybia Occidentalis* Olivier (Hymenoptera: Vespidae), Assessed by the FTIR-PAS Technique”.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concedido capacidade, força e determinação para realizar este trabalho.

Gostaria de agradecer depois a minha mãe Aparecida Franco de Castro pelo exemplo de força e determinação, pela garra que sempre demonstrou para enfrentar os obstáculos, e sobretudo, pela importância dispensada à minha formação.

Ao meu irmão pelo companheirismo, amizade e incentivos sempre constantes.

Ao meu esposo João Paulo da Silva, obrigada primeiramente por me amar e fazer parte da minha vida, apoiando-me e incentivando em todos os momentos difíceis; pela compreensão em virtude da minha ausência devido ao tempo dedicado para desenvolvimento deste trabalho. E também gostaria de agradecer imensamente pelo pai maravilhoso que é, pois sem o seu apoio não seria possível a conclusão desta etapa tão importante em minha vida.

Ao meu filho Lorenzo, um presente que Deus me deu em meio à tese, você surgiu em minha vida me tornando uma pessoa melhor, mais forte e me proporcionado tantas alegrias. Te amo muito meu filho.

Aos meus familiares, por sempre acreditarem em meu potencial e estarem ao meu lado me apoiando e incentivando.

Ao meu orientador, professor Dr. Willliam Fernando Antonialli Junior pela excelente orientação e dedicação, pelo voto de confiança desde o mestrado, por acreditar na minha capacidade e apostar suas fichas mesmo sem ser uma linha de pesquisa a qual trabalhava. Serei eternamente grata pelo tempo despendido em minha formação, pela paciência, pelas “broncas” merecidas, pois me ajudaram a crescer. E ainda, agradeço pelo precioso conhecimento partilhado ao longo desses 6 anos, tornando-se um exemplo a ser seguido, tenho muito orgulho em dizer que você é meu “pai científico”.

A minha coorientadora, professora Dra. Claudia Andrea Lima Cardoso, pela brilhante coorientação, pelo apoio e amizade dispensados a mim nas horas difíceis, pelo voto de confiança, por acreditar na minha capacidade e por todas outras ocasiões nas quais foram indispensáveis sua ajuda, por todo seu suporte, pois sem sua enorme capacidade de trabalho o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

Aos meus “irmãos científicos Labequianos”, Erika, Junior, Eva, Kamylla, Rafa, Dayana, Ingrid, Márlon, Angélica, Denise, Nathan, Juliana, Dailson, Andrely, Fabiane, Viviana, sou eternamente grata por todo companheirismo e amizade dispensados nesses 6 anos. Seriam tantos momentos que precisaria expor minha gratidão cuja lista não caberia aqui, mas não posso deixar de agradecer ao apoio durante minha gestação em meio ao doutorado. Serei eternamente grata por todo o apoio e amizade a qual dispensaram para comigo. Amo muito todos vocês.

Aos demais amigos, por estarem sempre comigo, presentes em minha vida, me apoiando, incentivando e me ajudando a superar essa etapa em minha vida.

À todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho, agradeço de coração.

À Universidade Federal da Grande Dourados.

A CAPES pela bolsa concedida.

A todos vocês, o meu mais sincero agradecimentos.

Dedicatória

Com carinho, ao que tenho de mais valioso: Ao meu filho Lorenzo, meu esposo João Paulo, minha mãe Aparecida, meu irmão Daniel, Dedico.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
CALLIPHORIDAE	11
ESPÉCIE <i>Chrysomya megacephala</i>	12
HIDROCARBONETOS CUTICULARES	12
HIDROCARBONETOS CUTICULARES NA TAXONOMIA DE ESPÉCIES DE IMPORTÂNCIA FORENSE.....	14
REFERÊNCIAS	17
CAPÍTULO I	28
PERFIL QUIMIOTAXONÔMICO E VARIAÇÃO INTRAESPECÍFICA NA MOSCA VAREJEIRA DE INTERESSE FORENSE <i>Chrysomya megacephala</i> (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)	28
RESUMO.....	28
INTRODUÇÃO	31
MATERIAL E MÉTODOS	33
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO	37
REFERÊNCIAS	41
TABELAS	48
FIGURAS	52
CAPÍTULO II.....	55
VARIAÇÃO DE COMPOSTOS EM EXÚVIAS DE <i>Chrysomya megacephala</i> (DIPTERA-CALLIPHORIDAE): IMPLICAÇÕES PARA ESTIMATIVA DO INTERVALO PÓS-MORTE EM INVESTIGAÇÕES FORENSES.....	ERRO! INDICAD
RESUMO.....	55
INTRODUÇÃO	56
MATERIAL E MÉTODOS	58
RESULTADOS	60
DISCUSSÃO	61

REFERÊNCIAS	65
TABELA.....	71
FIGURAS	73
CAPÍTULO III	75
ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA NO INFRAVERMELHO COMO FERRAMENTA ÚTIL PARA AGILIZAR ANÁLISES DE AMOSTRAS DE IMPORTÂNCIA FORENSE.....	75
RESUMO.....	75
INTRODUÇÃO	76
MATERIAL E MÉTODOS	79
RESULTADOS.....	81
DISCUSSÃO	82
REFERÊNCIAS	87
TABELA.....	94
FIGURAS	95
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97

OBS: Todos os Capítulos estão formatados de acordo com as normas Revista “Journal of Medical Entomology” Fator de Impacto: 1.650

**Análise do perfil químico cuticular de imaturos e adultos da mosca
varejeira de importância Forense *Chrysomya megacephala*
(Calliphoridae: Diptera): Implicações para estimativa do Intervalo
Pós-Morte**

RESUMO

A entomologia forense é a ciência que estuda a entomofauna e aplica-a em questões ligadas ao âmbito judicial. Sendo que a principal ordem e a mais estudada é a Diptera, e os califorídeos conhecidos como “moscas varejeiras” são consideradas como a família mais importante para a entomologia forense, devido a sua abundância e frequência com que são encontradas. Estes insetos são então utilizados para a principal aplicação dos mesmos no âmbito criminal, a estimativa do Intervalo Pós-Morte Mínimo (IPMmin). No entanto, há vários entraves para se obter uma estimativa precisa, seja pelo fato das amostras estarem em más condições, impossibilitando sua criação para posterior identificação, ou pelo fato de não haver chaves que cubram todos imaturos de moscas de interesse forense. Neste sentido, vários estudos sugerem os hidrocarbonetos cuticulares como uma ferramenta alternativa para auxiliar a obter resultados mais ágeis para solucionar perícias forenses. Estes compostos são parte constituinte da camada lipídica, e parecem ter surgido pela necessidade do inseto evitar a perda de água, e posteriormente teria evoluído para a comunicação química, de modo que cada espécie apresenta um perfil característico. Ainda que se saiba que estes compostos podem ser usados como ferramenta útil para Entomologia Forense, são escassos os estudos usando esta técnica em nosso país. Portanto os objetivos deste estudo foram: 1) Determinar o perfil quimiotaxonômico e a variação intraespecífica dos hidrocarbonetos cuticulares de *Chrysomya megacephala* uma espécie de mosca de interesse forense. 2) Avaliar se os compostos químicos de pupários de moscas de interesse forense, de diferentes ciclos de oviposição podem ser utilizados para agilizar os resultados das perícias. 3) Testar a eficácia de uma técnica alternativa para avaliar diferenças na composição dos perfis químicos cuticulares em amostras de interesse forense. As amostras de moscas foram coletadas de duas populações distintas e seus compostos cuticulares avaliados por duas técnicas diferentes. A partir dos resultados obtidos os compostos cuticulares podem ser usados para distinguir tanto o estágio, quanto a população de origem das amostras, tendo importante implicação na determinação do IPM e do local onde ocorreu o crime.

Compostos químicos dos pupários de diferentes gerações podem fornecer resultados confiáveis para auxiliar no campo da perícia criminal. Os resultados das técnicas alternativas mostram que elas podem ser utilizadas e, como independe da preparação de amostras pode agilizar ainda mais as perícias criminais.

Palavras chave: Hidrocarbonetos cuticulares; Insetos necrófagos; Infravermelho; IPM; Estágios de desenvolvimento; CG-EM; FTIR-PAS

**Analysis of cuticular chemical profile of immature and adults of the
blow fly of forensic importance *Chrysomya megacephala*: implications
for estimation of Postmortem Interval**

ABSTRACT

Forensic entomology is the study of the insect fauna applied to legal context related issues. Diptera is the major order and the most studied, and Calliphoridae, known as "blow flies" are considered the most important family to forensic entomology, since they are usually the first insects to locate carcasses and perform oviposition. These insects are used to the main application thereof in legal context, the estimation of minimum postmortem interval (PMI_{min}). However, there are several obstacles to get an accurate estimate, be it by the fact that samples are in poor condition, making it impossible for rearing for subsequent identification, or that there are no identification keys that cover all immature flies of forensic interest, etc. In this sense, multiple studies suggest cuticular hydrocarbons as a complementary taxonomic tool to help get faster results to solve forensic skills. These compounds are a constituent part of the lipid layer, and seem to have emerged by the need of the insect to avoid water loss, and later evolved to chemical communication. It is known that they are species-specific, acting as a "fingerprint" of the insect. Although it is known that these compounds can be used as a useful tool for forensic entomology, studies using this technique in our country are still rare. Therefore, the aims of this study were: 1) Determine the chemotaxonomic profile and intraspecific variation of cuticular hydrocarbons of a fly of forensic interest. 2) Assess whether chemical compounds of pupal exuviae of flies of forensic interest of different waves of oviposition could be used to expedite the results of forensic skills. 3) Test the effectiveness of an alternative technique to assess differences in the composition cuticular chemical profiles on samples of forensic interest. Samples of flies were collected from two distinct populations and their cuticular compounds evaluated by two different techniques. According to the results, cuticular compounds can be used to distinguish both the instar, and the population of origin of samples, having important implications in determining the PMI and location where the crime occurred. Chemical compounds of the exuviae of different generations can provide reliable results to assist in the field of criminal expertise. The results of the alternative techniques show that they

can be used and, since there is no need of sample preparation it can speed up even more the criminal skills.

Keywords: Cuticular hydrocarbons; Infrared; PMI; Exuviae, developmental stages; GC-MS; FTIR-PAS.

INTRODUÇÃO

Os artrópodes são considerados em conjunto como o grupo que compõem a maior biomassa dentre os animais (Barnes & Rupert 1993). Seu sucesso é marcado pelo elevado número de espécie e por possuírem a maior irradiação evolutiva dentre os Hexapoda, habitando uma variedade de ambientes, seja ele terrestre ou aquático, e ainda a diferentes altitudes e latitudes, sendo amplamente distribuídos pelo mundo (Barnes & Rupert 1993, Brusca & Brusca 2007). Devido a esta grande capacidade de se adaptar em diferentes tipos de ambientes, também podem ser encontrados em cenas de crimes (Benecke 2001).

A ciência que estuda os insetos que interagem com os acontecimentos do âmbito pericial legal denomina-se Entomologia Forense. Segundo Lord & Stevenson (1986) ela pode ser dividida em três categorias:

Entomologia Urbana: Quando insetos causam algum tipo de dano, ou seja, eles são o problema. Estão relacionados a litígios e ações civis envolvendo por exemplo infestações de cupins, baratas entre outros organismos nocivos que causam danos a imóveis ou depreciam seus valores, e até mesmo organismos que causam danos em árvores, comprometendo a segurança em vias públicas.

Entomologia de Produtos Estocados: Geralmente estes casos também envolvem litígios, e estão relacionados a produtos infestados e/ou contaminados em grande escala, seja pela presença de insetos ou partes deles, como por exemplo, em barras de cereais, prensados à absorventes ou fraldas descartáveis, ou até mesmo dentro de alimentos, bebidas entre outros.

Entomologia Médica Legal: Diferentemente das duas áreas acima citadas, no qual os insetos causam problemas, aqui eles são parte constituinte da investigação compondo a prova técnica, e estão envolvidos em eventos criminais, geralmente crimes violentos como assassinato, suicídio e estupro, desta forma auxiliando peritos e médicos legistas a chegarem ao possível suspeito.

O primeiro caso registrado encontrado na literatura no qual foi descrito o uso de insetos na resolução de um crime, foi documentado no século 13 pelo advogado e investigador Sung Tzu em um livro texto chamado “The washing away of wrongs”, no qual ele descreve um assassinato por golpes a foice que foi solucionado com pistas fornecidas por moscas que foram atraídas por resíduos de sangue no instrumento usado no crime, o que levou o dono da foice a confessar o delito (Benecke 2001).

Contudo, os primeiros trabalhos da área de Entomologia Forense, de fato, se deram em meados de 1855 com o francês Bergeret, que baseado nos insetos realizou a primeira estimativa do Intervalo Pós-morte (IPM) (Benecke 2001), ou seja o tempo decorrido desde a morte até o achado de corpo (Amendt et al., 2007). O segundo caso foi publicado em 1879 pelo presidente da Sociedade Francesa de Medicina Forense, e Perier e Mégnin auxiliaram nas identificações das espécies. Mégnin então em 1894 publica “La Faune des Cadavres”, que se tornou base para fundação da ciência que passaria a ser conhecida como Entomologia Forense.

Após um intervalo com poucos estudos de relevância, a Entomologia Forense retorna entre 1960 e 1980, principalmente por meio dos trabalhos publicados por Marcel Leclecq, um médico belga e Peka Nuorteva um biólogo finlandês (Benecke 2001). E em 1965 a importância dos insetos nas investigações criminais torna-se evidente no estudo de Payne, no qual ele comparou a decomposição de carcaças que tiveram o acesso aos insetos impedido com outras sem manipulação e avaliou que as carcaças desprotegidas tiveram seu tempo de decomposição significativamente menor do que aquelas que não sofreram ação de insetos (Payne 1965).

Uma infinidade de espécies de insetos é atraída para uma carcaça, e esta é utilizada como fonte protéica e ainda algumas fêmeas de espécies necrófagas as usam para maturação de seus ovários e desenvolvimento completo de sua prole (Norris 1965). Os insetos que estão presentes e associados à decomposição de carcaças e/ou cadáveres são classificados por Norris (1965) de acordo com seus hábitos alimentares em quatro categorias ecológicas: espécies necrófagas que utilizam a carcaça como recurso, seja na forma adulta ou imatura; onívoros, que se alimentam tanto da carcaça como da fauna associada; predadores, que frequentam as carcaças para se alimentarem de espécies que ali se encontram; e espécies acidentais, as quais acabam utilizando a carcaça de algum modo, como abrigo ou extensão de seu habitat, mas o recurso em si não é primordial para a sobrevivência do inseto.

Segundo Smith (1986) a ordem Diptera é considerada como o grupo mais atuante durante o processo de decomposição. Para Benecke (2001), os dípteros são considerados como uma das ordens de extrema importância na colonização de carcaças, pois estão sempre presentes em grande número. Do ponto de vista forense, sua importância se dá pelo fato de vários representantes desta ordem também colonizarem cadáveres humanos (Greenberg 1991). Particularmente as moscas sarcossaprófagas pertencentes a família Calliphoridae, conhecidas como “moscas varejeiras” localizam a carcaça minutos após a morte, se alimentam da fonte proteica, e realizam sua ovipostura (Goff & Lord 1994). Por fazer parte desta primeira onda de colonização, são extremamente importantes para a estimativa do intervalo pós-morte. Dentre os gêneros constituintes desta família *Chrysomya*, *Lucilia*, *Cochliomyia*, *Hemilucilia* e *Calliphora* são os mais encontrados em estudos com carcaças realizados na Região Neotropical (Oliveira-Costa 2013).

Em investigações criminais os insetos, sobretudo os dípteros se tornam uma evidência física em um julgamento, podendo ser utilizados para indicar diversas situações, como auxiliar na determinação do local do crime (Oliveira-Costa 2013), pois algumas espécies tem preferência por realizar postura em condições de sombra ou luz (Smith 1986), ou ainda algumas espécies apresentam distribuições e habitats específicos, como aqueles que só ocorrem em ambientes de mata, como é o caso de *Hemilucilia semidiaphana*, considerada como indicador forense para região florestada (Carvalho & Linhares 2001). Centeno et al. (2002) estudando carcaças de porcos expostas e outras protegidas de insetos, encontraram inúmeras diferenças em relação ao tempo de decomposição e também ao padrão de sucessão. Desta forma, baseando-se no habitat natural, biologia e a distribuição geográfica das espécies coletadas na cena da morte, é possível determinar o local onde a morte ocorreu (Hall 1990).

Os insetos também podem ser usados para determinar se houve negligência perante incapazes (Oliveira-Costa 2013). Lord & Rodriguez (1989) discutem técnicas para a aplicação de insetos em investigações de casos de negligência perante incapazes com base no desenvolvimento de larvas de moscas encontradas nas fraldas, e assim determinar o período em que a vítima foi privada de cuidados.

Determinar a causa morte, como por exemplo, em casos de morte devido ao uso excessivo de drogas e\ou medicamentos cujos resíduos podem ser encontrados nos tecidos dos insetos, principalmente em casos onde o corpo está em estágio de decomposição avançada, e análises toxicológicas tradicionais já não são viáveis (Goff &

Lord 2001). Uma vez que estes compostos podem afetar o ciclo de desenvolvimento do inseto, ou mesmo serem encontrados resíduos nos tecidos do próprio inseto, até mesmo podem impedir a colonização do cadáver por insetos necrófagos (Leclercq & Vaillant 1992).

Determinar ainda o culpado em casos de sequestro ou crime sexual, por meio de análise de DNA mitocondrial retirado do trato digestório de mosquitos presentes no cativeiro, é possível visto que só poderiam ter se alimentado da vítima ou do carcereiro (Kreike & Kamper 1999, Hawley & Budowle 2000). Outra aplicação dos insetos no campo da ciência forenses é ajudar a determinar se a morte foi violenta ou não, observando sítios de alimentação não usuais utilizados por adultos e imaturos. Pois normalmente, os insetos necrófagos realizam postura em lugares abrigados como orifícios naturais do corpo ou bordos de ferimentos (Smith 1986, Catts & Haskell 1991). Portanto, se imaturos forem observados apenas nos ductos naturais, é provável que o cadáver não tenha ferimentos expostos (Oliveira-Costa 2013).

No entanto, a principal aplicação dos insetos no campo da Entomologia Forense é, de fato, na determinação do Intervalo Pós-morte (IPM) (Oliveira-Costa 2013). Para Catts (1992) a estimativa do IPM pode ser determinada, tanto por meio da aplicação do tempo de desenvolvimento dos imaturos, quanto pela sucessão entomológica.

Utilizando os imaturos, a estimativa do intervalo mínimo é dada pela estimativa da idade do inseto associado ao cadáver (Catts 1992). Segundo Smith (1986) o tempo de desenvolvimento de larvas de moscas mostra o mínimo de tempo em que o corpo foi exposto em condições apropriadas para os insetos, visto que raramente o inseto realizará oviposturas em uma pessoa viva. Esta estimativa utilizando o ciclo de vida dos imaturos leva em consideração quanto tempo que o imaturo leva para completar seu ciclo, ambos associados aos valores de temperatura e fatores ambientais (Erzinçlioglu 1983, Smith 1986). Já outra alternativa, é estimativa do IPM por meio da sucessão entomológica, que é feita por meio da sequência das espécies que chegam ao recurso (Nuorteva 1977). Desta forma, os espécimes atraídos ao corpo em decomposição em geral substituem-se ou crescem na carcaça, de modo que cada estágio de decomposição apresenta condições ideais para determinada espécie (Oliveira-Costa 2003). Portanto é possível traçar um paralelo entre os estágios de decomposição e a ocorrência dos espécimes, sendo possível então estimar o IPM, principalmente em corpos em estágios de decomposição avançada.

Para que haja uma estimativa precisa do IPM é imprescindível que a identificação da espécie em questão seja precisa, visto que cada espécie apresenta diferentes tempos de desenvolvimento (Jordaens et al. 2013, Oliveira-Costa et al. 2013), e caso a identificação da espécie seja feita errada, isto implicará em uma estimativa errônea (Catts & Goff 1992). Outro ponto a se considerar é que deve-se utilizar o imaturo “mais velho” ou seja o indivíduo oriundo da primeira onda de oviposição (Oliveira-Costa 2013). E, ainda deve-se observar se há dispersão larval pós-alimentar e/ou pupas localizadas a distâncias variáveis do cadáver para não deixar de considerar o estágio mais velho que o abandonaram (Von Zuben 2001). Segundo Introna et al. (1998) a determinação do IPM preciso é de extrema importância em qualquer investigação forense, seja ela relacionada a homicídio, suicídio, morte acidental ou causa natural.

Deste modo, a maioria dos métodos utilizados para a estimativa do IPM são baseados na taxa de desenvolvimento dos imaturos. Sendo aferidas medidas como o comprimento ou peso da larva, para determinar a idade dos imaturos após comparação com banco de dados (Wells & La Motte 1995). Outro método bastante utilizado no campo da entomologia forense com propósito de estimar o IPM está relacionado com o calor em Graus Horas (GHA) ou graus dias (GDA) acumulado, ou seja, a quantidade total de calor requerido para que uma determinada espécie complete seu ciclo, desde a oviposição até o estágio adulto (Oliveira-Costa, 2013).

É fato que os métodos tradicionais aferidos pelo médico legista são utilizados primeiramente para se obter este intervalo de tempo de morte até o achado do corpo, como resfriamento do corpo, livores e rigidez cadavérica, mancha verde abdominal, exame de fundo de olho, entre outros. No entanto, os dados entomológicos podem ser muito úteis, sobretudo com um tempo superior a três dias (Catts & Haskell 1991).

Para estimar o IPM utilizando dados entomológicos há alguns problemas, pois é necessário primeiro a identificação do inseto. Para isto, os investigadores forenses devem coletar o espécime mais antigo presente no corpo, seja ele larvas ou pupas, no entanto, devido a falta de caracteres morfológicos (Kranz et al. 2017) e a pouquíssimas chaves de identificação de imaturos de moscas de importância forense (Stevens & Wall 2001), muitas vezes a identificação acaba tornando-se imprecisa por métodos morfológicos tradicionais (Greenberg 1991). Além disso, para que seja possível a identificação, outra alternativa é coletar e encaminhar as formas imaturas para o laboratório e acondicioná-las em câmara incubadora em uma temperatura conhecida

para completarem seu ciclo de vida. Só após emergência do adulto as espécies podem ser identificadas por meio de chaves morfológicas, quando possível (Carvalho & Mello-Patiu 2008). Porém muitas vezes as amostras estão em más condições, seja elas larvas ou pupas tornando impossível a sua identificação por métodos taxonômicos tradicionais (Wells & Sperling 2001).

Outro aspecto importante para o campo da ciências forenses é a determinação do local do crime, ou seja, onde a morte se deu. A utilização de dados entomológicos para responder esta questão vem sendo utilizada por meio de estudos sobre a ecologia e distribuição geográfica dos insetos necrófagos, as quais podem responder se as espécies encontradas sobre o cadáver são comuns naquela região (Catts & Haskell 1991, Pujol-Luz et al. 2008). Ou seja, informações coletadas baseadas na distribuição geográfica e no habitat natural das espécies coletadas na cena da morte, possibilitam identificar o local onde a morte ocorreu (Centeno et al. 2002).

Em virtude da dificuldade de identificação das espécies de interesse forense, especialistas da área sugeriram análises químicas para complementar, ou substituir exames morfológicos tradicionais (Greenberg 1991) e\ou análise de DNA (Zehner et al. 2009, Tarone & Foran 2011). As análises seriam facilmente realizadas e comuns a todos os laboratórios forenses, agilizando em tempo hábil respostas como a identificação da espécie, a idade e até mesmo onde ocorreu a morte, sendo estes dados cruciais em uma investigação criminal. Desta forma, as análises químicas vêm se destacando nos últimos anos, e a técnica que vem se mostrando mais viável e promissora é a análise de compostos químicos cuticulares, ou seja hidrocarbonetos cuticulares (HCs), extraídos da cutícula dos insetos (Greenberg 1991).

Os HCs têm como função primária impedir a dessecação (desidratação) e, ao mesmo tempo, oferecer uma barreira de proteção contra patógenos (Lockey 1988). Ao longo da evolução dos insetos, os hidrocarbonetos, também passaram a ser utilizados na comunicação química, atuando como feromônios, cairomônios e alomônios (Ebbs & Amrein 2007). Atualmente estes compostos vêm sendo explorados como ferramenta taxonômica complementar para se estabelecer diferenças intra e interespecíficas entre diferentes amostras de insetos de importância forense (Kranz et al. 2017, Paula et al. 2017). Ye et al. (2007), por exemplo, conseguiram encontrar diferenças significativas entre pupários vazios de seis espécies de moscas, demonstrando que esta ferramenta é viável para identificar espécies de importância forense.

Ainda quanto a aplicabilidade dos HCs na área forense, Zhu et al. (2006) demonstraram o potencial dos HCs para determinar a idade de larvas de uma espécie de mosca varejeira *Chrysomya rufifacie*. Já Zhu et al. (2007) estudando pupários da mosca varejeira de importância forense *C. megacephala* expostas ao intemperismo em condições de laboratório, encontraram que os perfis de HCs apresentaram mudanças significativas em relação ao tempo de exposição, podendo então ser utilizados para datação do IPM.

Recentemente Paula et al. (2017) estudando a espécie de importância forense *C. megacephala* encontraram diferenças no perfil químico entre os diferentes estágios, e entre populações, também sugerindo sua utilização para auxiliar no campo da ciência forenses.

Todos estes estudos supracitados avaliaram os compostos químicos cuticulares de amostras de interesse forense utilizando técnicas cromatográficas como: Ye et al. (2007), Zhu et al. (2007), Moore et al. (2013, 2014), Pechal et al. (2014), Xu et al. (2014), Frere et al. (2014), Braga et al. (2016), Zhu et al. (2017), Barbosa et al. (2017), Bernhardt et al., (2017), Moore et al. (2017), Paula et al. (2017). Entretanto, outra técnica; a de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS, *Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy*) também vêm sendo utilizada para avaliar diferenças entre os perfis cuticulares de insetos, e têm se mostrado bastante confiável para a detecção de compostos (Gibbs & Mousseau 1994, Gibbs & Pomonis 1995), sobretudo de amostras de himenópteros sociais (Antoniali Junior et al. 2007, 2008, Neves et al. 2012, 2013, Cunha et al. 2017).

Entre os trabalhos realizados com a técnica, o FTIR-PAS auxiliou na diferenciação entre castas e sexo na espécie de formiga *Ectatomma vizottoi* (Antoniali Junior et al. 2007), diferenciação intra e interespecífica de populações de *Ectatomma brunneum* e *E. vizottoi* (Antoniali Junior et al. 2008), mudanças dos compostos superficiais ocasionados pela idade em vespas da espécie *Mischocyttarus consimilis* (Neves et al. 2012).

Portanto, esta técnica poderia ser promissora também para avaliar composição cuticular em moscas de importância forense.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Calliphoridae

Os membros da família Calliphoridae (Insecta, Diptera, Oestroidea) são conhecidos como moscas varejeiras, com mais de 150 gêneros e 1000 espécies descritas, ocorrendo em todas as regiões biogeográficas (Pont 1980, Shewell 1987, Vargas & Wood 2010).

De acordo com McAlpine et al. (1981) a família Calliphoridae é constituída por 12 subfamílias: Auchmeromyiinae, Bengaliinae, Helicoboscinae, Melanomyiinae, Phumosiinae, Poleniinae, Rhiniinae, Luciliinae, Calliphorinae, Chrysomyinae e Toxitarisinae, sendo que as quatro últimas ocorrem na região Neotropical (James 1970).

As moscas varejeiras são espécies relativamente robustas variando de 4 a 16 mm, e geralmente apresentam coloração metálica. A maioria são ovíparas, mas há exceções, como as moscas dos gêneros *Phumosiia* (Phumosiinae) e *Hemipyrellia* (Luciliinae) (Vargas & Wood 2010).

