



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

**ENTOMOLOGIA FORENSE DA VIDA SELVAGEM:
MORFOLOGIA COMPARADA DE ESTÁDIOS IMATUROS E
ADULTOS DE CALLIPHORIDAE RECOLHIDOS EM CADÁVERES
DE FAUNA SELVAGEM.**

Neiva Amenelique Gonçalves Centeio

MESTRADO EM ECOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

Lisboa, 2011



UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL

**ENTOMOLOGIA FORENSE DA VIDA SELVAGEM: MORFOLOGIA
COMPARADA DE ESTÁDIOS IMATUROS E ADULTOS DE
CALLIPHORIDAE RECOLHIDOS EM CADÁVERES DE FAUNA
SELVAGEM.**

Dissertação orientada por:
Prof. Doutora Maria Teresa Rebelo (DBA/FCUL)

MESTRADO EM ECOLOGIA E GESTÃO AMBIENTAL

Neiva Amenelique Gonçalves Centeio

Lisboa, 2011

Dissertação apresentada para a obtenção do
grau de mestre em Ecologia e Gestão Ambiental.
Mestrado em Ecologia e Gestão Ambiental
Departamento de Biologia Animal da Faculdade
de Ciências da Universidade de Lisboa

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Deus, pelos sopros providenciais de energias positivas durante este ano.

Aos meus pais, criadores das condições necessárias à consolidação da minha formação de base e fornecedores dos fundamentos morais e éticos que guiam minha vida e me permitem valorizar o conhecimento.

Agradeço à Prof. Doutora M^a Teresa Rebelo, minha orientadora, pelo apoio, esclarecimento de dúvidas, disponibilidade, pela correcção e pelas sugestões contribuintes para a realização deste trabalho.

À Ana Farinha por todo apoio, disponibilidade, pelo esclarecimento de dúvidas que foram surgindo ao longo do trabalho, pela companhia e por todo ensinamento que me foi passado neste período.

Ao Mário Boieiro pelo incentivo, disponibilidade e pelas ideias que possibilitaram a realização das armadilhas de isco.

À Joana Seta e ao pessoal do Laboratório de Imagem e Microscopia pela ajuda na utilização dos microscópios.

Agradeço a minha família por me terem ajudado financeiramente e psicologicamente durante a realização do curso e pelo apoio, amor e carinho incondicional.

Ao meu namorado em especial e aos amigos pelo apoio, carinho, amizade.

Agradeço também a todos que não foram mencionados em particular, e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A Entomologia Forense da Fauna Selvagem visa a monitorização das causas de morte de espécies, ou a detecção de maus tratos por negligência em cativeiro viabilizando, deste modo, uma melhor gestão ambiental. Com o presente trabalho pretendo contribuir para um melhor conhecimento da diversidade de Calliphoridae existente em Portugal. Foram identificadas espécies de Califorídeos encontrados em cadáveres de Geneta (*Genetta genetta* (Linnaeus, 1758)); Raposa (*Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758)); Águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo* (Linnaeus, 1758)); Pombo-torcaz (*Columba palumbus* (Linnaeus, 1758)); Pombo doméstico (*Columba livia* (Gmelin 1789)); Coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus 1758)) e Javali (*Sus scrofa* (Linnaeus, 1758)), complementadas com capturas realizadas em armadilhas de iscos para obter uma maior diversidade de espécies e para o estudo dos estádios imaturos.

Foram observadas 12 espécies de Calliphoridae (*Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758); *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794); *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Lucilia illustris* (Meigen, 1826); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda gentilis* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda viridicyanea* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Calliphora loewi* (Enderlein, 1903); *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922) e *Pollenia angustigena* (Wainwright, 1940)).

Foram fotografados exemplares de todas as espécies mencionadas anteriormente. As fotos foram usadas para a elaboração de uma chave dicotómica de identificação da família Calliphoridae em Portugal.

Para o estudo dos estádios imaturos foram feitas comparações entre exemplares das duas espécies mais comuns (*Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*).

Em relação à comparação dos ovos, foi possível, de uma forma qualitativa, distinguir as espécies com base em imagens de microscopia electrónica de varrimento através da terminação do *plastron* e o aspecto das anastomoses. Contudo, os critérios quantitativos, comprimento médio do ovo, da área média e anastomoses, não apresentaram diferenças significativas, revelando assim uma ineficácia como critérios para diferenciar os ovos de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*.

No que diz respeito às larvas e com base na análise das imagens de microscopia óptica, pode concluir-se que a forma do esqueleto cefalo-faríngeo, o arranjo dos tubérculos do espiráculo posterior e a presença/ausência do esclerito oral são critérios eficazes na diferenciação qualitativa. A distância média entre os espiráculos posteriores das larvas foi o único critério estatisticamente viável na diferenciação das duas espécies.