Os calliphorídeos geralmente apresentam uma alta sinantropia, mas também ocorrem em outros ambientes, frequentemente encontradas em matéria orgânica em decomposição, alimentam-se e/ou ovipositam em matéria orgânica vegetal, animal, fezes humanas, carcaças, líquidos açucarados, e ainda podem atuar como polinizadoras (Greenberg 1971; Jirón & Hedstron 1985). Os imaturos também se alimentam de uma grande variedade de substratos, sendo desde carcaças, à tecidos necrosados ou sadios, fezes, lesmas, sangue de aves e mamíferos, e muitas vezes ainda podem viver em associação com ninhos de formigas e cupins (Pont 1980; Kutty et al., 2010; Vargas & Wood 2010). Uma espécie de Calliphoridae, *Verticia fasciventris* (Bengaliinae) foi descrita por Sze et al. (2008) como o primeiro caso de hábitos parasitoides observados em moscas desta família. Devido à necessidade de um substrato rico em proteínas animal, e esta relação, somada aos seus hábitos alimentares, lhes confere uma elevada importância médica, veterinária e forense.

Moscas desta família tem grande importância forense para a estimativa do IPM (Oliveira-Costa 2013), sobretudo, porque apresentam maior frequência nos estágios iniciais de decomposição de carcaças (Carvalho & Linhares 2001). São extremamente ágeis, e algumas espécies atingem a carcaça e depositam seus ovos poucas horas após a morte (Oliveira-Costa 2013).

Chrysomya megacephala

A introdução de algumas espécies do gênero *Chrysomya* nas últimas quatro décadas no continente americano foi intensa (Oliveira-Costa 2013). *Chrysomya megacephala* foi introduzida em torno da década de 70 no Sul do Brasil. E o período entre 1975-1976 coincidiu com o grande aumento de refugiados da Angola para o Brasil, quando alguns viajaram de seus países acompanhados de seus animais domésticos (Guimarães et al. 1978). Desde então rapidamente disseminou-se pela América do Sul (Oliveira-Costa 2013).

Os adultos desta espécie apresentam coloração azul metálica, verde-azulada ou roxa, com espiráculo protorácico escuro (Fig. 01). Antenas e genas são amareladas e os machos apresentam a parte superior dos olhos constituídas por facetas grandes. As larvas não apresentam tubérculos e com o esclerito oral parcialmente pigmentado como uma mancha escura (Oliveira-Costa 2013). O pupário é opaco e de superfície irregular, apresentando seis tubérculos pouco conspícuos (Amorim & Ribeiro 2001).

Vários autores coletaram frequentemente esta espécie associada a carcaças de porcos (Dias et al. 2006), colonizando cadáveres humanos (Salviano et al. 1996, Carvalho et al. 2000, Oliveira-Costa 2001), isca de peixe (Leandro & D’Almeida 2005; Luiz & Koller 2010) e carcaças de coelhos (Kirst et al. 2005).



Figura. 01. Mosca adulta da espécie *Chrysomya megacephala*. Foto: Erika Fernandes Neves (2015)

Hidrocarbonetos Cuticulares (HCs)

A superfície do corpo de um inseto é coberta por diferentes camadas, sendo que a mais superficial denomina-se epicutícula (Singer 1998). Essa camada é composta por hidrocarbonetos, alcoóis, ésteres alquílicos, glicerídeos, esteróis e aldeídos (Lockey 1988). Os hidrocarbonetos podem ser considerados como os principais compostos e

dividem-se nas classes de saturados: representados pelos alcanos ramificados (*n*-alcanos) e alcanos metil-ramificados; os insaturados, representados pelos alcenos e, raramente, por alcenos metil-ramificados (Howard et al. 1990; Carlson & Schlein 1991). Segundo Lockey (1965) os HCs são sintetizados por células epidérmicas denominadas enócitos. E seus precursores são acetil-CoA e malonil-CoA, iniciando um processo de descarboxilação (Blomquist & Bagnères, 2010). Porém, a maneira pela qual os HCs são transferidos até a cutícula dos insetos é ainda pouco conhecida (Blomquist & Bagnères, 2010). No entanto, Chino et al. (1981) propuseram que a lipoforina presente na hemolinfa do inseto realize o transporte dos hidrocarbonetos recém-sintetizados dos enócitos para o local onde serão depositados.

A função dos HCs pode variar, mas primeiramente atuam como barreira contra a desidratação além de proteger contra patógenos (Singer 1998). Para Ebbs & Amrein (2007) durante o processo de evolução dos insetos os HCs além de serem utilizados contra a dessecação, passaram a ser usados para a comunicação química, atuando como feromônios, cairomônios e alomônios. Para Gibbs (2002) os alcanos lineares têm uma função mais direcionada à prevenção da perda de água, devido aos seus altos pontos de fusão, enquanto os alcanos ramificados e alcenos atuam mais efetivamente na comunicação química.

Os HCs são utilizados como sinais trocados durante a comunicação química, e podem variar em termos quantitativos e qualitativos entre as espécies, classes de idade, sexo, populações e entre colônias de insetos sociais (Howard & Blomquist, 2005). Vários fatores podem modular a composição química cuticular dos insetos, sendo fatores genéticos (Howard e Blomquist 2005, Badhe et al. 2006) ambientais (Service et al. 1985; Gibbs et al. 1997; Howard e Blomquist, 2005; Roux et al. 2008), a dieta (Bernardi et al. 2014); a fisiologia (Howard e Blomquist 2005) o estágio de desenvolvimento (Paula et al. 2017), e a idade (Hadley 1977, Toolson 1982, Gebre-Michael et al. 1994, Dietemann et al. 2003, Rouault et al. 2004).

Os fatores ambientais podem alterar, de fato o perfil químico cuticular do inseto, pois sabe-se que em regiões com climas mais quentes e secos há uma maior diversidade de alcanos lineares de cadeia longa (Chapman et al. 1995, Wagner et al. 2001) Já em climas temperados, cujas estações são mais bem definidas, as condições climáticas podem também causar alterações sazonais na composição de HCs (Haverty et al. 1996).

Outro fator ambiental que influencia a composição dos HCs é a dieta. Brown et al. (1991) encontraram diferenças na composição dos hidrocarbonetos cuticulares entre

larvas e adultos de uma espécie de vespa *Vespula germanica*, e concluíram que estas diferenças são em função, sobretudo, das diferenças de dietas entre os diferentes estágios, uma vez que imaturos se alimentam de proteínas e adultos principalmente de carboidratos. Liang & Silverman. (2000) também encontraram relação entre a composição de HCs da cutícula dos insetos e o tipo de alimento que ingerem. Paula et al. (2017) investigando o perfil químico de diferentes estágios imaturos em uma espécie de mosca varejeira, encontraram diferenças quali e quantitativas dos HCs, uma vez que, moscas adultas se alimentam de carboidratos e apenas quando precisam maturar seus ovários, ingerem proteína, diferentemente dos imaturos cuja dieta se restringe a proteína. De fato, a dieta exerce um papel importante na camada cuticular do inseto (Cotoneschi et al. 2007).

Como os fatores ambientais são importantes para compor os HCs da cutícula dos insetos permite inferir que estes compostos podem ser usados para diferenciar populações de uma mesma espécie (Paula et al. 2017). Este fato também pode ter um grande impacto sobre as análises forenses, sobretudo, em casos em que o cadáver pode ter sofrido deslocamento de seus locais de morte.

Hidrocarbonetos Cuticulares na taxonomia de espécies de importância forense

A identificação precisa das espécies de importância forense é primordial, pois cada espécie apresenta um ciclo de vida diferente (Smith 1986, Jordaens et al. 2013). Para Higley & Haskell (2001) o tempo de desenvolvimento dos espécimes podem diferir até dentro do mesmo gênero. Entretanto, a identificação por métodos morfológicos por vezes é inviável, seja pela complexidade das chaves, recursos morfológicos limitados nos imaturos (Greenberg 1991), poucas chaves de imaturos que cubram todas as espécies de importância forense (Stevens & Wall 2001) e, ainda amostras em más condições (Wells & Sperling 2001). Para Szpila, (2010) muitas vezes é necessário que os imaturos sejam levados ao laboratório, para criação e, na sequência, haja a identificação do adulto. Neste sentido, técnicas alternativas podem ajudar a suprir esses entraves trazidos pelos métodos considerados mais tradicionais.

Uma técnica de análise recente para ajudar a identificar espécies de importância forense é a análise da composição de HCs (Xu et al. 2014). O primeiro estudo que avaliou HCs em amostras de insetos de interesse forense foi o de Goodrich (1970), que encontrou diferenças quali e quantitativas entre pupários e adultos da espécie *Lucilia*

cuprina. Trabalon (1992) com a mosca *Chrysomya vomitoria* e Barbosa et al. (2017) com três espécies de importância forense constaram que existem diferenças significativas entre a composição cuticular dentre os sexos. E ainda em relação a identificação de espécies, Moore et al. (2014) utilizaram os compostos químicos das larvas de primeiro instar para distinguir três espécies de moscas de importância forense (*Lucilia sericata*, *Chrysomya vicina* e *Chrysomya vomitoria*), os autores destacam que o perfil químico funciona como uma impressão digital para as espécies.

Os compostos químicos cuticulares podem ser usados como ferramenta taxonômica complementar como já avaliado por (Ye et al. 2007, Zhu et al. 2006, Moore et al. 2013, Moore et al. 2014, Paula et al. 2017). Como aplicação para as ciências forense Moore et al. (2014) utilizaram estes compostos químicos de estágio larvais para distinguir três espécies de moscas de importância forense. Pechal et al. (2014) usaram os compostos cuticulares de adultos das moscas *C. macellaria* e *C. rufifacies* para distinguir as duas espécies. Estes resultados são promissores, pois mostram que estes compostos, de fato podem agilizar a identificação das espécies e com isto melhorar a estimativa do IPM.

Zhu et al. (2006) demonstraram que é possível determinar o estágio larval de *Chrysomya rufifacies* pelos seus perfis químicos cuticulares, tendo importante implicação, portanto, na determinação do IPM. Resultados semelhantes foram conseguidos por Moore et al. (2013) avaliando os compostos cuticulares do caliphorideo, *Lucilia sericata* e Xu et al. (2014) com larvas da mosca *Aldrichina grahami*.

Todos estes resultados indicam que os perfis químicos cuticulares são promissores para o uso aplicado nas perícias forenses, sobretudo para ajudar na determinação da idade larval, fornecendo uma estimativa mais rápida, sobretudo do IPM.

Outras amostras que podem ser usadas para fornecer dados importantes para ajudar a responder perguntas em perícias criminais são as fornecidas pelos pupários vazios. De acordo com (Ye et al. 2007) pupas de moscas podem permanecer no local do crime por anos e ainda fornecer informações. As pupas muitas vezes podem ser o único vestígio em uma cena de crime (Frere et al. 2014).

Ye et al. (2007) relatam que por meio dos compostos químicos de pupários seja possível distinguir seis espécies de moscas varejeiras. Zhu et al. (2007) em laboratório e Zhu et al. 2017 com experimentação em campo, por outro lado, avaliaram se o tempo de

exposição ao ambiente pode afetar a composição química de pupários, e puderam concluir que a degradação dos HCs é regular e altamente previsível, o que pode fornecer dados sobre o tempo de ocorrência do crime, portanto, com uma importante aplicação forense. Frere et al. (2014) encontraram resultados similares usando amostras de exúvias de pupas da mosca *Hydrotaea aenescens*. E ainda de forma aplicada, amostras de pupários vazios foram utilizados para ajudar a solucionar um crime prescrito a vários anos em Minas Gerais por Braga et al. (2016). E por fim, Moore et al. (2017) conseguiu determinar a idade dos pupários das espécies em estudo durante um período de nove meses. Estes resultados são de extrema importância, visto que em casos avançados de decomposição só são encontrados exúvias de pupas ao redor do cadáver.

Outra opção para a utilização dos insetos em casos achados de corpos além das exúvias de pupas encontradas próximas ao corpo, são os adultos recém emergidos. Estudos deste tipo foram desenvolvidos por Pechal et al. (2014), os quais analisaram a idade de duas espécies de moscas recém emergidas (*C. macellaria* e *C. rufifacies*), e seus resultados mostraram diferença significativa entre o perfil químico das espécies estudadas. Estes resultados são promissores, pois podem ser utilizados para aumentar a acurácia da estimativa do IPM. E com adultos recém emergidos Bernhardt et al. (2017) avaliaram apenas um hidrocarboneto cuticular, o alcano pentacosano (C25) e sua variação quantitativa nas pernas em duas espécies de moscas desde o 1º até o 20º dia após emergência e concluíram que a variação quantitativa teve um aumento linear com o passar do tempo. Desta forma os autores colocam que o C25 pode ser uma ferramenta promissora para a estimativa da idade de moscas adultas.

Portanto, o uso dos compostos cuticulares de insetos de importância forense veem se mostrando promissor, uma vez que amostras de diferentes estágios de desenvolvimento do inseto podem ser úteis para identificação das espécies, determinação do local, tempo de exposição do cadáver, entre outras informações que possam ser cruciais para dar suporte em laudos de médicos legistas e patologistas forenses, visto que dados entomológicos são uma alternativa muito confiável, principalmente em corpos em estágio de decomposição mais tardio (Kashyap & Pillai 1989).

REFERÊNCIAS

- Amorim, J. A. and O. B. Ribeiro. 2001.** Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96(6): 781–784.
- Antonialli-Junior, W. F., S. M. Lima, L. H. C. Andrade, and Y. R. Suárez. 2007.** Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Biol.* 6(3): 492-499.
- Antonialli-Junior, W. F., Y. R. Suárez, T. Izida, L. H. C. Andrade, and S. M. Lima. 2008.** Intra-and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Biol.* 7(2): 559-566.
- Badhe, R. V., A. B. Thomas, S. L. Harer, A. D. Deshpande, N. Salvi. A. Waghmare. 2006** Intraspecific variation in protein pattern of red scorpion (*Mesobuthus Tamulus*, *Coconsis*, *Pocock*) venoms from western and southern India. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 12: 612–619.
- Barbosa, R. R., M. V. Braga, G. J. Blomquist, and M. M. D. C. Queiroz. 2017.** Cuticular hydrocarbon profiles as a chemotaxonomic tool for three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) of forensic interest. *J. Nat. Hist.* 51(25-26): 1491-1498.
- Barnes, R. D. and E. E. Rupert. 1993.** *Zoologia dos invertebrados*. 6a. ed. São Paulo: Roca. 1028.
- Benecke, M. A. 2001** Brief history of forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 120: 2–14.
- Bergeret, M. 1855.** Infanticide. Momification naturelle du cadavre. *Annales d'Hygiène Publique et de Médecine Légale* 4: 442–452.
- Bernardi, R. C., E. L. B. Firmino, M. C. Pereira, L. H. C. Andrade, C. A. L. Cardoso, Y. R. Suárez, W. F. Antonialli Jr, and S. M. Lima. 2014.** Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy as a potential tool in assessing the role of diet in cuticular chemical composition of *Ectatomma brunneum*. *Genet. Mol. Res.* 13(4): 10035-10048.
- Bernardi, R. C., E. L. B. Firmino, A. Mendonça, D. Sguarizi-Antonio, M. C. Pereira, L. H. Cunha Andrade, and S. M. Lima. 2017.** Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy. *J Photochem Photobiol B Biol.* 175: 200-206.

- Bernhardt, V., W. Pogoda, M. A. Verhoff, S. W. Toennes and J. Amendt. 2017.** Estimating the age of the adult stages of the blow flies *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) by means of the cuticular hydrocarbon n-pentacosane. *Sci. Justice*. 57(5): 361-365.
- Blomquist, G., A. G. Bagnères. 2010.** Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology. Cambridge: Cambridge University Press, New York.
- Braga, M. V., Z. T. Pinto, M. M. Carvalho Queiroz, and G. J. Blomquist. 2016.** Effect of age on cuticular hydrocarbon profiles in adult *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic sci. Int.* 259: e37-e47.
- Brown, W. V., J. P. Spradbery, and M. J. Lacey. 1991.** Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp, *Vespula germanica* (f.) (Hymenoptera: Vespidae). *Comp Biochem Physiol B.* 99(3): 553–562.
- Brusca, R. C. and G. J. Brusca. 2007.** Invertebrados. 2a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 968 p.
- Carlson, D. A., and Y. Schlein. 1991.** Unusual polymethyl alkenes in tsetse flies acting as abstinon in *Glossina moristans*. *J. Chem. Ecol.* 17: 267–284.
- Carvalho, L. M. L., P. J. Thyssen, A. X. Linhares, and F. B. Palhares. 2000.** A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(1): 135–138.
- Carvalho, L. M. L. and A. X. Linhares. 2001.** Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. *J. Forensic Sci.* 46: 604–608.
- Carvalho, C. J. B., and C. A. Mello-Patiu. 2008.** Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev. Bras. Entomol.* 3: 390–406.
- Catts, E. P., and N. H. Haskell. 1991.** Entomology and death: a procedural guide. Joyce's Print Shop, Clemson, South Carolina.
- Catts, E. P., and M. L. Goff. 1992.** Forensic entomology in criminal investigations. *Ann. Rev. Entomol.* 37(1): 253-272.
- Catts, E.P. 1992.** Problems in estimating the PMI in death investigations. *Journals of Agricultural Entomology*, 9(4): 245–255.
- Centeno, N., M. Maldonado, and A. Oliva. 2002.** Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires province (Argentina). *Forensic Sci. Int.* 126(1):63-70.

- Chapman, R. F., K. E. Espelie, and G. A. S Word. 1995.** Use of cuticular lipids in grasshopper taxonomy: a study of variation in *Schistocerca shoshone* (Thomas). *Biochem. Syst. Ecol.* 23(4): 383-398.
- Chino, H., R. G. H. Downer, G. R. Wyatt, and L. I. Gilbert. 1981.** Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect haemolymph. *Insect Biochem.* 11: 491.
- Cotoneschi, C., F. R. Dani, R. Cervo, M. F. Sledge, and S. Turillazzi. 2007.** *Polistes dominulus* (Hymenoptera: Vespidae) larvae possess their own chemical signatures. *J. Insect Physiol.* 53: 954–963.
- Cunha, D. A. S., R. S. T. Menezes, M. A. Costa, S. M. Lima, L. H. C. Andrade, and W. F. Antonialli-Jr. 2017.** Integrated Analyses of Cuticular Hydrocarbons, Chromosome and mtDNA in the Neotropical Social Wasp *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera, Vespidae). *Neotrop Entomol.* 46(6): 642-648.
- Dias, J. O., S. S. Suguituru, L. Gomes, and M. S.C. Morini. 2006.** Ocorrência de formigas (Hymenoptera: Formicidae) em carcaça animal. *Biológico* 69: 459–460.
- Dietemann, V., P. Christian, L. Jürgen, T. Virginie, H. Bert. 2003.** Cuticular hydrocarbons mediate discrimination of reproductives and nonreproductives in the ant *Myrmecia gulosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 10341–10346.
- Ebbs, M. L., & Amrein, H. 2007.** Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflug Arch Eur J Physiol.* 454(5): 735-747.
- Erzinçlioglu, Y. Z. 1983** ‘‘The application of entomology to Forensic Medicine’’. *Medicine Science and Law.* 23(1): 57–63.
- Frere, B., F. Suchaud, G. Bernier, F. Cottin, B. Vincent, L. Dourel, A. Lelong, and P. Arpino. 2014.** GC-MS analysis of cuticular lipids in recent and older scavenger insect puparia. An approach to estimate the postmortem interval. *Anal. Bioanal. Chem.* 406:1081.
- Gebre-Michael, T., R. P. Lane, A. Phillips, P. Milligan, and D. H. Molyneux. 1994.** Contrast in the cuticular hydrocarbons of sympatric *Phlebotomus* (Synphlebotomus) females (Diptera: Phlebotominae). *Bull. Entomol. Res.* 84: 225–231.
- Gibbs, A., and T. A. Mousse. 1994.** Division of Comparative Physiology and Biochemistry, Society for Integrative and Comparative Biology. *Physiol. Zool.* 67: 1523–1543.
- Gibbs, A., and J. G. Pomonis. 1995.** Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: The effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 112B(2): 243–249.

- Gibbs, A., G. 2002.** Lipid melting and cuticular permeability: News insights into an old problem. *J. Insect. Physiol.* 48: 391–400.
- Gibbs, A. G., A. K. Chippindale, and R. R. Michael. 1997.** Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 200: 1821–1832.
- Goff, M.L. and W.D. Lord. 2001.** Entomotoxicology: Insects as Toxicological Indicators and the Impact of Drugs and Toxins on Insect Development. In: *Forensic Entomology, The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, Byrd, J.H. and J.L. Castner (Eds.). New York, USA .
- Goff, M. L., and W. Lord. 1994.** Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 15(1): 51–57.
- Goodrich, B. S. 1970.** Cuticular lipids of adults and puparia of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wied.). *J. Lipid Res.* 11: 1–6.
- Greenberg, B. 1971.** Flies and disease: Ecology, Classification and Biotic Associations, vol. 1. Princeton University Press, New Jersey.
- Greenberg, B. 1991.** Flies as forensic indicators. *J Med Entomol.* 28(5): 565-577.
- Guimaraes, J.H., A.P. Prado and A.X. Linhares. 1978.** Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 22: 53–6.
- Hadley, N. F. 1977.** Epicuticular lipids of the desert tenebrionid beetle, *Eleodes armatus*: seasonal and acclimatory effects on chemical composition. *Insect Biochem.* 7: 277–283.
- Haverty, M. I., J. K. Grace, L. J. Nelson, R. T. Yamamoto. 1996.** Intercaste, intercolony, and temporal variation in cuticular hydrocarbons of *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). *J. Chem. Ecol.* 22: 1813–834.
- Hawley, E. M., and B. Budowie. 2000.** Amplified Fragment length polymorphism (Ampflps) in mosquito blood meals used to identify individual hosts and detect multiple feedings. *Proceedings 2nd International Symp. On the Forensic Aspects of DNA* (US Government Printing Office).
- Higley, L. G., and N. H. Haskell. 2001.** Insect development and forensic entomology". In Byrd J.A.; Castner J.L., editors. *Forensic Entomology: the utility of arthropods in agriculture*, Boca Ranton: CRC Press, 287-302.
- Howard, R. W., R. D. Akre, W. B. Garnett. 1990.** Chemical mimicry in an obligate predator of carpenter Ants. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83(3): 607–616.
- Howard, R. W., and G. J. Blomquist. 2005.** Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol.* 50: 371–393.

- Introna, F. J. R., C. P. Campobasso, A. DI Fazio. 1998.** “Three case studies in forensic entomology from Southern Italy”. *J. Forensic Sci.* 43(1): 210–14.
- James, M. T. 1970.** A Catalogue of the Diptera of Americas south of the United States: Family Calliphoridae. *Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo*, 102: 1–28.
- Jirón, L.F., and I. Hedström. 1985.** Pollination ecology of mango (*Mangifera indica* L.) (Anacardiaceae) in the neotropic region. *Turrialba*, 35: 269–277.
- Jordaens, K., G. Sonetrichet, R. Dupont, E. Braet, and Y. S. Desmyter. 2013.** Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene, *Int. J. Legal Med.* 127: 491–504.
- kashyap, v. k. and Pillay, V. 1989.** Vefficacy of entomological method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. *Forensic Sci. Int.* 40(3): 245–250.
- Kirst, F., R. F. Kruger, and A. B. Souza. 2005.** Período de desenvolvimento de dípteros necrófagos que se criam em carcaças de coelho (*Oryctolagus cunniculus* Linnaeus) no campus da UFPEL. XIV congresso de iniciação científica UFPEL.
- Kranz, W., C. Carroll, D. A. Dixon, J. V. Goodpaster, and C. J. Picard. 2017.** Factors Affecting Species Identifications of Blow Fly Pupae Based upon Chemical Profiles and Multivariate Statistics. *Insects*, 8(2): 43.
- Kreike, J. and S. Kamper. 1999.** Isolation and characterization of human DNA from mosquitoes (Culicidae). *Int. J. Legal Med.* 112: 380–382.
- Kruger, E. L., C. D. Pappas, and R. Howard. 1991.** Cuticular hydrocarbon geographic variation among seven North America populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 28: 859–864.
- Kutty, S. N., T. Pape, B. M. Wiegmann, R. Meier. 2010.** Molecular phylogeny of the Calypttratae (Diptera: Cyclorrhapha) with an emphasis on the superfamily Oestroidea and the position of Mystacinobiidae and McAlpine’s fly. *Syst. Entomol.* 35: 614–635.
- Leandro, M. J. F., J. M. d`Almeida. 2005.** Levantamento de Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae e Sarcophagidae em um fragmento de mata na Ilha do Governador, Rio de Janeiro, RJ. *Iheringia*, 95: 377–381.
- Leclerq, J., and F. Vaillant. 1992.** Entomologie et médecine légale: une observation inédite. *Annales de la Société Entomologique de France*, 28(1): 3-8.
- Liang, D., J. Silverman. 2000.** ‘You are what you eat’: diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften*, 87: 412–416.
- Lockey, M. 1965.** Permeability of insect cuticle to water and lipids. *Science*, 147: 295–298.

- Lockey, K. H. 1988.** Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 89: 595–645.
- Lord, W. D., and W. C. Rodriguez. 1989.** Forensic Entomology: the use of insects in the investigation of homicide and untimely death. *Prosecutor*, 22: 41–48.
- Lord, W. D., and J. R. Stevenson. 1986.** Directory of forensic entomologists, 2nd. Ed. Def.
- Luiz, H. L., and W. W. Koller. 2010.** Calliphoridae e Muscidae (Diptera) capturados com carne de peixe deteriorada, Campo Grande, MS. Brasil. Resumos do XXIII Congresso Brasileiro de Zoologia - Hangar - Centro de Convenções e Feiras da Amazônia Belém - Pará - Brasil.
- Moore, H. E., C. D. Adam, and F. P. Drijfhout. 2013.** Potential use of hydrocarbons for aging *Lucilia sericata* blowfly larvae to establish the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* 58(2): 404-412.
- Moore, H. E., A. D. Craig, B. Adam, and F. P. Drijfhout. 2014.** Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Sci. Int.* 240: 48–53.
- Moore, H. E., J. L. Pechal, M. E. Benbow, and F. P. Drijfhout. 2017.** The potential use of cuticular hydrocarbons and multivariate analysis to age empty puparial cases of *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata*. *Sci Rep* 7:1933.
- Neves, E. F., L. H. C. Andrade, Y. R. Suarez, S. M. Lima, W. F. Antonialli-Junior. 2012.** Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Rs.* 11: 1891–1898.
- Neves, E. F., T. S. Montagna, L. H. Andrade, Y. R. Suárez, S. M. Lima, and W. F. Antonialli-Jr. 2013.** Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. *J. Kans. Entomol. Soc.* 86(1): 69-77.
- Norris, K. R. 1965.** The bionomics of blowflies. *Annu. Rev. Entomol.* 10: 47–68.
- Nuerteva, P. 1977.** Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeshi, G. C., W. G. Eckert, and L. G. Tedeshi. (eds) *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards*, vol 2, Saunders, Philadelphia, 1072–1095.
- Oliveira-Costa, J. 2013a.** *Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios.* 3rd ed. Millenium, Campinas, São Paulo.
- Oliveira-Costa, J. 2013b.** “Insetos Peritos” *A entomologia forense no Brasil.* 1st ed. Millennium, Campinas, São Paulo.

- Oliveira-Costa, J., C. A. Mello-Patiu, and S. M. Lopes. 2001.** A influência de diferentes fatores na frequência de dípteros muscóides em cadáveres humanos no Rio de Janeiro. *Boletim do Museu Nacional de Zoologia*, 470: 1-10.
- Paula, M. C., W. F. Antonialli-Junior, A. Mendonça, K. B. Michelutti, A. D. Eulalio, C. A. L. Cardoso, T. Lima, and C. J. Von Zuben. 2017.** Chemotaxonomic profile and intraspecific variation in the blow fly of forensic interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 54: 14–23.
- Payne, J. A. 1965.** A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. *Ecologia*, 46: 592–602.
- Pechal, J. L., H. Moore, F. Drijfhout, and M. E. Benbow. 2014.** Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic. Sci. Int.* 245: 65–71.
- Pont, A.C. 1980.** Family Calliphoridae, p. 779–800. *In*: Crosskey, R.M. (Ed.). *Catalogue of the Diptera of the Afrotropical Region*. London, British Museum (Natural History), 1437p.
- Pujol-Luz, J. R., L. C. Arantesi, and R. Constantino. 2008.** Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908-2008). *Rev. Bras. Entomol.* 52(4): 485–492.
- Rognes, K. 1997.** The Calliphoridae (blowflies) (Diptera: Oestroidea) are not a monophyletic group. *Cladistics.* 13: 27–66.
- Rouault, J. D., C. Marican, C. Wicker-Thomas, and J. M. Jallon. 2004.** Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature; a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Genética.* 120: 195–212.
- Roux, O., C. Gers, L. Legal. 2008.** Ontogenetic study of three Calliphoridae of forensic importance through cuticular hydrocarbon analysis. *Med. Vet. Entomol.* 22: 309–317.
- Salviano, R., R. Mello, R. Santos, L. Beck, and A. Ferreira. 1996.** Calliphoridae (Diptera) associated with human corpses in Rio de Janeiro, Brazil. *Entomologia e Vetores* 34(5): 855–856.
- Service, P. M., E. W. Hutchinson, M. D. Mackinley, and M. R. Rose. 1985.** Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.* 58: 380–389.
- Sguarizi-Antonio, D., V. O. Torres, E. L. Firmino, S. M. Lima, L. H. Andrade, and W. F. Antonialli-Junior. 2017.** Observation of intra-and interspecific differences in the nest chemical profiles of social wasps (Hymenoptera: Polistinae) using infrared photoacoustic spectroscopy. *J Photochem Photobiol B Biol.* 176: 165-170.

- Shewell, G. E. 1987.** Calliphoridae, p. 1113–1145. *In*: McAlpine, J.F., B.V. Peterson, G.E. Shewell, H.J. Teskey, J.R. Vockeroth & D.M. Wood (Eds.). *Manual of Nearctic Diptera*. Vol. 2. Ottawa, Monograph/Agriculture Canada, 657p.
- Singer, T. L. 1998.** Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. *American Zoology*, 38: 394–405.
- Smith, K. G. V. 1956.** On the Diptera associated with the stinkworn (*Phallus Impudicus* Pers.) with notes on others insects and invertebrates found on this fungus. *Proc. R. Entomol. Soc. Lond. Ser. A Gen. Entomol. (A)*, 31: 49–55.
- Smith, K. G. V. A. 1986.** *A Manual of forensic entomology*. Trustees of the British Museum (Natural History), London, England.
- Stevens, J., and R. Wall. 2001.** Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci. Intl.* 120: 116–123.
- Sze, W. T., T. Pape, and D. K. O’Toole. 2008.** The first blow fly parasitoid yakes a head start in its termite host (Diptera: Calliphoridae, Bengaliinae; Isoptera: Macrotermitidae). *Syst. Biodivers.* 6: 25–30.
- Szpila, K. 2010.** Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance, pp. 43–56. *In* J. Amendt, C. P. Campobasso, M. L. Goff, and M. Grassberger, (eds.), *Current concepts in forensic entomology*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- Tarone, A.M., and D. R. Foran. 2011.** Gene expression during blow fly development: Improving the precision of age estimates in forensic entomology. *J. Forensic Sci.* 56: S112–S122.
- Toolson, E. C. 1982.** Effects of rearing temperature on cuticle permeability and epicuticular lipid composition in *Drosophila pseudoobscura*. *J. Exp. Zool.* 222: 249– 253.
- Trabalon, M., M. Campan, J. L. Clement, C. Lange, and M.T. Miquel. 1992.** Cuticular hydrocarbons of *Calliphora vomitoria* (Diptera): Relation to age and sex. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 208–216.
- Vargas, J., and D. M. Wood. 2010.** Calliphoridae, p. 1297–1304. *In*: Brown, B.V., A. Borkent, J.M. Cumming, D.M. Wood, N.E. Woodley & M.A. Zumbado (Eds.). *Manual of Central American Diptera*. Vol. 2. Canada, Ontario, NCR Research Press, 728p.
- Von Zuben, C. J. 2001.** Zoologia aplicada: recentes avanços em estudos de entomologia forense. *Entomology y Vectores*, 8(2): 173–83.
- Wagner, D., M. Tissot, and D. Gordon. 2001.** Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *J Chem Ecol.* 27: 1805–819.

- Wells, J. D., and L. R. La Motte. 1995.** Estimating maggot age from weight using inverse prediction. *J. Forensic Sci.* 40(4): 585–590.
- Wells, J. D., and F. Sperling. 2001.** DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* 120: 110–115.
- Xu, H., G. Y. Ye, Y. Xu, C. Hu, and G. H. Zhu. 2014.** Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* 242: 236–241.
- Ye, G., K. Li, J. Zhu, G. Zhu, and C. Hu. 2007.** Cuticular hydrocarbon composition in pupal exuviae for taxonomic differentiation of six necrophagous flies. *J Med. Entomol.* 44: 450–456.
- Zehner, R., J. Amendt, and P. Boehme. 2009.** Gene expression analysis as a tool for age estimation of blowfly pupae. *Forensic Sci. Int.: Genetics Supplement Series*, 2: 292–293.
- Zhu, G-H., G-Y.Ye, C. Hu, X. H. Xu, and K. Li. 2006.** Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. *Med. Vet. Entomol.* 20: 438–44.
- Zhu, G-H., X. H. Xu, X. J. Yu, Y. Zhang, and J. F.Wang. 2007.** Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. *Forensic Sci. Int.* 169: 1–5.
- Zhu, G. H., Z. J. Jia, X. J. Yu., K. S. W, L. S. Chen, J. Y. Lv, and M. E. Benbow. 2017.** Predictable weathering of puparial hydrocarbons of necrophagous flies for determining the postmortem interval: a field experiment using *Chrysomya rufifacies*. *Int. J. Legal Med.* 131: 1–10.

OBJETIVO GERAL

Embora os HCs venham sendo sistematicamente utilizados como ferramenta útil e confiável para fornecer dados para serem utilizados em perícias forenses, ainda são poucos os estudos desenvolvidos com amostras de espécies de nosso país. Assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar como os compostos cuticulares de diferentes amostras de *Chrysomya megacephala* podem ser usados de forma aplicada para fornecer informações úteis e ágeis para as perícias forenses.

HIPÓTESES

- ✓ Será possível determinar o perfil quiotaxônomico e a variação intraespecífica da mosca varejeira de importância forense *C. megacephala*?

- ✓ Será possível distinguir pupários proveniente de diferentes ciclos de oviposição da mosca varejeira *C. megacephala* por meio de seus compostos químicos cuticulares?

- ✓ Será que a técnica de FTIR-PAS será útil para averiguar diferenças do perfil cuticular dos diferentes estágios de desenvolvimento da mosca *Chrysomya megacephala* de duas populações distintas?

Capítulo I

Perfil quimiotaxonômico e variação intraespecífica na mosca varejeira de interesse forense *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)

Michele C. Paula^{1,2}, Angélica Mendonça^{1,2}, Kamylla B. Michelutti^{2,3}, Aylson D. M. Eulalio⁵, Claudia A. L. Cardoso³, Cláudio J. Von Zuben⁶, Thiago de Lima⁶, William F. Antonialli-Junior^{1,2,3}

¹Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil, ²Laboratório de Ecologia Comportamental, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brasil, ³Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, Brasil, ⁵Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil, ⁶Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro-SP, Brasil.

Autor Correspondente: M. C. Paula

Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, km 12- Cidade Universitária, C.P. 533, CEP 79804-970, Dourados, MS-Brazil. Phone: +55(67)3410-2198.

Recebido em 21 de Maio de 2016; Aceito em 7 de Agosto de 2016

Journal of Medical Entomology

RESUMO

Insetos necrófagos como moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae) são considerados cruciais em entomologia forense. A identificação a nível de espécie e determinação do estágio larval são a base para a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM). Evidências de insetos também podem ser usadas na determinação de cenas de crime já que o deslocamento do corpo é comum. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil quimiotaxonômico e variabilidade intraespecífica da mosca varejeira de importância forense *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794). Os adultos foram coletados nos municípios de Dourados-MS (Brasil) e Rio Claro-SP (Brasil) e em seguida, transferidos para laboratório para oviposição e desenvolvimento dos estágios imaturos. A análise

química dos compostos cuticulares foi realizada por cromatografia gasosa. Os perfis químicos cuticulares variaram significativamente entre as duas populações, bem como entre os estágios de desenvolvimento, suportando o uso destes compostos como uma ferramenta complementar para ajudar a identificar a espécie e seus estágios, juntamente com a variabilidade geográfica. Isto poderia acelerar investigações forenses, eliminando a necessidade de permitir que as larvas de mosca se desenvolvam até a fase adulta, a fim de confirmar a identidade da espécie e origem das amostras.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos cuticulares, intervalo pós-morte, estágios de desenvolvimento.

INTRODUÇÃO

Insetos necrófagos são considerados cruciais em entomologia forense, pois eles são os principais participantes no processo de decomposição de cadáveres (Smith 1986). Eles são valiosos indicadores forenses e evidências entomológicas coletadas na cena do crime podem ser usadas para ajudar em casos legais (Oliveira-Costa 2011). Estes insetos incluem as moscas varejeiras (Diptera: Calliphoridae), que são tipicamente encontradas em todos os tipos de carcaças, inclusive humanas (Nuorteva 1977) e são frequentemente os primeiros insetos a localizar o recurso e colocar ovos (Smith 1986, Amendt et al. 2004). Portanto, embora as condições ambientais possam influenciar o tempo de colonização por estas moscas varejeiras nas carcaças (Oliveira-Costa 2013) elas são consideradas os indicadores mais precisos do Intervalo Pós-Morte (IPM) (Benecke 1998, Huntington et al. 2007, Zhu et al. 2007, Xu et al. 2014).

Insetos necrófagos são valiosos indicadores forenses para estimativa do tempo decorrido entre a colonização e a decomposição total, permitindo o uso de evidências entomológicas coletadas em cenas de crime (Jordaens et al. 2013). Entretanto, sua utilidade para estimar o IPM se dá com a identificação precisa a nível de espécie, pois a duração do ciclo de vida varia de acordo com a espécie (Smith 1986, Oliveira-Costa 2011, Jordaens et al. 2013).

Na maioria dos casos, insetos que podem fornecer pistas sobre um crime ainda estão no estágio imaturo, tornando a identificação por métodos morfológicos tradicionais difícil e imprecisa (Greenberg 1991). Por exemplo, indivíduos no estágio de terceiro instar larval após alimentação, tem uso limitado para determinação do IPM porque o comprimento do corpo diminui com o desenvolvimento, como no caso da mosca *Chrysomya rufifacies* (Macquart 1843) (Zhu et al. 2006).

Além disso, não existem chaves de identificação disponíveis que abranjam todos os estágios larvais de Diptera com importância forense (Stevens e Wall 2001), e as chaves existentes são muito específicas de determinadas regiões (Erzinçlioğlu 1985, Wells et al. 1999, Holloway 1991, Szpila 2010, Velásquez et al. 2010). A identificação incorreta destes insetos pode causar estimativas de IPM imprecisas devido a variabilidade em taxas de crescimento espécie-específicas (Moore et al. 2014). Em muitos casos é necessário permitir que as formas imaturas se desenvolvam até o estágio adulto e então identificar ou confirmar a espécie (Szpila 2010).

Outro fator diz respeito a condição ruim de muitas amostras que muitas vezes têm partes anatômicas faltando ou deformadas tornando quase impossível identificar a espécie pelos métodos taxonômicos tradicionais baseados unicamente em características específicas de cada espécie (Wells e Sperling 2001).

A identificação a nível de espécie e determinação do estágio larval são a base para estimativa do IPM. Medidas corporais e análise das fendas espiraculares são usadas para identificar os instares larvais, embora essas análises sejam viáveis apenas para alguns grupos; em outros grupos, a determinação dos instares é feita medindo-se o comprimento total ou o comprimento da cápsula cefálica (Oliveira-Costa 2013).

Outro aspecto importante da análise forense é a determinação do local onde o crime ocorreu. Informações sobre o movimento de corpos da cena do crime podem ser obtidas quando as espécies encontradas no cadáver não são comuns na área onde o corpo foi encontrado e isto requer o conhecimento da distribuição geográfica e ecologia de insetos necrófagos (Catts e Haskell 1991, Pujol-Luz et al. 2008). De acordo com Centeno et al. (2002) informações baseadas na distribuição geográfica e habitat natural das espécies coletadas na cena da morte tornam possível identificar o local onde o crime ocorreu. A variação geográfica determina a ocorrência de uma espécie, devido a sua adaptação a um determinado ambiente (Ridley 2006).

Considerando todos estes fatores, um método capaz de fornecer uma identificação rápida e precisa de espécies, mesmo em estágios larvais, seria vantajoso para estimativa do IPM e do local onde ocorreu a morte em investigações criminais (Roux et al. 2006). A identificação de marcadores bioquímicos representa uma nova ferramenta que poderia auxiliar na identificação de espécies (Xu et al. 2014). Compostos químicos presentes na cutícula rica em hidrocarbonetos de insetos tem sido usados para identificação ou confirmação de espécies (Roux et al. 2006, Ye et al. 2007, Guillem et al. 2012). Hidrocarbonetos cuticulares (HCs) cobrem a epicutícula dos insetos, juntamente com outros compostos incluindo ésteres, álcoois, ácidos graxos, parafinas, acilglicerídeos, fosfolipídeos e glicolipídeos (Lockey 1988). A função primária de tais compostos é impedir a desidratação (Lockey 1988) mas eles também são usados pelos insetos para sinalização em interações interespecíficas e intraespecíficas (Ebbs e Amrein 2007).

Sabe-se que estes compostos podem variar qualitativamente e quantitativamente na cutícula dos insetos por influência tanto de fatores genéticos (Howard e Blomquist 2005, Badhe et al. 2006) quanto ambientais (Toolson e Kuper-Simbron 1989, Gibbs et

al. 1997, Roux et al. 2008). Consequentemente, variações destes compostos na cutícula dos insetos podem ser usadas para propósitos taxonômicos (Roux et al. 2006) e mapeamento biogeográfico. Diferenças significativas entre compostos presentes na cutícula foram relatadas por Pechal et al. (2014) estudando a composição química cuticular das moscas *Cochliomyia macellaria* e *C. rufifacies* e por Roux et al. (2006) em investigações com *Calliphora vomitoria*, *Calliphora vicina* e *Protophormia terraenovae*. Jallon e David (1987) avaliaram oito espécies do subgrupo *Drosophila melanogaster* e identificaram variações geográficas importantes nos hidrocarbonetos em populações de *D. melanogaster* e *Drosophila simulans*. Em estudos utilizando espécimes de *Chrysomya bezziana* (Villeneuve 1914) (Brown et al. 1998) e *Phlebotomus ariasi* (Tonnoir 1921) (Kamhawi et al. 1987) foi observado que estes insetos poderiam ser agrupados de acordo com suas localizações geográficas com base em diferenças na composição cuticular.

Também sabe-se que a composição cuticular de um inseto pode mudar quantitativamente e qualitativamente de acordo com a idade e/ou estágio de desenvolvimento (Zhu et al. 2006, 2007). Isto ocorre pois o ambiente externo pode mudar dramaticamente para um inseto durante o curso de seu ciclo de vida, e seu estado bioquímico e fisiológico pode variar de forma semelhante. Consequentemente, estes fatores podem influenciar as quantidades e números de compostos cuticulares (Arnold e Regnier 1975). Por exemplo, Goodrich (1970) examinou os compostos cuticulares de pupas e adultos da mosca varejeira *Lucilia cuprina* (Weidemann 1830) e encontrou diferenças qualitativas e quantitativas entre esses estágios. Entretanto, tem existido relativamente poucas investigações sobre a taxonomia química de insetos com importância forense. Estudos que podem ser destacados a respeito da variação na composição de HCs de imaturos de moscas necrófagas incluem os de Ye et al. (2007), Zhu et al. (2007), Roux et al. (2008), Moore et al. (2013, 2014) e Xu et al. (2014).

Uma vez que os HCs podem ser usados como ferramentas valiosas para ajudar a otimizar os procedimentos forenses, o objetivo deste estudo foi determinar o perfil quimiotaxonômico e a variação intraespecífica destes compostos na mosca varejeira de interesse forense *Chrysomya megacephala* (Fabricius 1794).

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das Amostras

Moscas varejeiras adultas foram coletadas de duas populações distintas: uma no município de Rio Claro (São Paulo - Brasil), no campus da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” (22° 22’ S, 47° 32’ O), e outra no município de Dourados (Mato Grosso do Sul - Brasil), no campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (22° 11’ S, 54° 55’ O). A distância entre as populações é de 914 km.

As armadilhas usadas foram feitas com garrafas PET de 2 litros, nas quais foram colocadas iscas atrativas que consistiam de bife e vísceras de porco em estágio avançado de decomposição (Moretti et al. 2008). As armadilhas eram suspensas em galhos de árvores, 1,5 m acima do solo, com exposição prolongada a luz solar.

Indivíduos adultos foram transferidos para o Laboratório de Ecologia Comportamental (LABECO) na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, após seleção e identificação, de acordo com Carvalho e Mello-Patiu (2008). As moscas foram então colocadas em gaiolas de criação de 40 cm² e mantidas em incubadora sob condições controladas de temperatura de 27 ± 1 °C, com fotoperíodo de 12:12 (C:E) h. Vinte espécimes de cada população nessa condição foram separados e alimentados com açúcar e água *ad libitum*. Carne moída crua foi usada como substrato para oviposição.

Após a oviposição, foi utilizado um pincel fino para separar os ovos em lotes colocados em recipientes de vidro de 300 ml cobertos com organza. A proporção usada foi ~0,05 g de ovos para 200 g de carne moída. Após as larvas atingirem a fase de pós-alimentação, elas foram transferidas para outro recipiente de vidro com 500 ml de capacidade, ao qual foi adicionado 250 ml de serragem seca como substrato para pupação.

Análise das amostras por Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massas (CG-EM)

Todas as amostras utilizadas para a análise eram da geração F1. Cada estágio de desenvolvimento foi separado para análise, utilizando um número suficiente de amostras para 10 repetições ($n = 10$). Para cada repetição foi utilizado um número amostral equivalente a massa corporal de um adulto ($0,054 \pm 0,008$ g).

Os ovos amostrados foram coletados ~8 h após oviposição. As larvas de primeiro instar foram coletadas no primeiro dia após eclosão, quando havia apenas uma única fenda espiracular; as de segundo instar no segundo dia, quando haviam duas fendas espiraculares; as de terceiro instar no terceiro dia, quando haviam três fendas

espiraculares (Oliveira-Costa 2011); as pupas no sétimo dia e os adultos no décimo terceiro dia.

Para a análise de compostos cuticulares de todos os estágios de desenvolvimento, as extrações foram feitas dos indivíduos inteiros, sem qualquer fixador. Cada amostra foi imersa por 2 min em um recipiente de vidro com 2 ml de hexano. Após a remoção do solvente as amostras foram secas em capela de exaustão e mantidas em congelador por até 30 dias. Para a análise cromatográfica cada extrato foi solubilizado em 200 µl de hexano (Tedia, grau HPLC).

As amostras foram analisadas usando cromatógrafo gasoso (GC-2010 Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão), com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura, 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano; J&W, Folsom, CA). As condições de análise foram: volume de injeção de 1 µl; modo *splitless*; temperatura do forno começando em 150 °C, alcançando 300 °C a uma taxa de 3 °C min⁻¹ e permanecendo na temperatura final por 10 min. A temperatura do injetor foi de 220 °C, e as temperaturas do detector e linha de transferência foram 250 e 200 °C, respectivamente. O espectrômetro de massas foi operado usando voltagem de ionização por impacto de elétrons de 70 eV, m/z 45-600, e 0,3 s de intervalo de varredura.

Os compostos foram identificados a partir dos índices de retenção (Van den Dool e Kratz 1963), usando uma mistura de alcanos lineares (C₁₄-C₃₆, Sigma-Aldrich, pureza ≥ 90%) como referência externa, considerando os tempos de retenção relatados na literatura (Brown et al. 1991, Zhu et al. 2006, Moore et al. 2014, Weiss et al. 2014, Bonelli et al. 2015). Os espectros de massa obtidos para as amostras foram comparados com as bases de dados NIST 21 e Wiley 229.

Análise Estatística

Foi utilizada a análise de função discriminante para avaliar a variabilidade dos compostos cuticulares nas duas populações e diferentes estágios de desenvolvimento. Foram utilizadas as áreas relativas obtidas para os compostos a partir das análises cromatográficas. A estatística Wilks' lambda foi usada como medida de diferença entre os grupos, com valores próximos de 0 indicando que não há sobreposição dos grupos, enquanto valores próximos de 1 indicam sobreposição considerável entre os grupos e conseqüentemente falta de diferenças significativas entre eles (Manly 2008). Estes procedimentos foram realizados usando os pacotes Statistica 7 e Systat 11.

Para avaliar a relação entre o perfil químico das amostras das duas populações, um método de agrupamento foi aplicado utilizando a distância euclideana e o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages) para realizar um dendrograma de dissimilaridade usando o software estatístico R. O coeficiente de correlação cofenética foi usado para avaliar se o dendrograma refletiu a matriz de similaridade, com 0,75 adotado como valor mínimo de qualidade do dendrograma (MacGarigal et al. 2000).

RESULTADOS

As amostras da população de Dourados apresentaram 113 picos cromatográficos, com picos identificados correspondendo a 73,05% da área total. Amostras da população de Rio Claro apresentaram 125 picos, com picos identificados correspondendo a 64,23% da área total.

Foi possível identificar 98 compostos nas amostras, com 76 presentes na população de Dourados e 74 na população de Rio Claro. Os comprimentos de cadeia dos hidrocarbonetos foram de C₁₇ a C₃₃ (Dourados), e de C₁₇ a C₃₅ (Rio Claro). 52 compostos foram compartilhados pelas duas populações, 24 foram exclusivos da população de Dourados, e 22 foram exclusivos da população de Rio Claro. Os compostos nas amostras incluíram alcanos ramificados, alcanos lineares, e alcenos (nesta ordem de importância, considerando os números de compostos e suas concentrações relativas). O estágio de pupa da população de Dourados foi uma exceção, com os alcenos sendo mais importantes do que os alcanos ramificados (Tabelas 1 e 2; Figs. 1 e 2).

No geral, 89 compostos estavam presentes no estágio de ovo, 90 no primeiro instar, 89 no segundo instar, 93 no terceiro instar, 83 em pupas, e 90 em adultos (Tabelas 1 e 2).

Destes compostos, 28 estavam presentes em todos os estágios de desenvolvimento na população de Dourados e 48 em todos os estágios de desenvolvimento na população de Rio Claro. Os compostos variaram de acordo com o estágio de crescimento e população, e alguns compostos ocorreram exclusivamente nos estágios de ovos e adultos (Tabela 1 e 2). A aplicação da análise discriminante revelou

diferenças significativas entre amostras de Dourados (Wilks' lambda = 0,000; $F = 17,11$; $P < 0,001$) e Rio Claro (Wilks' lambda = 0,000; $F = 5,31$; $P < 0,001$).

Os compostos 5-MeC₁₇, C₁₉, e C₂₁ (Tabela 1 e Fig. 3) foram os mais significativos para a separação dos grupos nas amostras de Dourados, enquanto 5-MeC₁₇, 9-MeC₂₁, e C_{21:2} (Tabela 2 e Fig. 3) foram os mais significativos no caso das amostras de Rio Claro. A análise de agrupamento (coeficiente de correlação cofenética de 0,95) mostrou a relação entre as amostras de cada estágio e entre as duas populações (Fig. 3).

DISCUSSÃO

Os HCs identificados nas amostras de Dourados e Rio Claro variaram de C₁₇ a C₃₅ e de C₁₇ a C₃₇, respectivamente (Tabelas 1 e 2). A ordem de importância (em termos quantitativos) foi alcanos ramificados > alcanos lineares > alcenos. A mesma ordem de importância foi encontrada por Brown et al. (1998) para compostos cuticulares em populações de *C. bezziana*; por Xu et al. (2014) em estágios larvais de *Aldrichina grahami* (Aldrich 1930); e por Moore et al. (2014) em três espécies de moscas varejeiras. Zhu et al. (2006) identificaram HCs com comprimentos de cadeia C₂₁-C₃₁, bem como alcenos na mosca varejeira *C. rufifacies*. Xu et al. (2014) encontraram HCs com comprimentos de cadeia C₂₁-C₃₁ em instares larvais da mosca *A. grahami*. Golebiowski et al. (2012) identificaram alcanos lineares C₂₁-C₃₁ em diferentes estágios de *Lucilia sericata* (Meigen 1826).

Os resultados revelaram diferenças qualitativas e quantitativas entre amostras das duas populações (Tabelas 1 e 2). A análise de agrupamento demonstrou a separação das amostras dessas duas populações (Fig. 3). Sabe-se que diferenças entre populações dependem das distâncias geográficas envolvidas, as quais influenciam o grau de isolamento e em alguns casos impedem o fluxo gênico entre populações (Jallon e David 1987).

Diferenças também podem ocorrer devido as diferentes pressões ambientais às quais as populações são expostas (Service et al. 1985). Howard e Blomquist (2005) relataram que embora exista uma tendência para HCs serem específicos, populações que são geograficamente separadas podem apresentar diferenças qualitativas e/ou quantitativas em suas composições cuticulares, dependendo de fatores genéticos bem

como condições ambientais. Diferenças quantitativas foram identificadas na composição cuticular de adultos de diferentes populações de *Schistocerca shoshone* (Thomas 1873) (Chapman et al. 1995), *C. bezziana*, e *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann 1830) (Carlson et al. 2001). Em estudos com populações de *Coptotermes formosanus* (Shiraki 1909) (Haverty et al. 1990) e *Gryllotalpa gryllotalpa* (L. 1758) (Broza et al. 1998), concluiu-se que diferenças na composição de HCs entre populações não eram indicativas da existência de duas espécies, mas refletiam a variabilidade geográfica influenciada por fatores ambientais.

Os resultados mostraram maior percentual de compostos mais leves na população de Rio Claro (Tabela 1), comparado com as amostras de Dourados (Tabela 2), o que poderia ser explicado pelas diferentes condições ambientais. A temperatura média e umidade relativa às quais uma população de moscas está exposta podem ser decisivas, pois condições quentes e secas levam a uma perda de compostos mais leves que são facilmente volatilizáveis. Wagner et al. (2001) encontraram que fatores ambientais afetaram a composição de HCs com maiores níveis de alcanos em climas mais quentes, comparado com climas mais úmidos. A temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes que afetam populações de moscas. Temperaturas mais altas causaram desenvolvimento mais rápido em larvas de *A. grahami* bem como alterações no perfil de HCs (Xu et al. 2014).

No caso da espécie investigada neste estudo, houve diferenças qualitativas e quantitativas nos compostos encontrados nos estágios imaturos e adultos (Tabelas 1 e 2). As diferenças poderiam ser consideradas marcadores dos estágios de desenvolvimento e provavelmente deram-se devido a diferenças na dieta já que adultos se alimentaram essencialmente de carboidratos, enquanto estágios imaturos alimentaram-se exclusivamente de proteínas provenientes de carcaças em decomposição (Kamal 1958, Putman 1977, Zucoloto 1987). Pode-se observar nas Figs. 1 e 2 que tanto a porcentagem quanto o número de compostos variaram entre os diferentes estágios de desenvolvimento das amostras das duas populações, como relatado anteriormente por Arnold e Regnier (1975) para HCs de populações de *Sarcophaga bullata* (Parker 1916).