Palavras-chave: Entomologia forense, Calliphoridae, diferenciação morfológica, fauna selvagem

ABSTRACT

The Forensic Entomology of Wildlife aims to monitor the causes of death of species, or the detection of abuse by neglect of the species in captivity, allowing thus a better environmental management. With this work I intend to contribute to a better understanding of diversity of Calliphoridae in Portugal. For this purpose all species of Calliphoridae found in bodies of *Genetta genetta* (Linnaeus, 1758); *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758); (*Buteo buteo* (Linnaeus, 1758); *Columba palumbus* (Linnaeus, 1758); *Columba livia* (Gmelin 1789); *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus 1758) and *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758) were identified. Additional catches were conducted using bait traps in order to obtain a more diversity of species for the study of immature stages.

Twelve species of Calliphoridae were observed: *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758), *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758), *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Lucilia illustris* (Meigen, 1826), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826), *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Melinda gentilis* (Robineau-Desvoidy, 1830), *Melinda viridicyanea* (Robineau-Desvoidy, 1830) , *Calliphora Loewi* (Enderlein, 1903), *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922) and *Pollenia angustigena* (Wainwright, 1940).

The species collected were photographed and used in the making of an identification key. To study the immature stage, comparisons were made between the two most common species (*Calliphora vicina* and *Lucilia sericata*). In respect to the eggs, it was possible to distinguish this two species based on images from scanning electron microscopy by comparing

qualitative criteria like the termination of the plastron and the appearance of anastomosis. However, for the quantitative criteria such as the length of the egg, the length of the anastomosis and the length of the median area, statistical analysis didn't reveal significant differences.

Regarding the larvae, having used optical microscopy images, was possible to conclude that the shape of the cephaloskeleton, the arrangement of the anal tubercles and the presence / absence of the oral sclerite were an accurate way to distinguish the two species. The distance between the posterior spiracles was the only quantitative variable statistically capable of differentiate the two species.

Keywords: Forensic entomology, Calliphoridae, morphological differentiation, wildlife

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
I	
. INTRODUÇÃO	1
I.1. Entomologia forense	1
I.2. Entomologia Forense da Vida Selvagem	2
I.3. Importância de Diptera Calliphoridae em Entomologia Forense	5
I.4. Caracterização Geral, Biologia e Ecologia de Calliphoridae	6
I.5. Objectivos	7
.....	9
II	
. MATERIAIS E MÉTODOS	9
II.1. Exemplares estudados.	9
II.2. Manutenção em laboratório de Calliphoridae.	10
II.3. Estudo comparativo das diferentes espécies de Calliphoridae com interesse forense: Adultos e estádios imaturos.	11
II.3.1. Estudo comparativo dos adultos	12
II.3.2. Estudo comparativo dos estádios imaturos de <i>C. vicina</i> e <i>L. sericata</i>	13
II.3.2.1. Preparação das amostras para observação ao microscópio electrónico de varrimento (ovos) e ao microscópio óptico (larvas).	14
II.3.2.1.1. Preparação dos ovos para MEV.	15
II.3.2.1.2. Preparação das larvas para MO.	16
.....	18
III	
. RESULTADOS	18
III.1. Espécies de Calliphoridae identificadas.	18
III.1.1. Espécies recolhidas em cadáveres de animais selvagens.	18
III.1.2. Espécies recolhidas em armadilhas de isco.	19
III.1.2.1. Ciclo de vida de <i>Calliphora vicina</i> e <i>Lucilia sericata</i>	20
III.2. Contribuição para a elaboração de uma base de dados	21
III.2.1. Características diagnosticantes de adultos de Calliphoridae de importância forense.	22
III.2.2. Características diagnosticantes de ovos de Calliphoridae de interesse forense	25
III.2.2.1. Aspectos morfológicos dos ovos de <i>Calliphora vicina</i>	25
III.2.2.2. Aspectos morfológicos dos ovos de <i>Lucilia sericata</i>	27
III.2.3. Características diagnosticantes de larvas de Calliphoridae com interesse forense.	30
III.2.3.1. Aspectos morfológicos das larvas de <i>Calliphora vicina</i>	31
III.2.3.2. Aspectos morfológicos das larvas de <i>Lucilia sericata</i>	36