As concentrações e números de alcanos ramificados foram em geral mais altos em adultos comparado com os estágios imaturos e pupas. Além disso, houve maior número de HCs de cadeia longa em adultos comparado com estágios imaturos, especialmente na população de Dourados. Zhu et al. (2006) encontraram que os níveis

de hidrocarbonetos de cadeia longa aumentaram com a progressão dos estágios de desenvolvimento da mosca varejeira *C. rufifacies*. Mudanças na quantidade de compostos cuticulares durante a progressão dos diferentes estágios de desenvolvimento poderiam ser atribuídas a diferenças no comportamento de alimentação e pós-alimentação, já que pupas e adultos habitam ambientes mais secos e, portanto, requerem maior impermeabilização da cutícula (Arnold e Regnier 1975, Zhu et al. 2006). No presente caso, o composto C_{27} ocorreu em maiores níveis em adultos, enquanto o C_{29} estava presente em maior concentração em ovos, larvas (primeiro e terceiro instares) e pupas, o que poderia refletir as diferenças destacadas acima. No entanto, Zhu et al. (2006) encontraram que a concentração de hidrocarbonetos de cadeia mais curta foi maior em larvas de *C. rufifacies* mais jovens do que três dias de idade. No estudo pioneiro sobre a composição cuticular de moscas Goodrich (1970) relatou maiores níveis dos alcanos lineares C_{27} e C_{29} em adultos e pupas de *L. cuprina*.

A presença de alcanos lineares reflete a construção de barreiras para impedir a perda de água (Arnold e Regnier 1975). As cutículas de larvas são menos esclerotizadas (Chapman 1992), por isso esses estágios são mais suscetíveis a desidratação, comparado com pupas e adultos. Entretanto, larvas se alimentam de substratos relativamente úmidos o que fornece proteção. Por outro lado, a pupa é um estágio sésil; assim a proteção contra desidratação é essencial já que a pupa não pode se mover para evitar exposição a ameaças, tais como luz solar ou baixa umidade relativa (Arnold e Regnier 1975). No caso específico de carcaças que fornecem às larvas um ambiente satisfatório em termos de umidade relativa uma cutícula com números e níveis de compostos que conferem impermeabilidade pode não ser necessária (Arnold e Regnier 1975). Diferentes micro habitats estão presentes durante o curso dos estágios de desenvolvimento (carcaças para as larvas e ambiente do entorno para o estágio seguinte), o que poderia explicar as diferentes composições cuticulares dos diferentes estágios (Xu et al. 2014).

A classe de compostos dos alcanos ramificados mostrou maiores números e porcentagens em todos os estágios. Dani et al. (2001) e Lorenzi et al. (2011) destacaram a função de comunicação destes compostos. Esta classe de compostos inclui moléculas complexas com maior potencial de codificar informações (LeConte e Hefetz 2008, Blomquist e Bagnères 2010). Além de fornecer uma barreira física, a conformação tridimensional desses compostos parece ser importante na sinalização durante interações interespecíficas (Lommelen et al. 2006).

Os alcenos geralmente apresentaram os menores números e porcentagens mais baixas (Figs. 1 e 2). Brown et al. (1998) identificaram menor concentração de alcenos na composição cuticular da mosca varejeira *C. bezziana* e resultados semelhantes foram relatados por Ferveur e Jallon (1996) para *D. melanogaster* e por Rouault et al. (2004) para *D. simulans*. Apesar de ocorrerem em níveis mais baixos do que outros compostos, alcenos também parecem ser importantes para a troca de sinais durante a comunicação química (Gibbs 2002). De acordo com Tralalon et al. (1992), alcenos podem sinalizar o sexo do indivíduo e só ocorrem em fêmeas de *C. vomitoria*. Carlson et al. (2001) analisaram perfis de machos e fêmeas de *H. aenescens* e concluíram que o dimorfismo se torna mais evidente com a idade, com maior porcentagem de quatro alcenos em machos com idade entre 4 e 8 dias.

O fato de alguns compostos estarem presentes apenas nos estágios de ovo e adulto (Tabelas 1 e 2) deve-se provavelmente a transferência de compostos do adulto para o ovo no momento da oviposição, explicando a maior similaridade química entre estes estágios (Fig. 3). Isso pode estar relacionado a observação de que ovos de moscas são geralmente agrupados de acordo com o comportamento mediado por feromônios, por meio dos quais as fêmeas são encorajadas a depositar ovos em locais próximos a ovos de outras fêmeas da mesma espécie, formando massas de ovos (Norris 1965, Hanski 1987). Além disso, Esser (1990) e Yang e Shiao (2012) encontraram que a oviposição de *C. megacephala* foi estimulada pela presença de compostos químicos liberados durante esse processo, associado às massas de ovos recém depositados.

O fato de que os perfis químicos diferiram significativamente entre as duas populações consideradas no presente estudo, bem como entre os estágios de desenvolvimento, suporta a possibilidade de uso destes compostos como uma ferramenta para auxiliar na identificação de seus estágios, juntamente com diferenças geográficas. Portanto, o uso destes compostos poderia acelerar substancialmente as investigações forenses (Brown et al. 1992, 1998, Zhu et al. 2006, Pechal et al. 2014).

Agradecimentos

Nós agradecemos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, e Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect). Os autores agradecem FUNDECT/CAPES, chamada nº 44/2014-PAPOS-MS/Manoel Araécio Uchoa Fernandes.

REFERÊNCIAS

- Amendt, J., R. Krettek, and R. Zehner. 2004.** Forensic entomology. *Naturwissenschaften*. 91: 51–65.
- Arnold, M. T., and F. E. Regnier. 1975.** A developmental study of the cuticular hydrocarbons of *Sarcophaga bullata*. *J Insect Physiol*. 21: 1827–1833. Pergamon Press. Printed in Great Britain.
- Badhe, R. V., A. B. Thomas, S. L. Harer, A. D. Deshpande, N. Salvi, and A. Waghmare. 2006.** Intraspecific variation in protein of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, Coconsis, Pocock) venoms from Western and Southern India. *J. Venom Anim. Toxins*. 12(4): 612–619.
- Benecke, M. 1998.** Six Forensic Entomology cases: description and commentary. *J. Forensic Sci*. 43(4): 797–805.
- Blomquist, G., A. G. Bagnères. 2010.** Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology. Cambridge: Cambridge University Press, New York.
- Bonelli, M., M. C. Lorenzi, J. P. Christidès, S. Dupont, and A. G. Bagnères. 2015.** Population diversity in cuticular hydrocarbons and mtDNA in a mountain social wasp. *J. Chem. Ecol*. 41: 22–31.
- Brown, W. V., J. P. Spradbery, and M. J. Lacey. 1991.** Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp, *vespula germanica* (f.) (Hymenoptera: Vespidae). *Comp. Biochem Physiol B*. 99(3): 553–562.
- Brown, W. V., R. Morton, and J. P. Spradbery. 1992.** Cuticular hydrocarbons of the Old World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae). Chemical characterization and quantification by age and sex. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 101: 665–671.
- Brown, W. V., R. Morton, M. J. Lacey, J. P. Spradbery, and R. J. Mahon. 1998.** Identification of the geographical source of adults of the old world screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae), by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 119(2): 391–399.
- Broza, M., S. Blondheim, and E. Nevo. 1998.** New species of mole crickets of the *Gryllotalpa gryllotalpa* group (Orthoptera: Gryllotalpidae) from Israel, based on morphology, song recordings, chromosomes and cuticular hydrocarbons, with

comments on the distribution of the group in Europe and the Mediterranean region. *Sys Entomol.* 23: 125–135.

- Carlson, D. A., U. R. Bernier, J. A. Hogsette, and B. D. Sutton. 2001.** Distinctive hydrocarbons of the black dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Diptera: Muscidae). *Arch Insect Biochem Physiol.* 48: 167–178.
- Carvalho, C. J. B., and C. A. Mello-Patiu. 2008.** Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev. Bras. Entomol.* 3: 390–406.
- Catts, E. P., and N. H. Haskell. 1991.** *Entomology and death: a procedural guide.* Joyce's Print Shop, Clemson, South Carolina.
- Centeno N., M. Maldonado, and A. Oliva. 2002.** Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). *Forensic Sci Int.* 126: 63–70.
- Chapman, T. 1992.** A cost of mating with males that do not transfer sperm in female *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol.* 38: 223–227.
- Chapman, R. F., K. E. Espelie, and G. A. Swords. 1995.** Use of cuticular lipids in grasshopper taxonomy: A study of variation in *Schistocerca gregaria* (Thomas). *Biochem Sys Ecol.* 23: 383–398.
- Dani, F. R., G. R. Jones, S. Destri, S. H. Spencer, and S. Turillazzi. 2001.** Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Anim Behav.* 62: 165–171.
- Ebbs, M. L., and H. Amrein. 2007.** Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.* 454: 735–747.
- Erzinçlioğlu, Y. Z. 1985.** Immature stages of British Calliphora and Cynomya, with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). *Journal of Natural History,* 19:1, 69-96.
- Esser, J. R. 1990.** Factors influencing oviposition, larval growth and mortality in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), a pest of salted dried fish in south-east Asia. *Bull Entomol Res.* 80: 369–376.
- Ferveur, J. F., and J. M. Jallon. 1996.** Genetic control of male cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res.* 67: 211–218.

- Gibbs, A. G., A. K. Chippindale, and R. R. Michael. 1997.** Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol.* 200: 1821–1832.
- Gibbs, A. G. 2002.** Lipid melting and cuticular permeability: new insights into an old problem. *J Insect Physiol.* 48: 391–400.
- Golebiowski, M. G., M. Paszkiewicz, A. Grubba, D. Gasiewska, M. I. Bogus, E. Włóka, W. Wieloch, and P. Stepnowski. 2012.** Cuticular and internal n-alkane composition of *Lucilia sericata* larvae, pupae, male and female imagines: application of HPLC-LLSD and GC/MS-SIM. *Bull Entomol Res.* 102: 453–460.
- Goodrich, B. S. 1970.** Cuticular lipids of adults and puparia of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wied.). *J Lipid Res.* 11: 1–6.
- Greenberg, B. 1991.** Flies as forensic indicators. *J Med Entomol.* 28: 565–577.
- Guillem, R. M., F. P. Drijfhout, and S.J. Martin. 2012.** Using chemo-taxonomy of host ants to help conserve the large blue butterfly. *Biol Conserv.* 148: 39–43.
- Hanski, I. 1987.** Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol Entomol.* 12: 257–266.
- Haverty, M. I., L. J. Nelson, and M. Page. 1990.** Cuticular hydrocarbons of four populations of *Coptotermes formosanus* Shiraki in the United States. Similarities and Origins of Introductions. *J Chem Ecol.* 16: 1635–1647.
- Holloway, B. A. 1991.** Identification of third instar larvae of flystrike and carrion-associated blowflies in New Zealand (Diptera: Calliphoridae). *New Zealand Entomologist*, 14(1): 24–28.
- Howard, R. W., and G. J. Blomquist. 2005.** Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Annu Rev Entomol.* 50: 371–393.
- Huntington, T. E., L. G. Higley, and F. P. Baxendale. 2007.** Maggot development during morgue storage and its effect on estimating the post-mortem interval, *J Forensic Sci.* 52: 453–458.
- Jallon, J. M., and J. R. David. 1987.** Variations in cuticular hydrocarbons among the 8 species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Evolution.* 41: 294–302.
- Jordaens, K., G. Sonetrichet, R. Dupont, E. Braet, and Y. S. Desmyter. 2013.** Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene, *Int J Legal Med.* 127: 491–504.

- Kamal, A. S. 1958.** Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) I. Bionomics. *Ann Entomol Soc Am.* 51: 261–271.
- Kamhawi, S., D. H. Molyneux, R. Killick-Kindrick, P. J. M. Milligan, A. Phillips, T. J. Wilkes, and M. Killick-Kindrick. 1987.** Two populations of *Phlebotomus ariasi* in the cévenes focus of leishmaniasis in the south of France revealed by analysis of cuticular hydrocarbons. *Med Vet Entomol.* 1: 97–102.
- LeConte, Y., and A. Hefetz. 2008.** Primer pheromones in social Hymenoptera. *Annu Rev Entomol.* 53: 523–542.
- Lockey, K. H. 1988.** Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp Biochem Physiol B.* 89: 595–645.
- Lommelen, E., C. A. Johnson, F. P. Drijfhout, J. Billen, T. Wenseleers, and B. Gobin. 2006.** Cuticular hydrocarbons provide reliable cues of fertility in the ant *Gnamptogenys striatula*. *J Chem Ecol.* 32: 2023–2034.
- Lorenzi, M. C., R. Cervo, and A. G. Bagnères. 2011.** Facultative social parasites mark host nests with branched hydrocarbons. *Anim Behav.* 82: 1149–1157.
- Manly, B. J. F. 2008.** Métodos estatísticos multivariados: uma introdução, 3ª ed. Bookman, Porto Alegre, RS.
- MacGarigal, K., S. A. Cushman, and S. G. Stafford. 2000.** Multivariate statistics for Wildlife and Ecology Research. Springer-Verlag, Nova York.
- Moore, H. E., C. D. Adam, and F. P. Drijfhout. 2013.** Potential use of hydrocarbons for aging *Lucilia sericata* blowfly larvae to establish the postmortem interval. *J Forensic Sci.* 58: 404–412.
- Moore, H. E. A., D. Craig, B. Adam, and F. P. Drijfhout. 2014.** Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Sci Int.* 240: 48–53.
- Norris, K. R. 1965.** The bionomics of blowflies. *Annu. Rev. Entomol.* 10: 47–68.
- Nuorteva, P. 1977.** Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeshi, G. C., W. G. Eckert, and L. G. Tedeshi. (eds) *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards*, vol 2, Saunders, Philadelphia, 1072–1095.
- Oliveira-Costa, J. 2011.** *Entomologia forense: Quando os insetos são vestígios.* 3rd ed. Ed. Millenium, Campinas, São Paulo.
- Oliveira-Costa, J. 2013.** *Insetos “peritos”: entomologia forense no Brasil.* 1st ed. Ed. Millenium, Campinas, São Paulo.

- Pechal, J. L., H. Moore, F. Drijfhout, and M. E. Benbow. 2014.** Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic Sci Int.* 245: 65–71.
- Pujol-Luz, J. R., L. C. Arantesi, and R. Constantino. 2008.** Cem anos da entomologia forense no Brasil (1908-2008). *Rev. Bras. Entomol.* 52(4): 485–492.
- Putman, R. J. 1977.** Dynamics of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, within carrion. *J Anim Ecol.* 46: 853–866.
- Ridley, M. 2006.** Evolução. 3rd ed. Ed. Artmed, Porto Alegre, RS.
- Rouault, J. D., C. Marican, C. Wicker-Thomas, and J. M. Jallon. 2004.** Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature; a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Genetica.* 120: 195–212.
- Roux, O., C. Gers, and L. Legal. 2006.** When, during ontogeny, waxes in the blowfly (Calliphoridae) cuticle can act as phylogenetic markers. *Biochem Sys Ecol.* 34: 406–416.
- Roux, O., C. Gers, and L. Legal. 2008.** Ontogenetic study of three Calliphoridae of forensic importance through cuticular hydrocarbon analysis. *Med Vet Entomol.* 22: 309–317.
- Service, P. M., E. W. Hutchinson, M. D. Mackinley, and M. R. Rose. 1985.** Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.* 58: 380–389.
- Smith, K. G. V. A. 1986.** A Manual of forensic entomology. Trustees of the British Museum (Natural History), London, England.
- Stevens, J., and R. Wall. 2001.** Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci Int.* 120: 116–123.
- Szpila, K. 2010.** Key for the identification of third instars of European blowflies (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance, pp. 43–56. In: J. Amendt, C. P. Campobasso, M. L. Goff, and M. Grassberger, (eds.), *Current Concepts in Forensic Entomology*. Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York.
- Toolson, R., and E. C. Kuper-Simbron. 1989.** Laboratory evolution of epicuticular hydrocarbon composition and cuticular permeability in *Drosophila pseudoobscura*: effects on sexual dimorphism and thermal-acclimation ability. *Evolution.* 43: 468–473.

- Trabalon, M., M. Campan, J. L. Clement, C. Lange, and M.T. Miquel. 1992.** Cuticular hydrocarbons of *Calliphora vomitoria* (Diptera): Relation to age and sex. *Gen Comp Endocrinol.* 85: 208–216.
- Van den Dool, H., and Kratz, P. D. 1963.** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatogr.* 11: 463–471.
- Velásquez, Y., C. Magaña, A. Martínez-Sánchez, and S. Rojo. 2010.** Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Medical and Veterinary Entomology.* 24: 293–308.
- Wagner, D., M. Tissot, and D. Gordon. 2001.** Task-related environment alters the cuticular hydrocarbon composition of harvester ants. *J Chem Ecol.* 27: 1805–819.
- Wells, J. D., J. H. Byrd, and T. I. Tantawi. 1999.** Key to Third-Instar *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae) from Carrion in the Continental United States. *J. Med. Entomol.* 36(5): 638–641.
- Weiss, K., C. Parzefall, and G. Herzner. 2014.** Multifaceted Defense against Antagonistic Microbes in Developing Offspring of the Parasitoid Wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). *Plos one.* 9(6): 1–14.
- Wells, J. D., and F. Sperling. 2001.** DNA-based identification of forensically important *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* 120: 110–115.
- Xu, H., G-Y. Ye, Y. Xu, C. Hu, and G-H. Zhu. 2014.** Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int.* 242: 236–241.
- Yang, S. T., and S. F. Shiao. 2012.** Oviposition preferences of two forensically important blow fly species, *Chrysomya megacephala* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae), and implications for postmortem interval estimation. *J Med Entomol.* 49(2): 424-435.
- Ye, G., K. Li, J. Zhu, G. Zhu, and C. Hu. 2007.** Cuticular hydrocarbon composition in pupal exuviae for taxonomic differentiation of six necrophagous flies. *J Med Entomol.* 44: 450–456.
- Zhu, G-H., G-Y.Ye, C. Hu, X. H. Xu, and K. Li. 2006.** Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. *Med Vet Entomol.* 20: 438–44.

- Zhu, G-H., X. H. Xu, X. J. Yu, Y. Zhang, and J. F.Wang. 2007.** Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. *Forensic Sci Int.* 169: 1–5.
- Zucoloto, F. S. 1987.** Feeding habits of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): can larvae recognize a nutritionally effective diet? *J Insect Physiol.* 33: 349–353.

TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de hidrocarbonetos cuticulares em diferentes estágios de desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* na população de Dourados-MS.

Compostos	CLE	Ovo	1° Instar	2° Instar	3° Instar	Pupa	Adulto
5-MeC17‡	1756	0.23±0.41	0.53±0.26	0.32±0.27	0.57±0.54	0.25±0.14	ND
n-C18*†	1800	0.07±0.10	0.14±0.05	0.06±0.04	0.09±0.14	0.17±0.05	TR
3- MeC18*	1875	4.57±4.57•	2.50±2.60	9.66±11.44•	2.64±3.30	8.59±6.92•	0.10±0.04
C19:1*	1893	0.46±0.27	0.43±0.37	0.14±0.08	0.46±0.36	3.97±1.26•	0.06±0.13
C19‡	1900	0.19±0.13	0.18±0.08	0.16±0.10	0.15±0.15	0.31±0.13	ND
2-MeC19*	1960	3.79±7.40•	17.60±4.35•	10.32±6.63•	12.01±7.95•	0.52±0.29	TR
C20:1*†	1983	0.57±0.81	0.99±1.26	1.37±2.61	1.28±2.62	2.38±2.97	TR
n-C20‡	2000	0.53±0.18	0.60±0.50	1.10±0.51	0.83±0.54	0.50±0.38	ND
5- MeC20*†	2050	0.69±0.36	0.78±0.65	0.23±0.13	0.85±0.65	5.21±1.68•	0.12±0.22
Heneicosadiene†#	2067	ND	0.32±0.26	ND	ND	ND	ND
3-MeC20†	2075	0.27±0.26	ND	0.23±0.32	0.15±0.41	0.59±0.42	ND
C21:1*	2098	1.28±0.58	1.94±1.30	1.36±0.84	1.18±1.27	5.47±2.72•	TR
C21*	2100	2.25±1.00	4.14±2.54•	5.27±4.40•	2.88±2.49	9.76±3.20•	TR
9- MeC21†‡	2139	2.25±4.82	25.12±7.83•	18.03±13.19•	27.01±17.82•	0.13±0.11	ND
Tricosadiene†	2163	TR	1.05±0.53	0.95±0.57	1.34±0.85	ND	ND
2- MeC21‡	2170	0.69±0.32	7.04±9.65•	3.92±3.11•	5.47±3.12•	0.20±0.10	ND
n-C22‡	2200	0.35±0.22	0.10±0.13	0.31±0.37	0.46±0.67	0.48±0.24	ND
3,7-;3,9-DiMeC21*†	2205	0.85±0.47	0.97±0.84	0.38±0.22	1.10±0.88	6.34±2.05•	0.15±0.27
Heptadecan-4-olide†	2212	ND	0.10±0.19	ND	ND	TR	ND
C23:1*	2278	1.29±1.39	2.08±1.90	1.83±3.01	1.98±2.93	2.85±2.97	TR
n-C23*	2300	0.31±0.18	1.10±0.30	1.20±0.61	1.11±0.81	0.34±0.14	TR
7-;9-;11- MeC23	2339	ND	0.50±0.31	0.46±0.31	0.53±0.45	ND	ND
5- MeC23†	2349	ND	TR	TR	ND	TR	ND
3- MeC23	2367	ND	0.24±0.06	0.11±0.08	0.14±0.14	ND	ND
C24:1†	2389	ND	TR	0.12±0.10	0.15±0.06	TR	ND
n-C24*	2400	0.94±0.62	0.68±0.33	1.36±0.91	1.01±0.97	0.83±0.33	TR
x-MeC24*†	2422	1.14±1.35	1.23±1.47	1.84±3.02	2.26±3.51	3.09±3.15•	TR
11-;10-;9-MeC24†	2434	ND	0.19±0.09	0.21±0.12	0.05±0.05	0.32±0.13	TR
9-C25:1†#	2473	ND	0.23±0.07	ND	ND	ND	ND
7- C25:1†	2480	ND	1.47±0.68	1.90±0.84	0.75±0.55	ND	ND
n-C25*	2500	0.20±0.11	1.64±0.49	2.31±0.70	1.61±1.12	0.15±0.07	0.21±0.10
13-;11-;9-MeC25	2535	0.28±0.16	0.27±0.09	0.20±0.14	TR	ND	0.49±0.20
7- MeC25	2542	ND	TR	0.12±0.10	0.07±0.07	ND	TR
5- MeC25*	2552	0.82±0.74	0.61±0.18	0.90±0.57	0.58±0.46	0.73±0.36	TR
11,15-DiMeC25*†	2565	1.23±1.46	1.15±1.36	1.90±2.68	2.67±4.21	2.97±2.99	0.05±0.06
n-C26*	2600	0.19±0.13	0.13±0.05	0.26±0.28	0.29±0.38	0.14±0.06	0.25±0.12
12-;13-;14- MeC26◊	2632	0.57±0.24	ND	ND	ND	ND	1.43±0.25
5MeC26*†	2648	0.40±0.23	0.46±0.40	0.16±0.10	0.54±0.44	3.65±1.20•	0.07±0.13
2- MeC26	2657	ND	1.05±0.58	1.46±0.65	0.37±0.22	ND	7.37±2.30•
C27:1	2672	4.59±1.97•	0.92±0.34	0.89±0.35	0.34±0.20	ND	0.06±0.06
n-C27*	2700	3.10±0.96•	0.81±0.38	1.26±0.65	0.73±0.57	0.46±0.50	10.18±2.79•
x, y-DiMeC27*	2705	1.14±1.47	0.89±1.00	1.31±2.10	2.50±4.53	2.39±2.44	0.05±0.06
11;13-MeC27*	2732	9.02±3.57•	0.33±0.05	0.27±0.17	TR	ND	26.54±4.40•

7-MeC27#	2742	ND	ND	ND	ND	ND	0.12±0.03
5-MeC27*	2756	TR	ND	0.05±0.07	0.09±0.09	TR	0.14±0.05
11,15-DiMeC27†◇	2758	1.00±0.47	ND	ND	ND	ND	2.70±1.04
11,17-;9,17-DiMeC27*†	2771	0.22±0.10	0.07±0.06	0.15±0.10	TR	0.06±0.12	1.04±0.48
x,y-DiMeC27	2780	0.04±0.07	0.12±0.09	0.56±0.56	0.21±0.17	ND	ND
C28:1*†	2790	0.22±0.10	0.27±0.25	0.05±0.06	0.25±0.27	2.07±0.70	0.09±0.13
n-C28*	2800	0.47±0.15	TR	0.35±0.63	0.18±0.26	0.12±0.06	1.18±0.35
14-MeC28*	2831	3.31±1.91•	2.47±0.92	5.34±2.36•	3.47±3.17•	3.54±2.84•	2.09±0.32
6-MeC28‡	2844	0.79±1.15	0.48±0.62	0.75±1.28	1.93±4.11	1.50±1.74	ND
2-MeC28	2861	17.89±5.92•	TR	ND	ND	ND	16.51±7.47•
3-MeC28◇	2875	TR	ND	ND	ND	ND	0.20±0.14
C29:1◇	2890	0.91±0.35	ND	ND	ND	ND	1.20±0.49
n-C29*	2900	4.75±1.66•	0.20±0.08	0.66±0.53	0.30±0.26	0.29±0.28	4.28±0.78•
11;13-MeC29*	2929	3.08±0.98•	0.14±0.10	0.13±0.11	0.12±0.14	0.96±0.34	7.98±1.32•
9-MeC29◇	2939	0.10±0.10	ND	ND	ND	ND	0.21±0.11
7-MeC29†#	2948	ND	ND	ND	ND	ND	0.17±0.08
5-MeC29◇	2955	0.34±0.16	ND	ND	ND	ND	1.11±0.25
9,15-DiMeC29#	2961	ND	ND	ND	ND	ND	0.11±0.06
3-MeC29†	2971	0.11±0.10	ND	0.06±0.09	ND	ND	0.22±0.17
5,13-DiMeC29‡	2979	0.54±0.70	0.26±0.34	0.32±0.64	1.28±3.03	0.75±0.98	ND
n-C30	2997	0.22±0.08	ND	0.24±0.45	TR	ND	0.12±0.05
14-MeC30◇	3027	0.14±0.11	ND	ND	ND	ND	0.52±0.18
8,14-DiMeC30#	3053	ND	ND	ND	ND	ND	0.07±0.05
2-MeC30◇	3060	0.39±0.15	ND	ND	ND	ND	2.18±0.65
C31:1◇	3083	0.25±0.33	ND	ND	ND	ND	0.05±0.08
n-C31	3097	0.92±0.50	ND	0.34±0.40	0.30±0.35	ND	0.31±0.19
17-;15-;13-MeC31†	3123	3.28±1.96•	2.17±0.58	2.63±1.18	1.94±1.50	ND	ND
17-;15-;13-MeC31◇	3130	1.12±1.19	ND	ND	ND	ND	2.67±0.86
9-;11-;13-;15-MeC31#	3137	ND	ND	ND	ND	ND	0.06±0.06
8,14-DiMeC31†◇	3152	0.43±0.19	ND	ND	ND	ND	1.23±0.48
16-;14-MeC32#	3231	ND	ND	ND	ND	ND	0.08±0.06
15-;13-;11-MeC33◇	3327	0.69±0.28	ND	ND	ND	ND	0.20±0.19
15-;13-;11-MeC33†#	3350	ND	ND	ND	ND	ND	0.12±0.09

*= Compostos exclusivos dos estágios imaturos;

†= Compostos exclusivos;

#= Compostos presentes em todos os estágios de desenvolvimento;

◇= Compostos exclusivos de ovos e adultos;

‡= Compostos exclusivos de um único estágio;

•= Compostos com concentrações maiores do que 3% para os diferentes estágios;

CLE=Comprimento de Cadeia Equivalente;

ND=Não detectado.

TR=Traço (<0.005%)

Tabela 2. Porcentagem de hidrocarbonetos cuticulares em diferentes estágios de desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* na população de Rio Claro-SP.

Compostos	CLE	Ovo	Proporção (% ± Desvio Padrão)					Adulto
			1º Instar	2º Instar	3º Instar	Pupa		
5-MeC17	1756	ND	0.40±0.29	0.24±0.18	0.26±0.31	0.32±0.28	TR	
3- MeC18*	1875	1.10±1.11	8.77±6.44•	1.04±0.79	1.35±2.07	12.29±8.69•	0.31±0.13	
C19:1‡	1893	0.18±0.21	1.44±1.21	0.26±0.29	0.12±0.16	1.00±0.77	ND	
n-C19*	1900	TR	0.23±0.18	0.06±0.05	0.05±0.08	0.12±0.11	TR	
2-MeC19*	1960	0.27±0.58	0.39±0.29	11.64±8.20•	2.52±2.96	0.31±0.29	TR	
n-C20	2000	ND	0.18±0.33	TR	TR	0.08±0.08	ND	
C21:1*	2085	0.39±0.25	2.04±2.05	0.41±0.38	0.22±0.32	0.85±0.89	TR	
n-C21*	2100	0.12±0.11	0.46±0.37	0.14±0.21	0.06±0.09	0.18±0.13	TR	
9- MeC21	2139	ND	0.19±0.22	3.87±11.60•	1.06±3.35	0.08±0.10	TR	
2- MeC21*	2170	0.33±0.43	1.90±1.57	4.41±2.45•	7.31±8.80•	1.42±2.02	0.24±0.73	
C22:1†	2199	ND	0.12±0.16	0.20±0.26	0.16±0.19	0.10±0.12	ND	
n-C22*	2200	0.10±0.06	0.31±0.19	0.10±0.10	0.09±0.10	0.24±0.16	TR	
2-MeC22*†	2273	0.05±0.08	0.35±0.27	TR	0.06±0.16	0.16±0.43	TR	
C23:1*	2279	0.20±0.43	0.56±0.39	0.88±1.78	0.21±0.32	0.14±0.15	0.13±0.35	
n-C23*	2300	0.31±0.33	0.87±0.42	0.63±0.49	0.78±0.90	0.78±0.60	0.05±0.03	
7-;9-;11- MeC23	2339	ND	ND	0.11±0.26	0.06±0.03	ND	ND	
3- MeC23‡	2367	TR	0.56±1.41	0.43±0.27	0.51±0.55	0.08±0.11	ND	
n-C24*	2400	0.19±0.14	0.76±0.56	0.43±0.46	0.21±0.24	0.56±0.37	0.05±0.05	
n-C25*	2500	0.38±0.26	1.30±0.94	1.71±0.91	2.14±1.84	1.47±1.97	0.50±0.20	
13-;11-;9-MeC25*	2535	0.26±0.11	0.34±0.30	0.09±0.11	TR	TR	0.26±0.09	
7- MeC25	2542	ND	ND	TR	0.09±0.09	ND	TR	
5- MeC25*	2554	1.01±0.83	4.33±3.03•	1.93±3.14	0.69±0.85	4.63±4.24•	0.10±0.03	
3- MeC25*†	2568	0.50±1.08	0.64±0.78	1.49±2.70	0.32±0.22	0.30±0.32	0.35±0.60	
n-C26*	2600	0.30±0.12	0.85±0.51	0.31±0.24	0.30±0.25	0.56±0.33	0.18±0.07	
12-;13-;14- MeC26*	2637	0.60±0.24	0.09±0.11	TR	TR	TR	0.49±0.18	
2- MeC26	2657	ND	0.19±0.36	1.17±0.65	1.29±1.29	TR	ND	
C27:1	2672	4.06±1.67•	0.28±0.42	0.08±0.26	ND	ND	3.60±1.74•	
n-C27*	2698	1.15±0.41	0.37±0.24	1.09±0.49	1.25±0.92	0.07±0.10	0.15±0.08	
x, y-DiMeC27	2705	0.55±0.25	0.05±0.10	1.18±2.03	0.75±1.13	ND	0.53±0.27	
x, y-DiMeC27*†	2713	5.42±5.96•	8.92±15.73•	3.00±1.81	5.52±6.25•	5.10±4.00•	4.95±1.35•	
11;13-MeC27	2735	ND	ND	0.38±0.79	0.37±0.57	ND	TR	
x-MeC27†#	2737	ND	ND	ND	ND	ND	TR	
7-MeC27*	2742	6.81±2.57•	0.76±0.56	TR	0.13±0.25	0.18±0.47	8.96±2.56•	
5-MeC27*	2756	0.12±0.03	0.07±0.11	0.09±0.15	TR	0.22±0.14	0.18±0.05	
3-MeC27*†	2765	1.30±0.50	0.07±0.13	0.06±0.12	TR	0.09±0.08	2.17±0.69	
x,y-DiMeC27*	2780	0.13±0.14	1.26±1.82	0.24±0.33	0.19±0.45	0.49±0.65	0.13±0.05	
n-C28*	2800	0.86±0.30	1.16±1.08	0.39±0.37	0.44±0.51	0.92±0.28	0.76±0.13	
14-MeC28*	2832	5.46±6.42•	15.46±15.99•	5.93±3.35•	3.24±3.60•	10.71±10.86•	2.03±0.40	
6-MeC28*	2845	0.58±1.18	0.70±0.94	1.39±2.92	0.15±0.17	1.010±1.21	0.31±0.68	
2-MeC28*	2864	21.24±8.50•	0.23±0.24	0.11±0.26	TR	0.24±0.15	19.83±4.96•	
3-MeC28*	2877	0.83±1.50	0.11±0.21	1.18±3.59	0.93±2.39	0.42±1.27	0.45±1.03	
C29:1◊	2890	1.45±0.67	ND	ND	ND	ND	1.65±0.69	
n-C29*	2900	8.46±3.24•	7.32±6.49•	2.80±3.04	4.57±5.09•	18.47±10.67•	5.07±1.15•	
11,13-MeC29*	2931	4.93±1.67•	1.40±3.43	0.39±0.68	1.12±2.13	0.94±2.31	9.20±1.01•	
9-MeC29*	2941	0.37±0.22	0.05±0.09	0.11±0.15	0.09±0.10	TR	0.45±0.24	

5-MeC29*	2952	0.15±0.10	0.12±0.14	TR	0.07±0.12	0.10±0.14	0.58±0.22
9,15-DiMeC29◇	2958	0.78±0.36	ND	ND	ND	ND	1.03±0.57
13,17-DiMeC29*†	2973	2.53±3.63	6.32±7.87•	1.88±2.66	4.30±7.21•	1.94±3.13	1.64±1.85
5,13-DiMeC29*	2980	0.35±0.79	0.51±0.92	0.41±0.84	0.13±0.10	0.22±0.45	0.29±0.37
n-C30*	3000	0.51±0.20	0.99±1.27	0.43±0.47	0.32±0.45	0.87±0.68	0.33±0.19
14-MeC30*	3030	0.46±0.30	0.27±0.57	0.09±0.23	0.12±0.26	0.14±0.32	1.90±0.47
8,14-DiMeC30	3051	0.11±0.22	ND	ND	TR	TR	ND
2-MeC30◇	3060	0.50±0.29	ND	ND	ND	ND	4.21±1.47•
C31:1*	3082	0.31±0.82	TR	0.10±0.22	0.27±0.60	0.10±0.20	TR
2,10-DiMeC31†◇	3094	0.49±1.25	ND	ND	ND	ND	0.74±0.33
n-C31*	3100	3.16±1.71•	2.08±2.92	1.01±1.40	2.19±2.90	9.62±7.87•	1.32±1.35
0013-MeC31:1†	3119	ND	ND	0.48±1.48	TR	0.12±0.35	0.12±0.08
17-;15-;13-MeC31*	3130	5.39±5.54•	7.29±7.56•	6.45±3.37•	6.69±5.37•	2.94±2.31	5.51±4.14•
9-;11-;15-MeC31	3136	2.84±2.91	ND	TR	2.00±6.16	1.47±4.41	3.96±6.65
7-MeC31*†	3143	0.30±0.35	0.07±0.17	0.11±0.14	TR	0.05±0.12	0.40±0.27
5-MeC31†‡	3149	0.21±0.63	1.07±2.42	0.07±0.22	0.11±0.19	0.09±0.26	ND
13,17-DiMeC31*†	3157	1.17±0.56	0.18±0.42	1.05±2.06	0.14±0.40	0.19±0.46	4.21±1.04•
9,17-;9,19-;9,21- DiMeC31†	3166	0.45±0.39	0.08±0.24	ND	TR	ND	0.07±0.12
5,13-DiMeC31*†	3170	0.12±0.13	0.04±0.11	0.12±0.22	TR	0.06±0.11	0.15±0.11
C32:1*†	3173	0.32±0.48	0.97±1.35	0.27±0.34	1.50±2.56	0.89±2.42	0.42±1.20
n-C32*†	3200	0.05±0.06	0.64±1.03	0.25±0.41	0.08±0.17	0.22±0.35	0.07±0.22
16-;14-MeC32*	3231	0.42±0.51	0.32±0.80	0.20±0.42	0.11±0.25	0.07±0.15	0.81±0.30
2-MeC32†	3264	ND	0.06±0.18	ND	TR	ND	0.21±0.15
n-C33*†	3300	0.06±0.10	0.09±0.15	0.12±0.24	0.26±0.25	1.33±1.36	0.05±0.16
15-;13-;11- MeC33*	3327	1.70±1.46	1.39±2.06	0.65±1.11	1.51±3.15	3.58±8.69•	2.030±1.75
13,17-DiMeC33*†	3354	0.23±0.28	0.42±0.34	0.15±0.17	0.07±0.17	0.27±0.38	0.95±0.52
9,19-; 9,21-; 9,23- DiMeC33†‡	3370	0.13±0.18	0.23±0.28	0.16±0.24	TR	0.56±0.63	ND
n-C34†‡	3400	0.23±0.45	0.21±0.39	TR	TR	0.24±0.35	ND
17-;13-MeC35†	3526	ND	0.05±0.12	TR	0.09±0.20	0.16±0.38	0.06±0.11

*= Compostos exclusivos dos estágios imaturos;

†= Compostos exclusivos;

#= Compostos presentes em todos os estágios de desenvolvimento;

◇= Compostos exclusivos de ovos e adultos;

‡= Compostos exclusivos de um único estágio;

•= Compostos com concentrações maiores do que 3% para os diferentes estágios;

CLE=Comprimento de Cadeia Equivalente;

ND=Não detectado.

TR=Traço (<0.005%)

FIGURAS

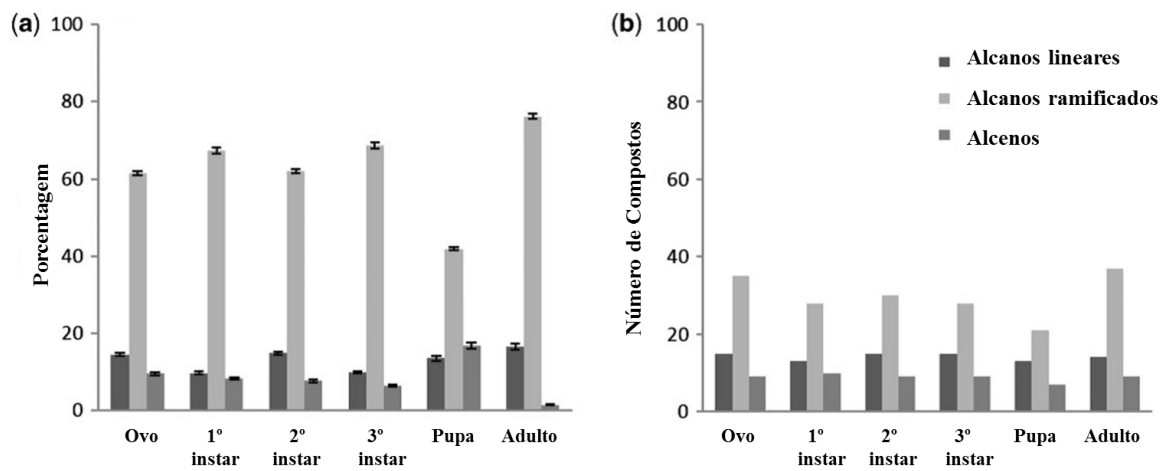


Fig. 1. (a) Porcentagens médias, com respectivos erros padrões e (b) número de compostos, para diferentes classes de compostos cuticulares durante os estágios de desenvolvimento de *C. megacephala*, população de Dourados-MS.

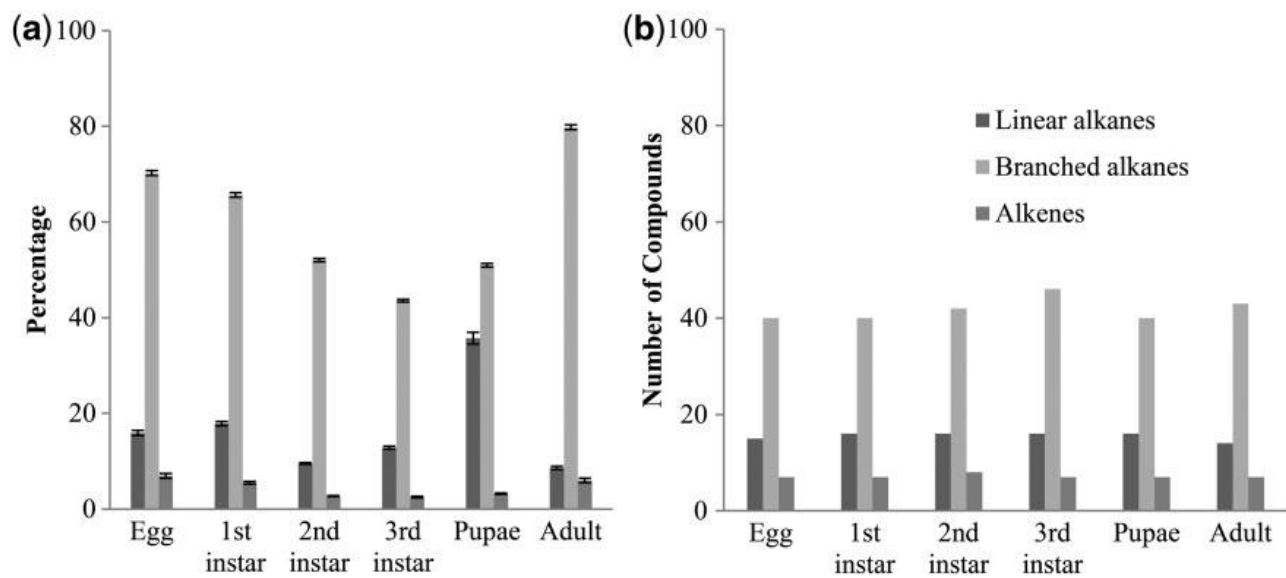
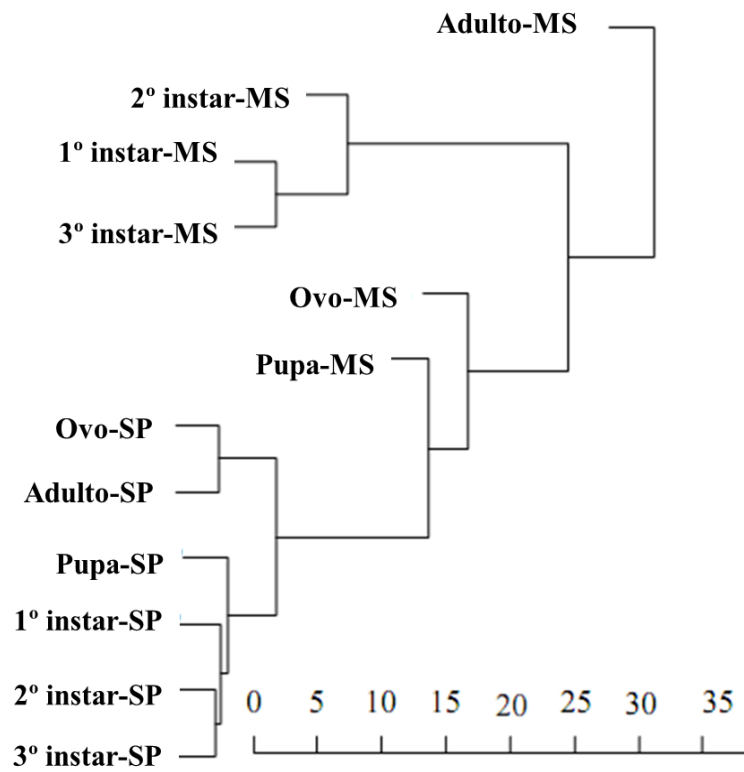


Fig. 2. (a) Porcentagens médias, com respectivos erros padrões e (b) número de compostos, para diferentes classes de compostos cuticulares durante os estágios de desenvolvimento de *C. megacephala*, população de Rio Claro-SP.



Coeficiente de correlação cofenética: 0.955

Fig. 3. Análise de agrupamento com base na distância euclidiana, mostrando as relações entre os perfis de hidrocarbonetos de *Chrysomya megacephala* das populações de Dourados-MS e Rio Claro-SP.

Capítulo II

Novo método para estimar o intervalo post-mortem utilizando a composição química de diferentes gerações de pupários vazios: casos ambientes fechados

Michele C. Paula^{1,2}, Kamylla B. Michelutti², Aylson D. M. M. Eulalio^{1,2}, Raul C. Piva³, Claudia A. L. Cardoso³, William F. Antonialli-Junior^{1,2,3}

¹Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil; ²Laboratório de Ecologia Comportamental (LABECO), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Dourados/Itahum, km 12, Caixa Postal 351, 79804-970, Dourados, MS, Brasil;³Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio)

Enviado em 13 de novembro de 2017 ao Journal of Medical Entomology.

RESUMO

Pupários de moscas estão presentes em cadáveres nos estágios mais avançados da decomposição e ainda podem ser encontrados no local da morte após muitos anos. Utilizando os compostos químicos destes pupários é possível identificar uma espécie, além do tempo em que ela foi exposta ao ambiente e por isto, estes parâmetros podem auxiliar peritos na determinação do IPM tardio. Por outro lado, em cadáveres que levam um tempo relativamente maior para se decompor por motivos diversos, os insetos que ali emergem podem utilizar o mesmo cadáver em vários ciclos de oviposições. Portanto o objetivo deste estudo foi testar a hipótese de que é possível distinguir pupários proveniente de diferentes ciclos de oviposição da mosca varejeira *Chrysomya megacephala* por meio de seus compostos químicos cuticulares. A composição química de 50 pupários de diferentes ciclos de oviposição foi avaliada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Foram detectados 72 compostos que variaram de 16 a 35 átomos de carbono, sendo 26 destes compartilhados por todas as gerações e havendo ainda alguns exclusivos. Nossos resultados demonstram que é possível distinguir pupários de diferentes gerações de moscas varejeiras pelo seu perfil químico. Assim, a análise de pupários por meio de seus compostos químicos mostram

ser mais uma ferramenta útil para um dos aspectos mais importantes das perícias forenses, a determinação do IPM.

Palavras-Chave: Entomologia forense; mosca; pupário; insetos necrófagos.

INTRODUÇÃO

As moscas varejeiras (Diptera-Calliphoridae) apresentam hábitos necrófagos e utilizam recursos proteicos para a maturação de seus ovários, oviposição e desenvolvimento completo dos imaturos (Stevens 2003), sendo atraídas principalmente pelo odor liberado nos estágios iniciais da decomposição (Smith 1986, Wall & Warnes 1994). Desta forma, geralmente representam a primeira onda na sucessão faunística, ocorrendo em todos os tipos de carcaças (Anderson 2001, Fisher et al. 1998, Wall & Warnes 1994, Nuorteva 1977, Smith 1986). Sendo então considerados o grupo de insetos mais importante para a entomologia forense (Amendt et al. 2004, Smith 1986, Zumpt 1965).

Em muitos casos quando um corpo é encontrado em elevado estágio de decomposição os métodos tanatológicos se tornam menos precisos (Catts & Haskell 1991, Amendt et al. 2004). É nestes casos a estimativa do Intervalo Pós-Morte Mínimo (IPMmin) será mais segura utilizando-se de dados entomológicos (Kashyap & Pillai 1989).

Em casos de morte sem testemunhas, é extremamente necessário estimar o intervalo pós-morte para resolver o caso. Nesta situação, para realizarem a estimativa, entomologistas forenses baseiam-se em dados fornecidos pelo inseto mais velho, pois este foi o primeiro a ovipor no corpo (Oliveira-Costa 2013a). Por outro lado, muitas vezes quando o corpo está em decomposição avançada é necessário procurar pupários, sobretudo, de dípteros nas imediações do corpo (Ye et al. 2007, Frere et al. 2014, Oliveira-Costa 2013b). Ye et al. (2007), afirmam que pupários podem ser encontradas e permanecem nas proximidades de restos humanos mesmo depois de muitos anos. Contudo, a identificação morfológica de pupários é relativamente difícil, devido a falta de características importantes para a taxonomia tradicional e aos danos presentes nas pupários causados pela emergência dos adultos (Oliveira-Costa 2013b, Ye et al. 2007). Esta informação é essencial, uma vez que a identificação da espécie é fundamental para

uma estimativa correta de (IPM), Pois cada espécie apresenta um estágio de desenvolvimento diferente (Amendt et al. 2004).

A identificação das espécies é realizada por meio da transferência destes imaturos para criação em laboratório, onde aguardam a emergência do adulto, tornando possível sua identificação (Oliveira-Costa 2013a, Oliveira-Costa 2013b). No entanto, a identificação por meio de pupários torna-se quase que inviável, uma vez que os adultos já emergiram, por outro lado, podem ser os únicos vestígios dos insetos ainda associados com o cadáver (Sukontason et al. 2007, Ye et al. 2007). E uma ferramenta complementar que vem sendo utilizada para agilizar a identificação de espécies é por meio dos Hidrocarbonetos cuticulares (HCs). Estes compostos são parte constituintes da camada lipídica dos insetos, utilizados primariamente para evitar a dessecação (Lockey 1988), mas também para a comunicação química (Ebbs & Amrein 2007). Estes compostos são uma mistura de alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos (Blomquist & Bagnères 2010). Podem sofrer influência de fatores genéticos (Howard & Blomquist 2005) e ambientais (Gibbs et al. 1997, Howard e Blomquist 2005, Roux et al. 2008). Além disso, os estudos com HCs no campo da entomologia forense tem focado no seu uso como uma ferramenta taxonômica complementar, sendo utilizada para a diferenciação de espécies (Ye et al. 2007, Roux et al. 2006), populações (Jallon & David 1987, Brown et al. 1998, Paula et al. 2017), idade, bem como os estágios de desenvolvimento (Zhu et al. 2006, 2007, Xu et al. 2014, Paula et al. 2017).

Por outro lado, quando a decomposição cadavérica esta extremamente avançada, são encontradas apenas pupários de pupas de moscas nas proximidades (Frere et al. 2014) e, desta maneira, os próprios compostos químicos da cutícula dos pupários também podem ser usados para identificar a espécie (Ye et al. 2007) e assim ajudar a estimar o IPM, visto que sua degradação química é lenta (Oliveira-Costa 2013b). Desde modo, os pupários podem fornecer dados confiáveis sobre o intervalo pós-morte, pois persistem em restos decompostos mesmo depois de muitos anos (Archer & Elgar 2003).

Contudo, nessas circunstâncias, se a estimativa do intervalo pós-morte for utilizando o estágio mais avançado do inseto que ovipôs durante a primeira onda, os pupários encontradas próximas aos corpos, seria uma estimativa errônea se considerássemos apenas os pupários da última onda de espécimes emergidas. Visto que, em países temperados onde os cadáveres demoram mais tempo para se decompor a baixas temperaturas (Turner & Wiltshire 1999, Silahuddin et al. 2015) os insetos que ali emergem podem utilizar o mesmo cadáver em vários ciclos de oviposição (Silahuddin

et al. 2015) se o mesmo permanecer atrativo (Anderson & Cervenka 2002). Em estudo dentro de residências com cadáveres humanos, foram encontradas sucessivas gerações de duas espécies de moscas varejeiras *Lucilia sericata* e *Protophormia terraenovae* (Pohjoismaki et al. 2010).

Mesmo quando um corpo está dentro de uma residência, com acesso restrito aos insetos necrófagos, a espécie que conseguir acessá-lo, irá ovipor e os imaturos recém-emergidos do primeiro ciclo podem usar o cadáver como recurso para maturação de seus ovários e para o desenvolvimento de sua prole e as moscas continuarão a ovipor nas carcaças, desde que ele permaneça atrativo para elas (Anderson & Cervenka 2002).

Os cadáveres dentro de residências demoram mais tempo para se decompor, visto que as barreiras físicas e ambientais afetam a velocidade da colonização e acesso aos cadáveres (Pohjoismaki et al. 2010), resultando em uma diversidade muito menor quando comparado a carcaças expostas ao ar livre (Reibe & Madea 2010, Baz et al. 2015). E ainda as quantidades de ovos depositadas nas carcaças nestas condições são baixas, esta diminuição da massa larval pode resultar em um aumento do tempo de decomposição da carcaça (Reibe & Madea 2010).

Uma vez que as investigações forenses podem subestimar a determinação do PMI usando apenas pupários do último ciclo de oviposição, nos casos em que um único cadáver ainda é atraente por um período relativamente longo, nosso objetivo foi desenvolver um novo método para estimar o PMI por meio dos compostos químicos de pupários de diferentes ciclos de oviposição da mosca *Chrysomya megacephala* Fabricius 1794.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Para avaliar variação da composição química cuticular nos pupários de três ciclos diferentes de oviposição de *C. megacephala*, os adultos selvagens foram coletados no Município de Dourados-MS, no Campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (latitude 22° 11' Sul, longitude 54° 55' Oeste). As armadilhas foram confeccionadas a partir de frascos de Politereftalato de etileno (PET) de 2 L (Moretti et al. 2008), nas quais foram introduzidas iscas atrativas compostas de vísceras de carne bovina e suína em elevado grau de decomposição, e penduradas em galhos de árvores a 1,5 metros de altura a partir do solo, sob a ação do sol.

Os indivíduos adultos coletados foram conduzidos ao laboratório, e após triagem foram identificados usando a chave de identificação Carvalho & Mello-Patiu (2008). Em seguida, 10 adultos foram acondicionados em gaiolas de criação de 40 cm² e mantidos em uma Incubadora bioquímica de demanda de oxigênio (B.O.D.) modelo 347 CD da marca FANEM sob temperatura controlada de 27 ± 1 °C e em ciclo claro-escuro de 12:12h, alimentados com açúcar e água *ad libitum*.

O fígado bovino foi utilizado como substrato para oviposição. Após a oviposição, os ovos foram separados com auxílio de um pincel fino em lotes de 0,05g, e transferidos para um recipiente de vidro com capacidade de 300 ml, com 200 gramas de carne bovina moída e coberto com organza.

Após as larvas atingirem a fase de pós-alimentação, elas foram transferidas para outro frasco de vidro com capacidade de 500 mL, na qual foram adicionados cerca de 250 mL de serragem seca como substrato para a pupação. Após a emergência dos adultos, 50 pupários da primeira geração (F1) foram coletadas para análise. Em seguida, 40 adultos, (20 machos e 20 fêmeas) da mesma geração foram coletados e mantidos em uma mesma gaiola, alimentados com água e açúcar *ad libitum*. Inicialmente foi oferecido fígado bovino cru para maturação ovariana dos espécimes. Após cinco dias o mesmo substrato foi utilizado para oviposição.

As pupários foram coletadas 1 dia após a emergência do adulto. Então os compostos foram extraídos de todas as pupários. Da mesma forma, para coletar pupários das gerações F2 e F3, foi utilizada a mesma sequência descrita para obtenção da F1.

Análise das amostras por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

De cada ciclo de oviposição foram avaliados os compostos químicos de um total de 50 pupários divididas em 10 amostras, cada uma composta por 5 pupários.

Foram extraídos os compostos químicos de pupários inteiras e sem qualquer tipo de fixação. Cada amostra foi imersa em um recipiente de vidro com 2mL de hexano (Tedia, grau HPLC) durante 2 minutos. Após a retirada do soluto, as amostras foram secas em capela de exaustão e congeladas por no máximo 30 dias, e armazenados em freezer -20°C para posterior análise cromatográfica. Para as análises, cada extrato foi solubilizado em 200 µL de hexano.

As amostras foram analisadas empregando em um cromatografo a gás acoplado espectrômetro de massas (GC-MS Ultra 2010, Shimadzu, Kyoto, Japan), com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J & W, Folsom, California, USA), (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 µm de espessura de filme). As condições de análise foram: volume de injeção de 1 µL, injeção *splitless*; rampa de aquecimento com temperatura inicial de 150 °C alcançando 300 °C a 3 °C min⁻¹ e permanecendo na temperatura final por 10 minutos; temperatura do injetor de 220 °C. As temperaturas do detector e da linha de transferência foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. Os parâmetros de varredura do espectrômetro de massas incluíram voltagem de ionização de impacto de elétron de 70 eV, na faixa de massa de 45 a 600 m/z, com intervalo de varredura de 0.3s.

As identificações dos compostos foram realizadas empregando o índice de retenção calculado, (Van den Dool e Kratz 1963), baseado em um padrão de alcanos lineares (C₁₄-C₃₆, Sigma Aldrich com pureza ≥ 90%) e comparando o valor calculado em relação ao índice de retenção da literatura (Zhu et al. 2006, Brown et al. 1991, Zhu et al. 2013, Moore et al. 2014, Weiss et al. 2014, Bonelli et al. 2015, Zhu et al. 2017), associados à interpretação dos espectros de massas obtidos com as amostras e comparados com os espectros de massas nas bases de dados (NIST21 e WILEY229).

Análise Estatística: Análise Discriminante

Para avaliar se há diferenças significativas entre os compostos cuticulares nos pupários das três diferentes gerações foi aplicada uma análise discriminante com as áreas relativas de 100% dos compostos detectados pela análise cromatográfica.

A existência de diferença significativa entre as gerações foi considerada quando o $p < 0,05$. E, Wilks' Lambda foi utilizado como medida da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos a zero indicam não sobreposição das gerações, enquanto valores próximos a 1 indicam elevada sobreposição e conseqüente inexistência de diferença significativa entre eles (Manly 2008). As análises foram realizadas com o auxílio do programa Systat 11.

RESULTADOS

Um total de 105 picos foram detectados nas amostras das três gerações, destes, 72 foram identificados, representando 92,7% da área relativa de todos os picos

detectados. Os compostos variam de 16 a 35 átomos de carbono (Tabela 1). Dos compostos identificados, 26 foram comuns para todas as gerações (Figura 1, Tabela 1).

Da geração 1 foram detectados 72 picos, destes, foram identificados 55 compostos que representam 96% da área relativa de todos os picos detectados, além disso 20 compostos são exclusivos desta geração. Nas amostras da geração 2 foram detectados 67 picos, destes, foram identificados 47 compostos que representam 92,7% da área relativa de todos os picos detectados, 7 deles só foram encontrados nesta geração. Da geração 3, foram detectados 47 picos, destes, 38 foram identificados, representando 99,5% da área relativa dos picos detectados, destes, três são exclusivos desta geração (Tabela 1).

De acordo com tabela 1, há diferenças tanto qualitativas quanto quantitativas entre os compostos químicos das pupários entre as três diferentes gerações. A análise discriminante (Figura 2) comprova que, de fato, há diferenças significativas entre os compostos químicos das diferentes gerações de pupários da mosca varejeira *C. megacephala* (Wilks's Lambda= 0,001; F=3.914 e p<0,001).

As classes de compostos mais predominantes na ordem de importância em todas as amostras, tanto de acordo com o número, quanto de teores foram os alcanos ramificados, seguidos dos alcanos lineares e então alcenos (Tabela 1e Figura 2). Ao longo das gerações é possível identificar, de forma geral, um aumento no teor e número de alcanos lineares e redução dos alcanos ramificados e alcenos (Figura 1).

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados é possível distinguir as gerações F1, F2 e F3 de pupários pelos compostos químicos presentes, uma vez que há diferenças significativas entre elas, havendo inclusive compostos exclusivos em cada uma das gerações (Figura 1, tabela 1). A variação significativa de compostos químicos de pupários de diferentes gerações foi descrita na mosca *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann, 1830) por Frere et al. (2013).

Os compostos identificados variaram de 16 a 35 átomos de carbono, muito similar ao encontrado nas amostras de diferentes estágios de desenvolvimento da mesma espécie por Paula et al. (2017). Em Paula et al. (2017) os compostos variam de 17 a 35 cadeias de carbono, indicando que os compostos variam pouco qualitativamente

entre diferentes tipos de amostras e/ou estágios desta espécie. Zhu et al. (2013, 2017) avaliaram compostos de pupários da mesma espécie e de outra do mesmo gênero e encontraram de C₂₃ ao C₃₄ e C₃₀ ao C₃₆ respectivamente. Buckner et al. (1999) identificaram variação de C₂₈ a C₃₅ em pupários da mosca *Bemisia argentifolii* e Ye et al. (2007) encontraram compostos variaram do C₂₃ ao C₃₀ em pupários de diferentes espécies de moscas.

De forma geral os compostos identificados podem ser classificados em três classes: alcanos lineares, alcanos ramificados e alcenos. Resultados similares foram encontrados por Zhu et al. (2007, 2013, 2017) em amostras de pupários de *C. megacephala* e *C. rufifacies*. Ye et al. (2007) avaliando a composição química de pupários de 6 espécies de moscas também encontraram classes de compostos semelhantes.

O número de composto dos pupários do terceiro ciclo foi menor do que os anteriores. No entanto, considerando pupários de apenas um ciclo de oviposição, a tendência é a diminuição do número de compostos com o passar do tempo. Zhu et al. (2013) estudaram o efeito do clima em pupários de *C. megacephala* e Zhu et al. (2017) em pupários de *Chrysomya rufifacies*, esses estudos indicaram uma diminuição no número de compostos de acordo com o tempo de exposição ao ambiente, embora, nestes estudos só se tenha avaliado pupários de uma única geração.

Outra possibilidade para a diminuição do número de compostos é a endogamia provocada pelo próprio desenho amostral. De acordo com Menzel et al. (2017) a baixa variabilidade genética leva a redução nos números de compostos cuticulares. Essa característica pode provocar uma homogeneidade do perfil cuticular de pupários ao longo das gerações, além da redução de compostos exclusivos como apresentado na tabela 1. Assim, nossos resultados corroboram os de Menzel et al. (2017), os quais identificaram perda da diversidade química cuticular provocada pela endogamia na formiga *Hypoponera opacior*. Estudos futuros que avaliem a influência da adição de novos indivíduos às próximas gerações são importantes para resolver esta questão.

Apesar de que em nosso estudo não analisamos o efeito do tempo sobre a composição das pupários de um único ciclo de oviposição, de acordo com estudos como os de Zhu et al. (2013 e 2017) em cada geração sucessiva há uma tendência de decréscimo no número de alcanos ramificados e alcenos, enquanto há um aumento nos alcanos lineares ao longo das gerações. Este padrão pode ser explicado pelo fato de que as pupas não necessitam de compostos químicos de cadeias mais complexas, aqueles

mais relacionados à sinalização química (Lommelen et al. 2006), como os alcanos ramificados. Contudo, precisam de alcanos lineares, que são fundamentais para evitar a dessecação (Arnold e Regnier, 1975).

Os alcanos lineares são compostos fundamentais no estágio de pupa de moscas. Arnold & Regnier (1975) demonstraram em seu estudo que no terceiro estágio larval o inseto sai da carne podre e procura o solo, neste momento, pode encontrar um ambiente relativamente seco, assim, os hidrocarbonetos cuticulares presentes fornecerão proteção contra dessecação para as pupas no solo (Arnold & Regnier 1975). De fato, Gibbs et al. (1997), identificaram aumento de hidrocarbonetos cuticulares de cadeias mais longas em amostras de *Drosophila melanogaster* submetidas a condição de dessecação em detrimento à população controle, ou seja, estas moscas alteram o seu perfil com base nas condições ambientais às quais são submetidas.

As pupários de *C. megacephala* aumentaram consideravelmente seus teores de C₂₇ e C₂₉ com a progressão das gerações, sendo que o C₂₇ ocorre somente a partir da segunda geração e, em altos teores. Da mesma forma, Goodrich (1970) identificaram estes dois alcanos lineares como os mais abundantes em pupários da mosca varejeira *Lucilia cuprina*. Ye et al. (2007) também identificaram em pupários de seis espécies de moscas de importância forense o C₂₇ e o C₂₉ em maiores proporções. Gołebiowski et al. (2012) também identificaram o C₂₇ e C₂₉, além do C₃₁ como sendo os mais abundantes em pupas de *Lucilia sericata*. Além dos alcanos lineares as amostras de pupários desta espécie apresentam os alcanos ramificados 2-Metiloctacosano e 15-;13-Metilhentriacontano em teores relativamente altos nas três gerações. Estes compostos também são encontrados em proporções consideráveis em pupários de *A. grahmi* (Ye et al. 2007). De fato, estes compostos são frequentemente encontrados em amostras de moscas, sobretudo em moscas de importância forense (Goff 1991).

A importância dos compostos químico de exúvia de moscas já foi discutido por Ye et al. (2007) que avaliaram hidrocarbonetos cuticulares presentes em amostras de pupários de seis diferentes espécies de moscas de importância forense e concluíram que, uma vez que variam significativamente de espécie para espécie, podem ser boas ferramentas taxonômicas complementares.

Nossos resultados demonstram que é possível distinguir pupários de diferentes gerações de moscas varejeiras pelo seu perfil químico. Considerando que os hidrocarbonetos de cadeias longas são relativamente não voláteis (Blomquist & Bagnères 2010) é possível o uso de fragmentos de pupários e até mesmo amostras

armazenadas como uma alternativa para agilizar as investigações criminais (Frere et al. 2014). No entanto, o clima ou condição específica do local devem ser consideradas, pois só em locais onde a carcaça levará um tempo relativamente maior para se decompor, será colonizada por mais de uma geração de moscas. Assim, a análise de pupários por meio de seus compostos químicos mostram ser mais uma ferramenta útil para um dos aspectos mais importantes das perícias forenses, a determinação do IPM.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect). Os autores também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (WFAJ concessão número 307998/2014-2), (número de concessão CALC 307998/2014-2).

REFERÊNCIAS

- Amendt, J., R. Krettek, and R. Zehner. 2004.** Forensic Entomology. *Naturwissenschaften* 91: 51–65.
- Anderson, G.S. 2001.** Succession on carrion and its relationship to determining time of death, pp. 143–175. In Byrd, J.H. and J.L. Castner (eds.). *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC, Boca Raton.
- Anderson G.S. and V. J. Cervenka. 2002.** Insects associated with the body: their use and analyses, pp. 173–200. In Haglund, W.D. and M.H. Sorg. (eds.), *Advances in forensic taphonomy: method, theory, and archaeological perspectives*. CRC Press, Boca Raton.
- Archer, M.S. and M.A. Elgar. 2003.** Effects of decomposition on carcass attendance in a guild of carrion-breeding flies. *Med. Vet. Entomol.* 17: 263–271.
- Arnold, M.T. and F.E. Regnier. 1975.** A developmental study of the cuticular hydrocarbons of *Sarcophaga bullata*. *J. Insect Physiol.* 21: 1827–1833.
- Badhe, R.V., A.B. Thomas, S.L. Harer, A.D. Deshpande, N. Salvi, and A. Waghmare. 2006.** Intraspecific variation in protein of red scorpion (*Mesobuthus tamulus*, Coconsis, Pocock) venoms from Western and Southern India. *J. Venom. Anim. Toxins.* 12: 612–619.
- Baz, A., C. Botías, D. Martín-Vega, B. Cifrián, and L.M. Díaz-Aranda. 2015.** Preliminary data on carrion insects in urban (indoor and outdoor) and periurban environments in central Spain. *Forensic Sci. Int.* 248: 41–47.
- Blomquist, G. and A.G. Bagnères. 2010.** *Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology*. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Bonelli, M., M.C. Lorenzi, J.P. Christidès, S. Dupont, and A.G. Bagnères. 2015.** Population diversity in cuticular hydrocarbons and mtDNA in a mountain social wasp. *J. Chem. Ecol.* 41: 22–31.
- Braga, M.V., Z.T. Pinto, M.M.C. Queiroz, N. Matsumoto, and G.J. Blomquist. 2013.** Cuticular hydrocarbons as a tool for the identification of insect species: Puparial cases from Sarcophagidae. *Acta Trop.* 128: 1–13.
- Brown, W.V., J.P. Spradbery, and M.J. Lacey. 1991.** Changes in the cuticular hydrocarbon composition during development of the social wasp, *Vespula*

germanica (F.) (Hymenoptera: Vespidae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 99: 553–562.

- Brown, W.V., R. Morton, M.J. Lacey, J.P. Spradbery, and R.J. Mahon. 1998.** Identification of the geographical source of adults of the Old World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae), by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol.* 119: 391–399.
- Buckner, J.S., M.M. Hagen, and D.R. Nelson. 1999.** The composition of the cuticular lipids from nymphs and exuviae of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Comp Biochem Physiol B: Biochem. Mol. Biol.* 124: 201–207.
- Carvalho, C.J.B., and C.A. Mello-Patiu. 2008.** Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Rev. Bras. Entomol.* 3: 390–406.
- Catts, E.P., and N.H. Haskell. 1991.** *Entomology and death: a procedural guide.* Joyce's Print Shop, Clemson, South Carolina.
- Dani, F.R., G.R. Jones, S. Destri, S.H. Spencer, and S. Turillazzi. 2001.** Deciphering the recognition signature within the cuticular chemical profile of paper wasps. *Anim. Behav.* 62: 165–171.
- Ebbs, M.L., and Amrein, H. 2007.** Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflug Arch Eur J Physiol.* 454(5): 735–747.
- Etges, W.J., and M.A. Ahrens. 2001.** Premating isolation is determined by larval-rearing substrates in cactophilic *Drosophila mojavensis*. V. Deep geographic variation in epicuticular hydrocarbons among isolated populations. *Am. Nat.* 158: 585–598.
- Etges, W.J., C.C. Oliveira, S. Rajpurohit, and A.G. Gibbs. 2017.** Effects of temperature on transcriptome and cuticular hydrocarbon expression in ecologically differentiated populations of desert *Drosophila*. *Ecol. Evol.* 7: 619–637.
- Fisher, P., R. Wall, and Jr. Ashworth. 1998.** Attraction of the sheep blowfly, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) to carrion bait in the field. *Bull. Entomol. Res.* 88: 611–616.
- Frere, B., F. Suchaud, G. Bernier, F. Cottin, B. Vincent, L. Dourel, A. Lelong, and P. Arpino. 2014.** GC-MS analysis of cuticular lipids in recent and older scavenger insect puparia. An approach to estimate the postmortem interval. *Anal. Bioanal. Chem.* 406: 1081–1088.

- Gibbs, A.G., A.K. Chippindale, and R.R. Michael. 1997.** Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 200: 1821–1832.
- Goff, M.L. 1991.** Comparison of insect species associated with decomposing remains recovered inside dwellings and outdoors on the island of Oahu, Hawaii. *J. Forensic Sci.* 3:748–753.
- Goff, M.L., and C.B. Odom. 1987.** Forensic Entomology in the Hawaiian Islands: Three Case Studies. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 8: 45–50.
- Golębiowski, M.G., M. Paszkiewicz, A. Grubba, D. Gasiewska, M.I. Boguś, E. Włóka, W. Wieloch, and P. Stepnowski. 2012.** Cuticular and internal nalkane composition of *Lucilia sericata* larvae, pupae, male and female imagines: application of HPLC-LLSD and GC/MS-SIM. *Bull. Entomol. Res.* 102: 453–460.
- Goodrich, B.S. 1970.** Cuticular lipids of adults and puparia of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wied.). *J. Lipid Res.* 11: 1–6.
- Guillem, R.M., F.P. Drijfhout, and S.J. Martin. 2012.** Using chemo-taxonomy of host ants to help conserve the large blue butterfly. *Biol. Conserv.* 148: 39–43.
- Howard, R.W. and G.J. Blomquist. 2005.** Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Ann. Rev. Entomol.* 50: 371–393.
- Jallon, J.M., and J.R. David. 1987.** Variation in Cuticular Hydrocarbons Among the Eight Species of the *Drosophila melanogaster* Subgroup. *Evolution*, 41: 294–302.
- Lockey, K. H. 1988.** Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp. Biochem. Physiol. B* 89: 595–645.
- Lommelen, E., C.A. Johnson, F.P. Drijfhout, J. Billen, T. Wenseleers, and B. Gobin. 2006.** Cuticular hydrocarbons provide reliable cues of fertility in the ant *Gnamptogenys striatula*. *J. Chem. Ecol.* 32: 2023–2034.
- Lorenzi, M.C., R. Cervo, and A.G. Bagnères. 2011.** Facultative social parasites mark host nests with branched hydrocarbons. *Anim. Behav.* 82: 1149–1157.
- Manly, B.J.F. 2008.** Métodos estatísticos multivariados: uma introdução. Bookman, Porto Alegre.
- Menzel, F., R. Radke, and S. Foitzik. 2016.** Odor diversity decreases with inbreeding in the ant *Hypoponera opacior*. *Evolution.* 70: 2573–2582.

- Moore, H.E., C.D. Adamb, and F.P. Drijfhout. 2014.** Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Sci. Int.* 240: 48–53.
- Nelson, D.R., and R.E. Lee. 2004.** Cuticular lipids and desiccation resistance in overwintering larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Comp. Biochem. Physiol B: Biochem. Mol.* 138: 313–320.
- Nuorteva, P. 1977.** Sarcosaprophagous insects as forensic indicators, pp. 1072–1095. In: Tedeshi, G.C., W.G. Eckert, and L.G. Tedeshi. (eds). *Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards*, vol 2, Saunders, Philadelphia.
- Oliveira-Costa, J. 2013a.** *Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios*. 3rd ed. Ed. Millenium, Campinas, São Paulo.
- Oliveira-Costa, J. 2013b.** *Insetos “peritos”: entomologia Forense no Brasil*. 1st ed. Ed. Millenium, Campinas, São Paulo.
- Paula, M.C., W.F. Antonialli-Junior, A. Mendonça, K.B. Michelutti, A.D. Eulalio, C.A.L. Cardoso, T. Lima, and C.J. Von Zuben. 2017.** Chemotaxonomic Profile and Intraspecific Variation in the Blow Fly of Forensic Interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 54: 14–23.
- Pechal, J.L., H. Moore, F. Drijfhout, and M.E. Benbow. 2014.** Hydrocarbon profiles throughout adult *Calliphoridae* aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 245: 65–71.
- Pohjoismäki, J.L.O., P.J. Karhunen, S. Goebeler, P. Saukko, and I.E. Sääksjärvi. 2010.** Indoors forensic entomology: colonization of human remains in closed environments by specific species of sarcosaprophagous flies. *Forensic Sci. Int.* 199: 38–42.
- Rajpurohit, S., R. Hanus, V. Vrkoslav, E.L. Behrman, A.O. Bergland, D. Petrov, J. Cvačka, and O.S. Schmidt. 2017.** Adaptive dynamics of cuticular hydrocarbons in *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 30: 66–80.
- Reibe, S., and B. Madea. 2010.** How promptly do blowflies colonise fresh carcasses? A study comparing indoor with outdoor locations. *Forensic Sci. Int.* 195: 52–57.
- Roux, O., C. Gers, and L. Legal. 2006.** When, during ontogeny, waxes in the blowfly (Calliphoridae) cuticle can act as phylogenetic markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 34: 406–416.

- Roux, O., C. Gers, L. Legal. 2008.** Ontogenetic study of three Calliphoridae of forensic importance through cuticular hydrocarbon analysis. *Med. Vet. Entomol.* 22: 309–317.
- Service, P. M., E. W. Hutchinson, M. D. Mackinley, and M. R. Rose. 1985.** Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiol. Zool.* 58: 380–389.
- Silahuddin, S.A., B. Latif, H. Kurahashi, D.E. Walter, and C.C. Heo. 2015.** The importance of habitat in the ecology of decomposition on rabbit carcasses in Malaysia: Implications in forensic entomology. *J. Med. Entomol.* 52: 9–23.
- Smith, K.G.V. 1986.** *A Manual of Forensic Entomology*. University Printing House, Oxford.
- Stevens, J.R. 2003.** The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). *Int. J. Parasitol.* 33: 1105–1113.
- Sukontason, K.L., R. Ngern-Klun, D. Sripakdee, and K. Sukontason. 2007.** Identifying fly puparia by clearing technique: application to forensic entomology. *Parasitol. Res.* 101: 1407–1416.
- Toolson, R., and E.C. Kuper-Simbron. 1989.** Laboratory evolution of epicuticular hydrocarbon composition and cuticular permeability in *Drosophila pseudoobscura*: effects on sexual dimorphism and thermal-acclimation ability. *Evolution* 43: 468–473.
- Turner, B., and P. Wiltshire. 1999.** Experimental validation of forensic evidence: a study of the decomposition of buried pigs in a heavy clay soil. *Forensic Sci. Int.* 101: 113–122.
- Van den Dool, H., and P.D. Kratz. 1963.** A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr.* 11: 463–471.
- Wall, R. and M.L. Warnes. 1994.** Responses of the sheep blowfly *Lucilia sericata* to carrion odour and carbon dioxide. *Entomol. Exp. Appl.* 73: 239–246.
- Weiss, K, C. Parzefall, and G. Herzner. 2014.** Multifaceted defense against antagonistic microbes in developing offspring of the parasitoid wasp *Ampulex compressa* (Hymenoptera, Ampulicidae). *PLoS ONE* 9: 1–14.
- Xu, H., G.Y. Ye, Y. Xu, C. Hu, and G.H. Zhu. 2014.** Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci. Int.* 242: 236–241.

- Ye, G.Y., K. Li, J.Y. Zhu, G.H. Zhu, and C. Hu. 2007.** Composition in Pupal Exuviae for Taxonomic Differentiation of Six Necrophagous Flies. *J. Med. Entomol.* 44: 450–456.
- Zhu, G.H., G.Y. Ye, C. Hu, X.H. Xu, and K. Li. 2006.** Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. *Med. Vet. Entomol.* 20: 438–444.
- Zhu, G.H., X.H. Xu, X.J. Yu, Y. Zhang, and J.F. Wang. 2007.** Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. *Forensic Sci. Int.* 169: 1–5.
- Zhu, G.H., X.J. Yu, L.X. Xie, H. Luo, D. Wang, J.Y. Lv, and X.H. Xu. 2013.** Time of death revealed by hydrocarbons of empty puparia of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae): a field experiment. *PLoS One* 8: e73043.
- Zhu, G.H., Z.J. Jia, X.J. Yu., K.S. W, L.S. Chen, J.Y. Lv, and M.E. Benbow. 2017.** Predictable weathering of puparial hydrocarbons of necrophagous flies for determining the postmortem interval: a field experiment using *Chrysomya rufifacies*. *Int. J. Legal Med.* 131: 1–10.
- Zumpt, F. 1965.** Myiasis in Man and Animals in the Old World: A Textbook for Physicians, Veterinarians, and Zoologists. Butterworths, London.

TABELA

Tabela 01. Proporção relativa dos hidrocarbonetos cuticulares presentes em pupários de pupas de três gerações da mosca varejeira *Chrysomya megacephala*.

Composto	CEC	1º Geração	2º Geração	3º Geração
		(F1)	(F2)	(F3)
Abundância Relativa (% ± Desvio Padrão)				
C ₁₆	1600	ND	0.14±0	ND
C ₁₇	1700	ND	0.14±0	ND
C ₁₈	1800	ND	0.19±0	ND
3-MeC ₁₈ *	1875	0.78±0.24	2.18±1.27	2.59±0.77
2-MeC ₁₉ *	1970	14.57±9.04	0.85±0.54	0.32±0.06
C ₂₀	2000	ND	0.77±0.73	ND
C ₂₁	2100	ND	0.43±0.36	0.22±0.05
9-MeC ₂₁	2144	6.48±4.14	ND	ND
7-MeC ₂₁	2148	4.62±4.85	ND	ND
5-MeC ₂₁	2150	12.59±6.85	ND	ND
4-MeC ₂₁	2156	12.21±12.26	ND	ND
2-MeC ₂₁	2161	9.43±7.72	ND	ND
3-MeC ₂₁	2166	0.96±1.62	ND	ND
C ₂₂	2200	ND	1.12±0.88	0.38±0.16
C _{23:1}	2270	ND	1.73±1.29	ND
C ₂₃ *	2300	0.20±0.06	1.65±1.09	0.58±0.28
3-MeC ₂₃	2366	0.20±0.09	ND	ND
C ₂₄	2400	ND	1.35±0.71	0.79±0.66
C _{25:1} *	2484	19.69±0	ND	ND
C ₂₅ *	2500	0.76±0.17	1.22±0.75	1.39±0.38
9-,11-,13-MeC ₂₅	2525	0.13±0.06	0.25±0.04	ND
7-MeC ₂₅	2552	ND	0.72±0.41	ND
5-MeC ₂₅ *	2555	0.37±0.10	2.36±2.31	1.22±2.15
2-MeC ₂₅	2565	ND	ND	0,4±0
C ₂₆ *	2600	0.16±0.03	0.51±0.21	0.39±0.32
13-MeC ₂₆	2636	0.11±0.03	1.13±0.15	ND
C _{27:1}	2671	0.11±0	ND	ND
3-MeC ₂₆	2672	ND	ND	0,22±0
C ₂₇	2700	ND	3,61±0,46	9.74±1.55
x-DiMeC ₂₇	2710	5.73±1.65	7.01±2.68	ND
13-MeC ₂₇	2732	ND	3.76±3.28	ND
7-MeC ₂₇	2739	ND	25.30±2.28	0.55±0.54
2-MeC ₂₇ *	2767	0.74±1.53	1.37±0.53	2.84±0.54
C _{28:1}	2777	1.59±0.55	ND	ND
C ₂₈ *	2800	0.60±0.18	0.78±0.34	0.80±0.16
14-MeC ₂₈ *	2836	0.60±0.28	5.17±2.49	3.35±0.44
x-MeC ₂₈	2846	ND	4.80±3.46	ND
2-MeC ₂₈ *	2860	5.03±1.43	7.46±3.11	10.73±1.15
4,8-Di =MeC ₂₈	2892	ND	ND	1.46±0.59
C _{29:1}	2891	ND	1.59±2.90	ND
C ₂₉ *	2900	10.92±2.52	12.00±6.19	18.19±3.75
13-MeC ₂₉ *	2931	1.22±0.46	6.34±5.53	3.33±0.63
7-MeC ₂₉ *	2939	0.31±0.10	0.52±0.56	0.51±0.087
5-MeC ₂₉ *	2951	0.59±0.20	0.45±0.14	0.95±0.18
11,15-,17,15-,9,17-,9,19-DiMeC ₂₉	2959	0.13±0.04	1,35±0,19	ND
11,19-DiMeC ₂₉	2964	0.19±0.04	1.14±0.57	ND
7,17-DiMeC ₂₉ *	2974	1.39±0.50	1.19±0.87	2.98±0.75
C ₃₀ *	3000	0.47±0.11	0.25±0.10	0.40±0.11
15-,14-MeC ₃₀ *	3031	0.89±0.33	1.05±0.24	1.56±0.28

2-MeC ₃₀ *	3061	2.63±0.99	2.12±0.76	2.90±0.43
C _{31:1} *	3094	0.89±0.32	0.68±0.33	1.48±0.41
C ₃₁ *	3100	2.82±0.79	1.77±0.90	2.68±1.89
15-;13-MeC ₃₁ *	3127	9.05±3.43	13.27±5.12	17.87±1.75
7-MeC ₃₁ *	3143	0.54±0.21	0.42±0.25	0.49±0.15
13,17-DiMeC ₃₁ *	3155	3.08±1.07	4.34±1.40	4.50±0.91
11,15-DiMeC ₃₁	3163	0.18±0.04	ND	ND
9,17-;9,19-;9,21-DiMeC ₃₁	3170	0.29±0.06	ND	ND
11-MeC ₃₂ *	3229	1.12±0.35	0.75±0.27	0.92±0.22
10-;12-;13-;14-MeC ₃₂	3231	0.62±0.68	0.28±0	ND
12,16 -DiMeC ₃₂	3255	0.46±0.25	0.41±0	ND
2-MeC _{3,m2}	3263	0.50±0.25	ND	ND
C _{33:1}	3292	0.40±0.15	ND	ND
C ₃₃	3300	0.32±0.27	ND	ND
13-MeC ₃₃ *	3332	4.52±1.77	2.09±1.17	3.66±0.91
13, 17-DiMeC ₃₃	3355	1.62±0.76	ND	1.00±0.38
9,19-;9,2-;9,23-Di =MeC ₃₃	3361	0.14±0	ND	ND
11,17,21-;11,17,23-TriMeC ₃₃	3371	0.30±0.11	0.37±0.12	ND
9,13,17-;9,15,19-;9,15,21;9,15,23-TriMeC ₃₃	3387	0.35±0,12	ND	ND
C _{34:1}	3492	0.33±0.19	ND	ND
11-;13-;15-;17-MeC ₃₅	3532	0.43±0	ND	ND
13,23-;11,21-DiMeC ₃₅	3559	0.68±0	ND	ND

*Compostos que ocorrem em todas as gerações; ND: Não detectados; CEC: Comprimento Equivalente de Cadeia.

FIGURAS

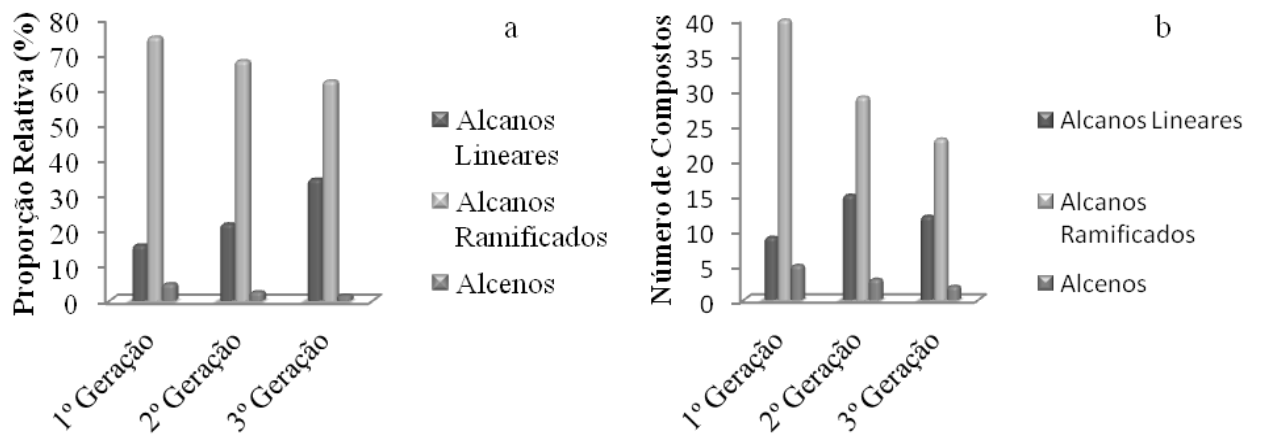


Figura 1. Proporções relativas das classes de compostos (a) e Número de compostos (b) presentes na exuvia de 3 diferentes gerações da mosca varejeira *Chrysomya megacephala*.

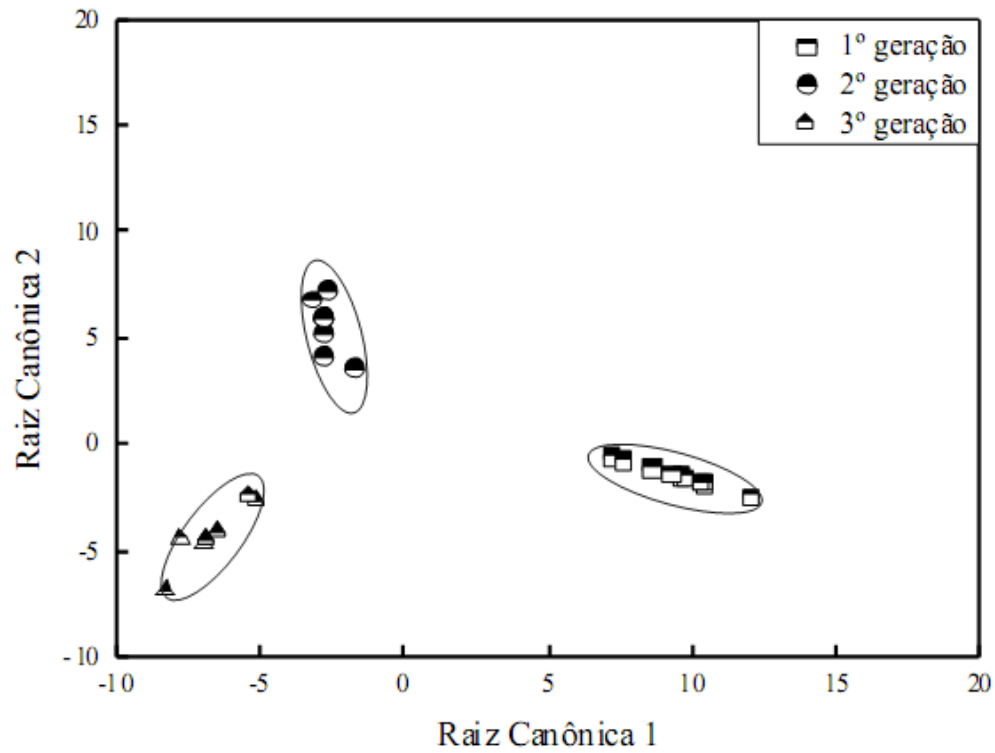


Figura 2. Diagrama de dispersão mostrando a diferenciação do perfil químico cuticular por CG-EM, de pupários de 3 diferentes gerações da mosca varejeira *Chrysomya megacephala*.

Capítulo III

Espectroscopia fotoacústica no infravermelho médio como ferramenta útil para agilizar análises de amostras de importância forense

Michele C. Paula^{1,2}, Kamylla B. Michelutti², Aylson D. M. Eulalio^{1,2}, Angélica Mendonça^{1,2}, Claudia A. L. Cardoso³, Luis H. C. Andrade⁴, William F. Antonialli-Junior^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil; ²Laboratório de Ecologia Comportamental (LABECO), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Dourados/Itahum, km 12, Caixa Postal 351, 79804-970, Dourados, MS, Brasil; ³Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio); ⁴Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica, Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, C.P. 351, Dourados, MS, Brasil.

RESUMO

A entomologia forense é um estudo que utiliza insetos para auxiliar a responder diversas questões nas investigações de crimes. A principal aplicação dos dados fornecidos pelos insetos é na estimativa do Intervalo Pós-Morte mínimo (IPMmin) e a determinação do local onde ocorreu o crime. Os insetos podem fornecer pistas de diversas maneiras para completar as perícias criminais. A análise do perfil químico cuticular é uma forma recente e útil para complementar outras análises porque pode agilizar a obtenção dos resultados o que é de grande valia para solucionar um crime. A técnica Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) vem sendo usada com sucesso para avaliar o perfil químico cuticular de amostras de insetos de diferentes grupos e para variados objetivos. Tendo como umas das vantagens principais o não preparo das amostras, e ainda baixo custo para as análises. No entanto, até o momento, não foi utilizada para avaliar amostras de interesse forense, mesmo sendo uma técnica mais ágil para obtenção de resultados do que as técnicas utilizadas atualmente. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial desta técnica para analisar diferenças do perfil químico cuticular dos diferentes estágios de desenvolvimento da mosca *Chrysomya megacephala* em duas populações distintas. De acordo com os resultados, é possível detectar diferenças significativas entre os perfis químicos cuticulares das duas populações e dos diferentes estágios de desenvolvimento da mosca. Portanto, os resultados fornecidos por esta técnica podem ajudar a perícia

forense a se chegar a idade dos indivíduos coletados na cena do crime e a distinção de diferentes populações, conseqüentemente tanto auxiliando a estimar o IPM quanto o local onde ocorreu o crime, ou se o corpo sofreu algum tipo de translocação. Como é uma técnica na qual a obtenção dos resultados é mais ágil, e mais barata comparada às análises mais usuais, ela pode ser uma alternativa útil para ser usada com amostras de interesse forense.

Palavras chave: FTIR, Intervalo Pós-morte, *Chrysomya megacephala*, perfil cuticular, mosca varejeira.

INTRODUÇÃO

Em casos de morte quando não se sabe as causas, a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) para determinar o tempo decorrido desde a morte é essencial, e a entomologia forense vem se tornando uma alternativa valiosa quando os médicos patologistas são incapazes de estimá-lo com eficiência (Benecke 2001).

As moscas são consideradas como o grupo mais atuante durante o processo de decomposição do cadáver (Smith 1986). Colonizam as carcaças em grande abundância (Benecke 2001), utilizando-as como recurso para maturação de seu ovário e em seguida depositam seus ovos para o desenvolvimento de sua prole. Dentre os dípteros as moscas varejeiras da família Calliphoridae, são particularmente importantes, pois são aquelas que geralmente localizam a carcaça primeiro, minutos após a morte, constituindo a principal onda de oviposição sendo, portanto, de extrema importância para a estimativa do IPM (Oliveira-Costa 2013), pois Segundo Smith (1986) o tempo de desenvolvimento das larvas de moscas mostram o mínimo de tempo em que o corpo esteve exposto.

Os insetos recuperados do corpo podem então ser usados como um “relógio” para se estimar o Intervalo Pós-Morte Mínimo (IPMmin) ou há quanto tempo o corpo está disponível aos insetos (Kranz et al. 2017). Para realizar suas estimativas, entomologistas forenses coletam amostras de espécimes de insetos que exploraram o cadáver desde seus primeiros estágios de decomposição, como por exemplo, larvas de último ínstar que se criaram no cadáver para uma estimativa mais precisa. Estas amostras são então, levadas ao laboratório, criadas até a emergência do adulto para possibilitar sua identificação (Hart et al. 2008, Amendt et al. 2000). A identificação correta da espécie é essencial, pois cada uma apresenta um período de estágio de

desenvolvimento diferente (Jordaens et al. 2013), desse modo, caso a identificação seja feita incorretamente implicará em uma estimativa de tempo errônea (Catts & Goff 1992).

A determinação incorreta da espécie também pode levar a uma determinação errônea do local do crime, uma vez que trabalhos mostram que algumas espécies apresentam certa especificidade em relação ao ambiente como espécies que só ocorrem em ambiente de mata (Carvalho & Linhares 2001), em contrapartida outras apresentam um elevado grau de sinantropia (Catts & Haskell 1991). Assim, se espécies sinantrópicas estão presentes em um cadáver encontrado em ambiente rural, sugere-se que a vítima tenha sido morta na cidade e levada para o ponto onde foi encontrada em uma tentativa de ocultação de cadáver (Catts & Haskell 1991). Estes dados só são viáveis e aplicáveis devido ao estudo da ecologia e da distribuição geográfica de espécies de importância forense (Centeno et al. 2002).

No entanto, os métodos clássicos além de demandar relativamente muito tempo, o que atrasaria resultados nas investigações criminais, também pode se tornar inviável, pois as larvas coletadas podem estar em más condições, o que pode impossibilitar sua manutenção em laboratório até o estágio de adulto. Uma alternativa é a identificação taxonômica por meio dos próprios imaturos, porém existem poucas chaves que abrangem todas as espécies de dípteros de importância forense (Stevens e Wall 2001). Outra alternativa é a extração de DNA para a determinação da espécie, sequenciando um locus de DNA mitocondrial (Sperling et al. 1994, Nelson et al. 2008). No entanto, segundo Wells et al. (2007) é necessário ter certa experiência para a análise de sequência de DNA e também é primordial que se obtenha uma representação completa de todas as possíveis espécies.

A análise do perfil químico cuticular é uma forma recente e útil para complementar outras análises na busca de responder questões de interesse forense, porque pode agilizar a obtenção dos resultados. Vários especialistas no campo da entomologia forense sugerem como ferramenta análises químicas por meio dos compostos químicos cuticulares para complementar identificações morfológicas tradicionais (Greenberg 1991, Ye et al., 2007, Moore et al. 2013, Xu et al. 2014, Paula et al. 2017). Estudos recentes com moscas de importância forense utilizando seus perfis cuticulares têm demonstrado o potencial dos compostos químicos para serem utilizados na taxonomia complementar, e até mesmo substituindo exames morfológicos tradicionais (Ye et al. 2007, Roux et al. 2006, Guillem et al. 2012, Greenberg 1991).

Estes compostos cuticulares estão presentes na camada mais superficial do inseto, juntamente com álcoois, ácidos gordurosos, ceras, acilglicérides, fosfolípidos e glicolípidos (Lockey 1988). A função primária dos CHCs é a prevenção contra dessecação e também atuar como uma barreira de proteção contra patógenos (Lockey 1988). Ao longo do processo de evolução dos insetos, os hidrocarbonetos, além da função primária também passaram a ser utilizados na comunicação química, atuando como feromônios, cairomônios e alomônios (Ebbs & Amrein, 2007).

Desta forma, o perfil cuticular vem sendo utilizado para identificação de espécies como no estudo de Moore et al. (2014) que conseguiram diferenciar 3 espécies de moscas varejeiras de importância forense por meio das larvas de primeiro instar. Zhu et al. (2006), Moore et al. (2013) e Paula et al. (2017) conseguiram diferenciar os instares larvais de diferentes espécies de moscas pelos seus perfis químicos da cutícula, demonstrando que os CHCs são específicos de cada estágio de desenvolvimento, portanto, tendo importantes implicações na determinação do IPM. Além disso, Kruger et al. (1991) e Paula et al. (2017) observaram que a composição química cuticular de moscas varia de acordo com as populações, portanto, podendo ser aplicada na perícia para ajudar a solucionar qual o local onde o crime ocorreu, ou se o cadáver pode ter sofrido algum deslocamento.

Todos estudos que avaliaram os compostos químicos cuticulares de amostras de interesse forense até o momento utilizaram técnicas cromatográficas (Ye et al. 2007, Zhu et al. 2007, Moore et al. 2013, 2014, Pechal et al. 2014, Xu et al. 2014, Frere et al. 2014, Braga et al. 2016, Zhu et al. 2017, Barbosa et al. 2017, Bernhardt et al. 2017, Moore et al. 2017, Paula et al. 2017). Entretanto, outra técnica também química vem sendo utilizada para avaliar diferenças entre os perfis cuticulares de insetos (Gibbs & Mousseau 1994, Gibbs & Pomonis 1995), sobretudo de amostras de himenópteros sociais (Antoniali- Junior et al. 2007, 2008, Neves et al. 2012, 2013, Bernardi et al. 2014, Bernardi et al. 2017, Sguarizi-Antonio et al. 2017, Cunha et al. 2017). A técnica de Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS) vem sendo utilizada com sucesso para diferenciar grupos, sem a pretensão de identificar os compostos, mas sim grupos funcionais (Cunha et al. 2017).

Esta técnica corresponde a uma medida da radiação na faixa espectral do infravermelho médio absorvida pela amostra, que apresenta como vantagens a aplicação em materiais de grande fragilidade como materiais biológicos, podendo ser empregada em medidas de amostras com dimensões reduzidas e em relativamente pouco tempo,

comparada a outras técnicas, já que esta técnica não emprega métodos ópticos dispersivos na sua varredura espectral, de forma que a obtenção dos espectros pode ser realizada em poucos minutos, permitindo a análise de um grande número de amostras sem danificá-las (Greene et al. 1992). Outro aspecto relevante é que as amostras não necessitam de uma etapa de preparo especial, podendo ser levadas direto para leitura (Antoniali-Junior et al. 2008). Portanto, por ser uma análise rápida e não destrutiva (Antoniali-Junior et al. 2007) ela pode ser uma ferramenta útil para análises de amostras de interesse forense, uma vez que de acordo com (Oliveira-Costa 2013) quanto maior o tempo decorrido após o crime, menores as chances de solucioná-lo.

Desta forma, uma vez que o sucesso para obtenção de bons resultados de uma técnica também depende do tipo de amostra, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial da técnica FTIR-PAS para analisar diferenças do perfil químico cuticular dos diferentes estágios de desenvolvimento da mosca *Chrysomya megacephala* de duas populações distintas, agilizando assim a obtenção de resultados para responder perguntas essenciais para a solução de casos envolvendo a perícia forense.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram coletados indivíduos adultos de *C. Megacephala* de duas populações distintas: do município de Rio Claro-SP, no Campus da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (latitude 22° 23’S Sul, longitude 47° 32’Oeste); outra do município de Dourados-MS, no Campus da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, (latitude 22° 11’ Sul, longitude 54° 55’ Oeste). Para as coletas foram utilizadas armadilhas confeccionadas a partir de três frascos de politereftalato de etileno (PET) de 2 litros, nas quais foram introduzidas iscas atrativas compostas de vísceras de carne bovina e suína em elevado grau de decomposição. Elas foram penduradas em galhos de árvores a 1,5 metros de altura a partir do solo, exposta à luz solar durante 6 horas.

Os indivíduos adultos coletados foram conduzidos ao laboratório de Ecologia Comportamental (LABECO/UEMS) e após triagem e identificação (Carvalho & Mello-Patiu 2008) foram acondicionados em gaiolas de criação de 40 cm² e mantidos no laboratório em câmara incubadora sob temperatura controlada de (25°C ± 1) e em ciclo claro-escuro de 12:12h. Foram mantidos 30 espécimes nestas condições, os quais foram alimentados com açúcar e água *ad libitum*. A carne bovina moída e crua foi empregada

como substrato para oviposição. Após as moscas efetuarem a oviposição, com auxílio de um pincel fino, os ovos foram separados em lotes para um recipiente de vidro com capacidade de 300 ml coberto com organza. A proporção utilizada foi de aproximadamente 0,05g de ovos para 200g de carne moída. No quarto dia, quando as larvas atingiram a fase de pós-alimentação, elas foram transferidas para outro frasco de vidro com capacidade de 500 mL, na qual foram adicionados cerca de 250 mL de serragem seca como substrato para a pupação. Após dois dias da emergência dos adultos iniciou-se a maturação dos ovários com fígado bovino cru durante 5 dias, e mais cinco dias sem a proteína. Após 10 dias ofertou a carne moída crua para que os espécimes realizassem a ovispotura. De modo que o experimento iniciou-se a partir da segunda geração (F2).

Análise das amostras pela técnica Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS)

Foram feitos testes prévios para se estabelecer qual número ou massa de amostra de cada estágio de desenvolvimento resultaria em uma leitura com melhor sinal. Assim, ficou estabelecido que a quantidade de ovos seria o equivalente à massa de um adulto (0,054g \pm 0,008), 10 larvas de primeiro ínstar, 2 larvas de segundo ínstar, 1 larva de terceiro ínstar, uma pupa e um indivíduo adulto. Foram realizadas 15 leituras de cada estágio de desenvolvimento.

As amostras de ovos foram coletadas aproximadamente 8 horas após a oviposição; as larvas de primeiro ínstar foram coletadas no primeiro dia após eclosão a partir do surgimento de uma única fenda espiracular; as de segundo ínstar, no segundo dia, quando há duas fendas espiraculares; do terceiro ínstar no terceiro dia, quando há três fendas espiraculares (Oliveira-Costa et al. 2013); da pupa no sétimo dia; e dos adultos no décimo terceiro dia, após a emergência das pupas.

Todas as amostras estavam frescas, sem nenhum tipo de fixação, conservação ou preparo, a fim de não correr riscos de qualquer tipo de solução reagir e extrair os compostos da cutícula.

A leitura das amostras foi realizada com um espectrofotômetro Thermo-Nocolet Nexus 670, combinado com um detector fotoacústico (MTEC-300). A célula fotoacústica foi purgada com gás hélio antes de cada leitura com o objetivo de maximizar o sinal fotoacústico, retirando o CO₂ e vapor de água do interior da célula. O espectro resultante de cada análise foi obtido pela média de 128 varreduras (“scans”)

com resolução espectral de 16 cm^{-1} . Antes da leitura dos espectros das amostras, foi utilizada uma amostra de carbono como referência (“background”) para a normalização da intensidade espectral, de modo que novos espectros de referência foram realizados a cada 100 minutos. Para possibilitar uma análise comparativa, todos os espectros foram normalizados.

Análise estatística

Para avaliar se existem diferenças significativas entre os perfis químico cuticulares entre as amostras dos diferentes estágios de desenvolvimento nas duas populações, foram aplicadas uma função discriminante (DFA – *Discriminant Function Analysis*), com as intensidades dos picos de absorção mais relevantes encontrados nos espectros obtidos por FTIR-PAS. Esta análise estatística é indicada por revelar um conjunto de variáveis que melhor diferenciam os grupos avaliados (Quinn & Keough, 2002).

Nesta análise, a variável Wilks’ Lambda é utilizada como medida da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos a zero indicam que os grupos não se sobrepõem, enquanto valores próximos a 1 indicam elevada sobreposição entre os grupos e consequente inexistência de diferença significativa entre eles (Manly 2008). Todas as análises foram processadas pelo programa Statistica 7.

RESULTADOS

Análise das amostras pela técnica Espectroscopia Fotoacústica no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR-PAS)

Os espectros médios de absorção do infravermelho médio de todos os estágios de desenvolvimento das amostras das duas populações estão representados na Figura 01. A partir destes espectros foram selecionados 14 grupos funcionais mais intensos juntamente com os modos vibracionais e os picos mais significativos, estabelecidos a partir das análises estatísticas listados na Tabela 01, identificados a partir de dados reportados na literatura (Lin-vien et al. 1991, Smith 1999).

Por meio da inspeção visual dos espectros médios de absorção é possível detectar diferenças entre os perfis químicos dos estágios das amostras das duas populações (Figura 01). No qual alguns picos nas regiões destacadas são relativamente

mais intensos enquanto outros menos. Alguns destes picos são referentes ao C-H fora do plano e podem estar associados a hidrocarbonetos. Os picos em 1650 cm^{-1} e 1681 cm^{-1} podem ser atribuídos a presença de alcenos e em 2854 cm^{-1} o pico pode ser atribuído a carbonos primários e secundários. Além dos hidrocarbonetos, o pico em 1241 pode estar associado a presença de ácidos carboxílicos. E os picos em 1519 cm^{-1} e 1542 cm^{-1} podem estar associados a presença de amidas e aminoácidos presentes na cutícula.

A análise discriminante indica que há diferenças significativas tanto entre a composição química das amostras de Dourados-MS (Wilk's Lambda=0,000; F= 56,20; $p<0,001$), (Figura 02) quanto de Rio Claro-SP (Wilk's Lambda=0,000; F= 54,50; $p<0,001$) (Figura 03). A análise também comprova que há diferenças significativas dos perfis químicos cuticulares entre as diferentes amostras das duas populações (Wilks' Lambda= 0,001; F= 26,67; $p< 0,001$). A primeira raiz canônica explicou 60% desta separação para população de Rio Claro, enquanto para Dourados a primeira raiz canônica explicou 59.2 % desta separação, ambos para os 14 picos selecionados.

Nas amostras das duas populações, quatro picos foram importantes para a separação entre os estágios. Sendo da população de Dourados os picos 1396, 1542, 2923, e 2962 cm^{-1} ; e de Rio Claro-SP os picos 679, 1064, 2854 e 2923 cm^{-1} . Entre estes, nas amostras da população de Dourados os picos 1396 e 2923 cm^{-1} foram os mais significativos, já para a população de Rio Claro os picos foram 1064 e 2854 cm^{-1} . Estes quatro picos são atribuídos aos grupos funcionais, O-CH₂, CH₂, CH, e CH₃, respectivamente, provavelmente sendo estes cujas concentrações mais variaram entre as amostras.

DISCUSSÃO

De acordo com os resultados cada amostra das duas populações têm um espectro médio único (Figura 01). As análises estatísticas, de fato, comprovam que a composição cuticular dos diferentes estágios e também as amostras das diferentes populações são significativamente diferentes (Figura 02 e 03, Tab. 01). Como também observado por Paula et al. (2017), com o mesmo tipo de amostras foi possível diferenciar populações e também os estágios de desenvolvimento. Estes resultados levantam a possibilidade de se utilizar uma técnica mais ágil e simples para a obtenção de um resultado similar

quando comparada a técnicas tradicionais, como por exemplo, a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Os 14 grupos funcionais selecionados são representados principalmente por hidrocarbonetos, mas também foi possível identificar aminas e carbonilas como mostra a tabela 1. De fato, Lockey (1988) destacam que além dos HCs há outros compostos tais como ésteres, álcoois, ácidos graxos, parafinas, acilglicerídios, fosfolipídeos e glicolipídeos presentes na cutícula dos insetos. Antonialli- Junior et al. (2007), (2008), Neves et al. (2012), (2013), Bernardi et al. (2014), Bernardi, et al. (2017), Brito et al. (2017), Sguarizi-Antonio et al. (2017) utilizando a mesma técnica também obtiveram maior número de CHCs em detrimento aos outros grupos funcionais no perfil cuticular de insetos sociais. No entanto a variação qualitativa, ou seja, a ocorrência dos grupos funcionais varia nos estudos supracitados de acordo com as espécies, por exemplo, no estudo de Sguarizi-Antonio et al. (2017) os autores encontraram os mesmos grupos funcionais, exceto aos ácidos carboxílicos que foram identificados somente neste estudo.

Os picos em 1650 e 1681 podem ser atribuídos à presença de alcenos. Os alcenos já foram também encontrados em amostras de vários estudos (Ferveur & Jallon 1996, Brown et al. 1998, Rouault et al. 2004) e parecem estar mais relacionados com a comunicação química (Gibbs 2002). Além disso, utilizando a técnica de FTIR-PAS Tofolo et al. (2014) estudando a formiga *Ectatomma opaciventre* também encontraram o pico 1650, e por meio da discriminação destes espectros os autores confirmaram o comportamento de polidomia desta espécie. De fato, Paula et al. (2017) utilizando CG-EM para analisar os CHCs presentes nos estágios de desenvolvimento de *C. megacephala* também identificaram alcenos, reforçando dessa forma, a confiabilidade da técnica.

O pico em 1241 pode estar associado à presença de ácidos carboxílicos. Este pico também foi observado nos estudos de Guimarães et al. (2016) em amostras de cutículas de aranhas e por Tolofo et al. (2014) e Bernardi et al. (2017) em amostras de cutículas de formigas. É fato que os lipídios estão presentes na cutícula das diversas espécies de insetos (Ramsay 1935, Wigglesworth 1945, Beament 1945, Blomquist & Bagnères 2010) e que executam papel fundamental na impermeabilização (Ramsay 1935) e comunicação química (Goodrich 1970, Blomquist e Bagnères 2010).

Já os picos 1519 e o 1542 podem estar associados a presença de amidas de aminoácidos presentes na cutícula. Além dos aminoácidos serem os precursores de

alguns hidrocarbonetos cuticulares (Blomquist e Bagnères, 2010), eles também têm sido utilizados para diferenciação de espécies de moscas necrófagas de importância forense, atuando desta forma, como ferramenta taxonômica (Giffen et al. 2017).

A intensidade destes picos selecionados varia entre os estágios de desenvolvimento, o que sugere uma variação quantitativa de suas composições químicas. Paula et al. (2017) também encontraram diferenças significativas entre a composição química cuticular entre os diferentes estágios de desenvolvimento e entre as amostras destas mesmas populações. Além disso, outros estudos avaliando os estágios de desenvolvimento de moscas como de Goodrich (1970) com *L. cuprina*, Arnold & Regnier (1975) com *Sarcophaga bullata*, Zhu et al. (2006) com *C. rufifacies*, Golebiowski et al. (2012) com *Lucilia sericata* e Xu et al. (2014) com *Aldrichina grahami* reforçam a possibilidade dos compostos cuticulares atuarem como uma ferramenta para distinção dos estágios de desenvolvimento, no entanto, todos estes estudos utilizaram como suporte, a técnica mais usual, a cromatografia gasosa.

Por outro lado, Simões et al. (2015) avaliando amostras da formiga *Camponotus atriceps*, e Guimarães et al. (2016) amostras de diferentes estágios da aranha *Latrodectus geometricus* também conseguiram encontrar diferenças significativas entre o perfil cuticular utilizando o FTIR-PAS.

Os gráficos de dispersão (Figs. 02 e 03) mostram que há maior sobreposição entre as amostras dos 3 estágios larvais, de forma geral nas duas populações com pequena exceção das amostras do primeiro instar larval da população de São Paulo. Em moscas, os estágios larvais necessitam ser menos susceptíveis a dessecação (Gibbs et al. 1997), já que sua cutícula é menos esclerotizada (Chapman 2002). Isto indica que imaturos de moscas, de diferentes ínstaes necessitam de uma composição química similar capaz de suprir suas necessidades fisiológicas. As larvas de último instar de Diptera ciclorreférica estabilizam a composição de sua cutícula no último instar para formar um pupário duro e protetor como o primeiro estágio no processo de pupação (Andersen et al. 1996). De fato, pupas e adultos vivem em ambientes mais secos, o que torna necessário ao indivíduo maior impermeabilização (Zhu et al. 2006). Assim, é possível afirmar que os diferentes estágios de desenvolvimento sofrem diferentes influências de seu ambiente de desenvolvimento, o que provoca alterações nos compostos presentes na cutícula, caracterizando desta forma, cada estágio de desenvolvimento (Xu et al. 2014).

Os resultados das análises também comprovam que há diferenças significativas entre as composições químicas cuticulares entre as amostras das populações estudadas. Chapman et al. (1995) analisando a espécie *Schistocerca shoshone* de seis localidades diferentes no sudoeste dos Estados Unidos, Carlson et al. (2001) estudando o perfil de HCs do muscídeo de importância forense *Hydrotaea aenescens* e Paula et al. (2017) com a mosca varejeira *C. megacephala*, também encontram diferenças significativas entre as populações avaliadas, no entanto, utilizaram a técnica cromatográfica. Ainda que exista uma tendência dos perfis cuticulares serem espécie-específicos, há vários mecanismos que podem modular estes compostos, pois populações geográficas podem sofrer alterações tanto quali como quantitativas dependendo das condições a qual estão submetidas (Howard & Blomquist 2005). Por exemplo, um estudo de Ferveur & Jallon (1996) ao estudar *Drosophila melanogaster* encontraram nos machos variação geográfica nos HCs das populações próximas ao equador. Para Chapman et al. (1995) os HCs tem uma relação direta com o clima, pois os autores encontraram que os compostos de populações onde apresentam maiores temperaturas tiveram maior proporções de alcanos lineares em detrimento dos demais, fato este justificado devido aos compostos lineares estarem mais ligados a prevenção contra dessecação.

O fato de serem encontradas diferenças significativas entre amostras de diferentes populações tem um impacto importante para as periciais forenses, no tocante a solucionar qual o local onde ocorreu o crime ou casos de translocação e/ou ocultação de cadáveres, como já discutido (Paula et al. 2017). Estes resultados corroboram os de Paula et al. (2017) que encontraram os mesmos resultados com os mesmos tipo de amostras, no entanto, usando a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), mostrando que a técnica de FTIR-PAS também é útil para avaliar diferenças entre os perfis químicos de amostras de moscas de interesse forense.

A possibilidade de traçar um perfil químico específico para qualquer estágio pode auxiliar de forma efetiva as investigações criminais, visto que, não há a necessidade de criação nem de identificação morfológica, agilizando as investigações periciais (Moore et al. 2014). Diferenças intraespecíficas destes compostos vêm sendo descritas com sucesso por estudos como os de Goodrich (1970), Arnold & Regnier (1975), Zhu et al. (2006, 2007), Ye et al. (2007) e Moore et al. (2013, 2014), durante o desenvolvimento das moscas. No entanto, nenhum destes estudos utilizaram técnica de FTIR-PAS, a qual apresenta uma clara vantagem quando o objetivo é avaliar se existem

diferenças deste tipo entre as amostras, sem a pretensão de avaliar quais são os compostos responsáveis por estas diferenças.

Além disso, a técnica FTIR-PAS não requer preparo das amostras, que em outras técnicas além de onerar bastante as análises, requer um tempo relativamente maior. Outra vantagem desta técnica é que pode-se realizar análises em materiais de tamanho reduzido e de grande fragilidade, como os materiais biológicos (Greene et al. 1992, Skoog et al. 2002), características muito importantes para as ciências forenses, pois a agilidade na obtenção dos resultados é a chave para chegar a maior confiabilidade possível na solução de um crime (Oliveira-Costa 2013).

De acordo com os resultados, por meio das análises de FTIR-PAS, é possível detectar diferenças significativas, de forma confiável como outras técnicas, tanto entre os diferentes estágios, quanto em relação a amostras provenientes das duas populações. Portanto, comprovou-se a eficiência da técnica para responder questões de interesse forense, uma vez que não demanda muito tempo para preparo e a análise das amostras se torna uma ferramenta útil para uso em perícias forenses, sobretudo aquelas que requererem o menor tempo possível para se chegar aos resultados que possam levar a solução de um crime.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect). Os autores também agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (WFAJ concessão número 307998/2014-2), (número de concessão CALC 307998/2014-2).

REFERÊNCIAS

- Andersen, S. O., Peterf, M. G, and P. Roepstorjf. 1996.** Cuticular Sclerotization in Insects. *Comp Biochem Physiol.* 113B(4): 689-705.
- Amendt, J., R. Krettek, C. Niess, R. Zehner, and H. Bratzke. 2000.** Forensic entomology in Germany. *Forensic Sci. Int.* 113(1): 309-314.
- Antonialli-Junior, W. F., S. M. Lima, L. H. C. Andrade, and Y. R. Suárez. 2007.** Comparative study of the cuticular hydrocarbon in queens, workers and males of *Ectatomma vizottoi* (Hymenoptera, Formicidae) by Fourier transform-infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Biol.* 6(3): 492-499.
- Antonialli-Junior, W. F., Y. R. Suárez, T. Izida, L. H. C. Andrade, and S. M. Lima. 2008.** Intra-and interspecific variation of cuticular hydrocarbon composition in two *Ectatomma* species (Hymenoptera: Formicidae) based on Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy. *Genet. Mol. Biol.* 7(2): 559-566.
- Arnold, M. T., and F. E. Regnier. 1975.** A developmental study of the cuticular hydrocarbons of *Sarcophaga bullata*. *J. Insect Physiol.* 21(11): 1827-1833.
- Barbosa, R. R., M. V. Braga, G. J. Blomquist, and M. M. D. C. Queiroz. 2017.** Cuticular hydrocarbon profiles as a chemotaxonomic tool for three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) of forensic interest. *J. Nat. Hist.* 51(25-26): 1491-1498.
- Beament, J. W. L. 1945.** The cuticular lipoids of insects. *J. Exp. Biol.* 21: 115-131.
- Benecke, M. 2001.** A brief history of forensic entomology. *Forensic Sci. Int.* 120(1): 2-14.
- Bernardi, R. C., E. L. B. Firmino, M. C. Pereira, L. H. C. Andrade, C. A. L. Cardoso, Y. R. Suárez, W. F. Antonialli Jr, and S. M. Lima. 2014.** Fourier transform infrared photoacoustic spectroscopy as a potential tool in assessing the role of diet in cuticular chemical composition of *Ectatomma brunneum*. *Genet. Mol. Res.* 13(4): 10035-10048.
- Bernardi, R. C., E. L. B. Firmino, A. Mendonça, D. Sguarizi-Antonio, M. C. Pereira, L. H. Cunha Andrade, and S. M. Lima. 2017.** Intraspecific variation and influence of diet on the venom chemical profile of the *Ectatomma brunneum* Smith (Formicidae) ant evaluated by photoacoustic spectroscopy. *J Photochem Photobiol B Biol.* 175: 200-206.

- Bernhardt, V., W. Pogoda, M. A. Verhoff, S. W. Toennes and J. Amendt. 2017.** Estimating the age of the adult stages of the blow flies *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) by means of the cuticular hydrocarbon n-pentacosane. *Sci. Justice.* 57(5): 361-365.
- Blomquist, G. and A. G. Bagnères. 2010.** Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry and chemical ecology. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Braga, M. V., Z. T. Pinto, M. M. Carvalho Queiroz, and G. J. Blomquist. 2016.** Effect of age on cuticular hydrocarbon profiles in adult *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci. Int.* 259: e37-e47.
- Brito, J. H. S., W. F. Antonialli-Junior, T. S. Montagna, A. Mendonça, D. Sguarizi-Antonio, Y. R. Suárez, and C. A. L. Cardoso. 2017.** Linear Alkanes and Reproductive Status of *Polistes versicolor* (Hymenoptera: Vespidae) Females in Winter Aggregates. *Sociobiology* 64(3): 327-333.
- Brown, W. V., R. Morton, M. J. Lacey, J. P. Spradbery, and R. J. Mahon. 1998.** Identification of the geographical source of adults of the Old World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve (Diptera: Calliphoridae), by multivariate analysis of cuticular hydrocarbons. *Comp. Biochem. Physiol B: Biochem. Mol. Biol.* 119(2): 391-399.
- Carvalho, L. M. L. and A. X. Linhares. 2001.** Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. *J. Forensic Sci.* 46: 604–608.
- Carvalho, C. J. B. D., and C. A. D. Mello-Patiu. (2008).** Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia.* 52(3): 390-406.
- Catts, E. P., and N. H. Haskell. 1991.** Entomology and death: a procedural guide. Joyce's Print Shop, Clemson, South Carolina.
- Catts, E. P., and M. L. Goff. 1992.** Forensic entomology in criminal investigations. *Ann. Rev. Entomol.* 37(1): 253-272.
- Centeno, N., M. Maldonado, and A. Oliva. 2002.** Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires province (Argentina). *Forensic Sci. Int.* 126(1):63-70.
- Chapman, T. 1992.** A cost of mating with males that do not transfer sperm in female *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol.* 38: 223–227.

- Chapman, R. F., K. E. Espelie, and G. A. S Word. 1995.** Use of cuticular lipids in grasshopper taxonomy: a study of variation in *Schistocerca shoshone* (Thomas). *Biochem. Syst. Ecol.* 23(4): 383-398.
- Cunha, D. A. S., R. S. T. Menezes, M. A. Costa, S. M. Lima, L. H. C. Andrade, and W. F. Antonialli-Jr. 2017.** Integrated Analyses of Cuticular Hydrocarbons, Chromosome and mtDNA in the Neotropical Social Wasp *Mischocyttarus consimilis* Zikán (Hymenoptera, Vespidae). *Neotrop Entomol.* 46(6): 642–648.
- Ebbs, M. L., and H. Amrein. 2007.** Taste and pheromone perception in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Pflugers Arch – Eur. J. Physiol.* 454(5): 735–747.
- Ferveur, J. F., and J. M. Jallon. 1996.** Genetic control of male cuticular hydrocarbons in *Drosophila melanogaster*. *Genet Res.* 67: 211–218.
- Frere, B., F. Suchaud, G. Bernier, F. Cottin, B. Vincent, L. Dourel, A. Lelong, and P. Arpino. 2014.** GC-MS analysis of cuticular lipids in recent and older scavenger insect puparia. An approach to estimate the postmortem interval. *Anal. Bioanal. Chem.* 406:1081.
- Gibbs, A. G., A. K. Chippindale, and R. R. Michael. 1997.** Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 200: 1821–1832.
- Gibbs, A. G. 2002.** Lipid melting and cuticular permeability: News insights into an old problem. *J. Insect. Physiol.* 48: 391–400.
- Gibbs, A., and T. A. Mousseau. 1994.** Thermal acclimation and genetic variation in cuticular lipids of the lesser migratory grasshopper (*Melanoplus sanguinipes*): effects of lipid composition on biophysical properties. *Physiol. Zool.* 67(6): 1523–1543.
- Gibbs, A., and J. G. Pomonis. 1995.** Physical properties of insect cuticular hydrocarbons: the effects of chain length, methyl-branching and unsaturation. *Comp Biochem Physiol B: Biochem. Mol. Biol.* 112(2): 243–249.
- Giffen, J. E.; J. Y. Rosat, C. M. Longo, and R. A. Musah. 2017.** Species Identification of Necrophagous Insect Eggs Based on Amino Acid Profile Differences Revealed by Direct Analysis in Real Time High Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 89: 7719–7726.
- Golebiowski, M., M. Paszkiewicz, A. Grubba, D. Gąsiewska, M. I. Boguś, E. Włóka, W. Wieloch, and P. Stepnowski. 2012.** Cuticular and internal n-alkane composition of *Lucilia sericata* larvae, pupae, male and female imagines:

- application of HPLC-LLSD and GC/MS-SIM. *Bull. Entomol. Res.* 102(4): 453-460.
- Goodrich, B. S. 1970.** Cuticular lipids of adults and puparia of the Australian sheep blowfly *Lucilia cuprina* (Wied.). *J. Lipid. Res.* 11(1): 1-6.
- Greenberg, B. 1991.** Flies as forensic indicators. *J. Med. Entomol.* 28(5): 565-577.
- Greene, R. V.; S. H. Gordon, M. A. Jackson, G. A. Bennett. 1992.** Detection of fungal contamination in corn: potential of PAS-FTIR and DRS. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1144-1149.
- Guillem, R. M., F. P. Drijfhout, and S. J. Martin. 2012.** Using chemo-taxonomy of host ants to help conserve the large blue butterfly. *Biol. Conserv.* 148(1): 39-43.
- Guimarães, I. C., C. A. L. Cardoso, S. M. Lima, L. H. Cunha Andrade, and W. F. A. Antonialli-Junior. 2016.** Chemical signals might mediate interactions between females and juveniles of *Latrodectus geometricus* (Araneae: Theridiidae). *Behav. Process.* 126: 27-35.
- Hart, A. J., A. Whitaker, and M. Hall. 2008.** The use of forensic entomology in criminal investigations: how it can be of benefit to SIOs. *J. Homicide Major Incident Investig.* 4(1): 37-48.
- Howard, R.W. and G. J. Blomquist. 2005.** Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. *Ann. Rev. Entomol.* 50, 371-393.
- Jordaens, K., G. Sonetrichet, R. Dupont, E. Braet, and Y. S. Desmyter. 2013.** Identification of forensically important *Sarcophaga* species (Diptera: Sarcophagidae) using the mitochondrial COI gene, *Int. J. Legal Med.* 127: 491-504.
- Kranz, W., C. Carroll, D. A. Dixon, J. V. Goodpaster, and C. J. Picard. 2017.** Factors Affecting Species Identifications of Blow Fly Pupae Based upon Chemical Profiles and Multivariate Statistics. *Insects*, 8(2): 43.
- Kruger, E. L., C. D. Pappas, and R. Howard. 1991.** Cuticular hydrocarbon geographic variation among seven North America populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 28: 859-864.
- Lin-Vien, D., N. B. Colthup, W. G. Fateley, and J. G. Grasselli. 1991.** The handbook of infrared and Raman characteristic frequencies of organic molecules. Elsevier. 503.
- Lockey, K. H. 1988.** Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. *Comp Biochem Physiol B.* 89: 595-645.

- Manly, B. J. F. 2008.** Métodos estatísticos multivariados: uma introdução, 3rd ed. Bookman, Porto Alegre, RS.
- Moore, H. E., C. D. Adam, and F. P. Drijfhout. 2013.** Potential use of hydrocarbons for aging *Lucilia sericata* blowfly larvae to establish the postmortem interval. *J. Forensic Sci.* 58(2): 404–412.
- Moore, H. E., C. D. Adam, and F. P. Drijfhout. 2014.** Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. *Forensic Sci. Int.* 240, 48–53.
- Moore, H. E., J. L. Pechal, M. E. Benbow, and F. P. Drijfhout. 2017.** The potential use of cuticular hydrocarbons and multivariate analysis to age empty puparial cases of *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata*. *Sci Rep* 7:1933.
- Nelson, L. A., J. F. Wallman, and M. Dowton. 2008.** Identification of forensically important *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) species using the second ribosomal internal transcribed spacer (ITS2). *Forensic Sci. Int.* 177(2): 238–247.
- Neves, E. F., L. H. C. Andrade, Y. R. Suarez, S. M. Lima, W. F. Antonialli-Junior. 2012.** Age-related changes in the surface pheromones of the wasp *Mischocyttarus consimilis* (Hymenoptera: Vespidae). *Genet. Mol. Rs.* 11: 1891–1898.
- Neves, E. F., T. S. Montagna, L. H. Andrade, Y. R. Suárez, S. M. Lima, and W. F. Antonialli-Jr. 2013.** Social parasitism and dynamics of cuticular hydrocarbons in paper wasps of the genus *Mischocyttarus*. *J. Kans. Entomol. Soc.* 86(1): 69–77.
- Oliveira-Costa, J. 2013.** Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios. 3.ed. São Paulo: Editora Millennium. 502p.
- Paula, M. C., W. F. Antonialli-Junior, A. Mendonça, K. B. Michelutti, A. D. Eulalio, C. A. L. Cardoso, T. Lima, and C. J. Von Zuben. 2017.** Chemotaxonomic Profile and Intraspecific Variation in the Blow Fly of Forensic Interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). *J. Med. Entomol.* 54: 14–23.
- Pechal, J. L., H. Moore, F. Drijfhout, and M. E. Benbow. 2014.** Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: A promising tool for forensic entomology. *Forensic. Sci. Int.* 245: 65–71.
- Quinn, G. P., and M. J. Keough. 2002.** Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press.

- Ramsay, J. A. 1935.** The evaporation of water from the cockroach. *Indian J Exp Biol.* 12: 373-383.
- Rouault, J. D., C. Marican, C. Wicker-Thomas, and J. M. Jallon. 2004.** Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature; a model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. simulans*. *Genética.* 120: 195–212.
- Roux, O., C. Gers, and L. Legal. 2006.** When, during ontogeny, waxes in the blowfly (Calliphoridae) cuticle can act as phylogenetic markers. *Biochem. Sys. Ecol.* 34: 406–416.
- Sguarizi-Antonio, D., V. O. Torres, E. L. Firmino, S. M. Lima, L. H. Andrade, and W. F. Antonialli-Junior. 2017.** Observation of intra-and interspecific differences in the nest chemical profiles of social wasps (Hymenoptera: Polistinae) using infrared photoacoustic spectroscopy. *J Photochem Photobiol B Biol.* 176: 165-170.
- Skoog, D. A., F. J. Holler, T. Nieman. 2002.** *Princípios de Análise Instrumental.* 5ª ed. Porto Alegre: Bookman. 836 p.
- Smith, K. G. V. A. 1986.** *A Manual of forensic entomology.* Trustees of the British Museum(Natural History), London, England.
- Smith, B. C. 1999.** *Infrared spectral interpretation: a systematic approach.* Boca Raton, Florida: CRC Press. 288 p.
- Simões, M. R. 2015.** Caracterização morfoquímica de adultos da formiga *Camponotus atriceps* Smith, 1858 (Hymenoptera, Formicidae) invasoras de colmeias de *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae).
- Sperling, F. A., G. S. Anderson, and D. A. Hickey. 1994.** A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci.* 39(2), 418-427.
- Stevens, J., and R. Wall. 2001.** Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci. Intl.* 120: 116–123.
- Tofolo, V. C., E. Giannotti, E. F. Neves, L. H. Andrade, S. M. Lima. Y. R. Suárez, and W. F. Antonialli-Junior 2014.** Polydomy in the ant *Ectatomma opaciventre*. *J. Insect Sci.* 14(1).
- Wells, J. D., R. Wall, R. and J. R. Stevens. 2007.** Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *Int. J. Leg. Med.* 121(3): 229.

- Wigglesworth, V. B. 1945.** Transpiration through the cuticle of insects. *J. Exp. Biol.* 21: 97-114.
- Xu, H., G. Y. Ye, Y. Xu, C. Hu, and G. H. Zhu. 2014.** Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci. Int.* 242: 236–241.
- Ye, G., K. Li, J. Zhu, G. Zhu, and C. Hu. 2007.** Cuticular hydrocarbon composition in pupal exuviae for taxonomic differentiation of six necrophagous flies. *J. Med. Entomol.* 44: 450–456.
- Zhu, G. H., G. Y. Ye, C. Hu, X. H. Xu, and K. Li. 2006.** Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. *Med. Vet. Entomol.* 20: 438–444.
- Zhu, G-H., X. H. Xu, X. J. Yu, Y. Zhang, and J. F.Wang. 2007.** Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. *Forensic Sci Int.* 169: 1–5.
- Zhu, G. H., Z. J. Jia, X. J. Yu., K. S. W, L. S. Chen, J. Y. Lv, and M. E. Benbow. 2017.** Predictable weathering of puparial hydrocarbons of necrophagous flies for determining the postmortem interval: a field experiment using *Chrysomya rufifacies*. *Int J Legal Med.* 131: 1–10.

TABELA

Tabela 1. Relação dos 14 principais grupos funcionais e seus respectivos modos de vibração selecionados a partir do perfil químico cuticular obtido por FTIR-PAS para análise estatística. #picos significativos para a população de Dourados-MS; *picos significativos para a população de Rio Claro-SP.

Pico	Comprimento de ondas (cm⁻¹)	Grupo funcional	Modo vibracional
1*	679	CH	Deformação do anel
2	849	CH	Substituição do anel
3*	1064	CH	Dobramento
4	1241	CH ₃ -CO	Estiramento simétrico
5#	1396	O-CH ₂	Torção fora do plano
6	1457	O-CH ₂	Tesoura
7	1519	NH	Dobramento
8#	1542	NH e/ ou CN (Amida II)	Torção no plano e/ou estiramento assimétrico
9	1650	C=O	Banda de combinação do Anel
10	1681	C=C	Estiramento
11*	2854	CH-CH ₃	Estiramento simétrico
12#*	2923	CH-CH ₂	Estiramento assimétrico
13#	2962	CH ₃	Estiramento assimétrico
14	3417	NH	Estiramento simétrico

FIGURAS

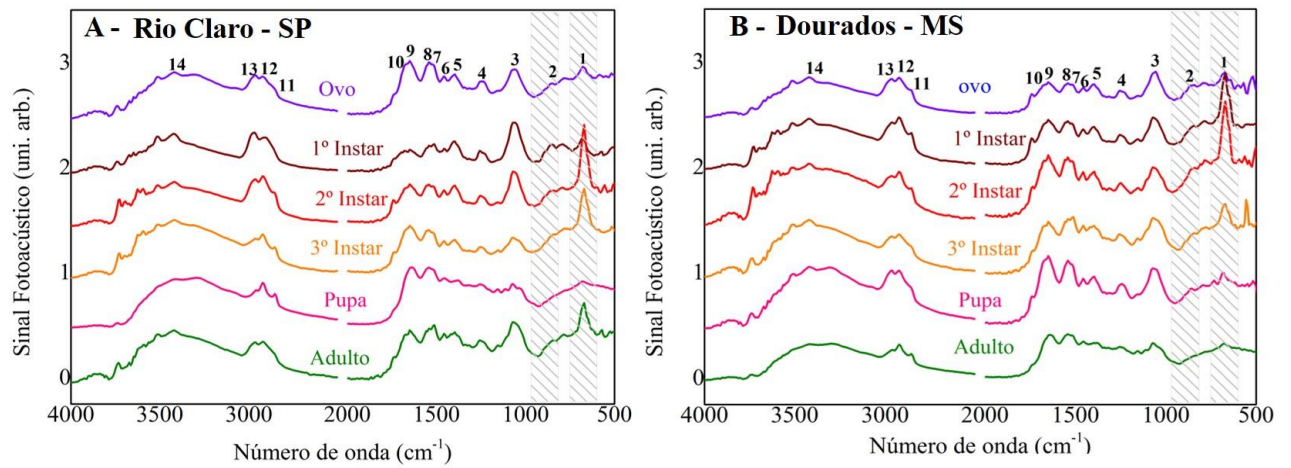


Figura 1. Espectros médios de *Chrysomya megacephala* das populações de Rio Claro-SP (a) e Dourados-MS (b) gerados por FTIR-PAS, com a indicação dos 14 picos de maior relevância para as análises estatísticas.

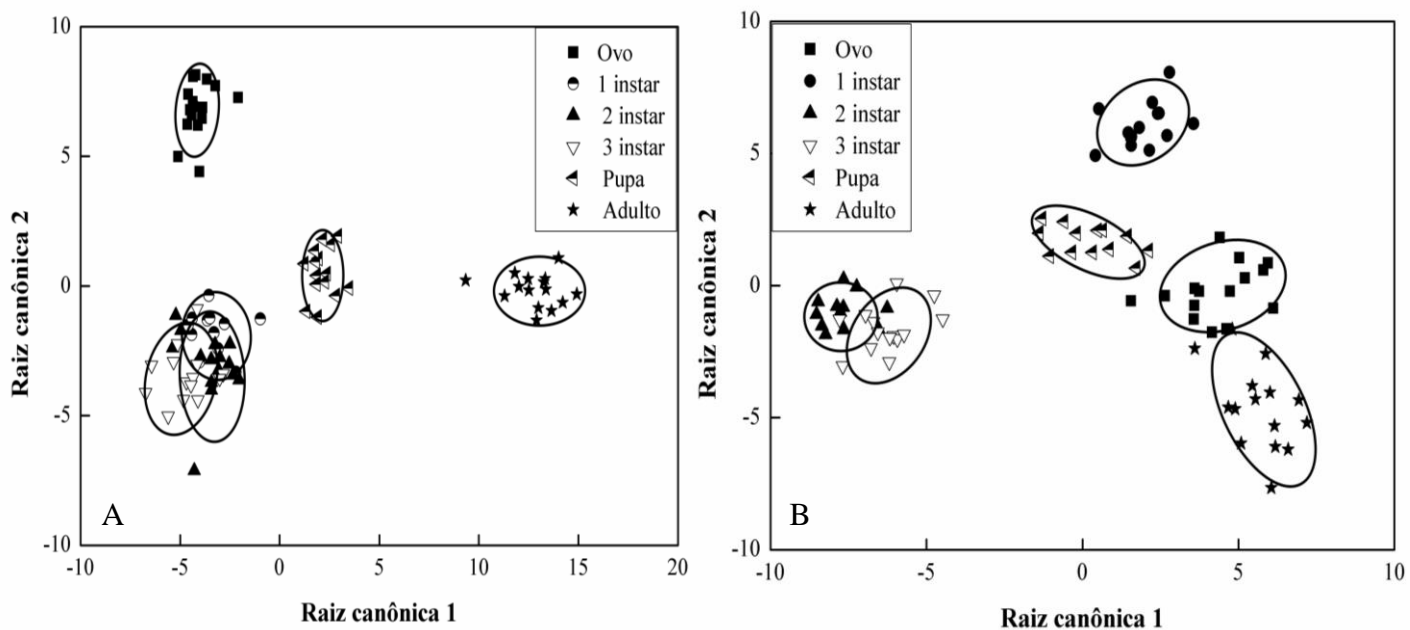


Figura 2. Gráfico de dispersão mostrando a diferenciação do perfil químico cuticular por FTIR-PAS, de acordo com os estágios de desenvolvimento da mosca *Chrysomya megacephala* da população de Dourados-MS (A) e população de Rio Claro-SP (B).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com nossos resultados os compostos químicos cuticulares da espécie *C. megacephala* podem ser usados como ferramenta para ajudar a determinar o IPM e o local do crime, ou eventual deslocamento do cadáver.

Os compostos de pupários também são uteis para determinar quantas ondas de oviposição podem ter agido sobre carcaças o que pode ter consequência direta na determinação do IPM.

O uso a técnica de FTIR-PAS mostrou-se confiável para avaliar diferenças entre os perfis químicos cuticulares de amostras de mosca de interesse forense. Como é uma técnica mais ágil do que as usais isto tem uma implicação importante sobre a obtenção de resultados mais rápidos para uso na perícia forense, sobretudo, a determinação do IPM e, conseqüentemente para solução de um crime.

De fato, todos nossos resultados ajudam a comprovar que os compostos químicos cuticulares podem ser usados como ferramenta auxiliar para obtenção de dados de forma mais ágil, aumentando as chances para solucionar crimes.