III.3-Chave dicotômica para as espécies de Calliphoridae identificadas neste estudo.	41
.....	49
IV	
.DISCUSSÃO	49
IV.1. Adultos	49
IV.2-Estádios imaturos – Ovo	51
IV.3-Estádios imaturos - Larvas	51
V	54
. CONCLUSÕES	54
.....	56
VI	
.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da criação de <i>Calliphora vicina</i> em laboratório. a) Caixas contendo ovos e larvas; b) pupas; c) gaiolas para criação de adultos e d) caixa de Petri com carne de vaca para postura de ovos (fotos de Neiva Centeio).	11
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Calliphora vicina</i> em laboratório. a) Ovos; b) larvas; c) pupas e d) adulto (foto de Neiva Centeio).	20
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Lucilia sericata</i> . a) Ovos; b) larvas; c) pupas e d) adulto (foto de Neiva Centeio).	21
Figura 4. a) Cabeça de <i>C. vomitoria</i> com detalhe da bucca com cerdas laranja; b) adulto de <i>C. vomitoria</i> (fotos de Neiva Centeio).	23
Figura 5. a) Cabeça de <i>C. vicina</i> com detalhe da bucca laranja; b) adulto de <i>C. vicina</i> (fotos de Neiva Centeio).	23
Figura 6. a) Basicosta de <i>L. sericata</i> ; b) adulto de <i>L. sericata</i> (fotos de Neiva Centeio).	23
Figura 7. a) Cabeça de <i>L. illustris</i> ; b) adulto de <i>L. illustris</i> (fotos de Neiva Centeio).	23
Figura 8. a) Adulto de <i>L. ampullacea</i> ; b) cabeça de <i>L. ampullacea</i> (fotos de Neiva Centeio).	23
Figura 9. Adulto de <i>L. caesar</i> (fotos de Neiva Centeio).	23
Figura 10. a) Cabeça de <i>M. veridicyanea</i> , b) adulto de <i>Melinda veridicyanea</i> (fotos de Neiva Centeio).	24
Figura 11. a) Cabeça de <i>C. albiceps</i> ; b) adulto de <i>C. albiceps</i> (fotos de Neiva Centeio).	24
Figura 12. Adulto de <i>Pollenia rudis</i> (fotos de Neiva Centeio).	24
Figura 13. Adulto de <i>Calliphora loewi</i> (fotos de Neiva Centeio).	24
Figura 14. a) Cabeça de <i>M. gentilis</i> ; b) vista dorsal de Adulto de <i>Melinda gentilis</i> (fotos de Neiva Centeio).	24
Figura 15. a) Vista dorsal de Adulto de <i>Pollenia angustigena</i> ; b) torax de <i>Pollenia angustigena</i> com detalhe das cerdas amarelas (fotos de Neiva Centeio).	24
Figura 16- Imagem do MEV de ovos de <i>Calliphora vicina</i> . (A) vista dorsal do ovo mostrando a área média; (B) região anterior do ovo; (C) ilhas com anastomoses; (D) anastomoses com orifício; (E) região anterior do ovo com a terminação da <i>plastron</i> ; (F); grupo de ovos com detalhe da terminação do <i>plastron</i> ; (G) padrão hexagonal do corion; (H) <i>micropyle</i> (I) terminação do <i>plastron</i> na região posterior (fotos de Neiva centeio).	26
Figura 17- Imagem de MEV de ovos de <i>Lucilia sericata</i> . (A) Padrão hexagonal do corion; (B) região anterior do ovo com o <i>plastron</i> a bifurcar em forma de y; (C) anastomoses com orifício; (D) ilhas com anastomoses;	

(E) região do ovo dentro da área média denominada de ilhas; (F) vista dorsal do ovo (fotos de Neiva Centeio).....	27
Figura 18-Dimensão média dos ovos (azul), área média (verde) e anastomoses (cinza) de <i>Lucilia sericata</i> e <i>Calliphora vicina</i>	29
Figura 19- Morfologia de larva de Calliphoridae. a. áreas fusiformes da larva de terceiro instar (<i>Cochliomyia macellaria</i>), b. anéis de espinhos (<i>C. macellaria</i>), c. anéis de espinhos com uma fracção de 1/2, d. esqueleto cefalo-faríngeo (<i>C. macellaria</i>): d. denticulo, gmd. gancho da mandíbula, md. mandíbula, do. esclerito dental, hyp. esclerito hipofaríngeo, phrm pclp. fragma para clipeal, cv. corno ventral, phrm tnt. fragma tentorial, cd. corno dorsal, arch d. arco dorsal, e. brânquias do espiráculo anterior (<i>Sarconesiopsis magellanica</i>), f. esclerito oral pigmentado (<i>Calliphora vicina</i>), g. botão do espiráculo posterior (<i>Lucilia peruviana</i>), h. processos no segmento caudal (<i>Chrysomya albiceps</i>): TDI. tubérculo dorsal interno, TDM. tubérculo dorsal médio, TDL. tubérculo dorsal lateral, TVL. tubérculo ventral lateral, TVM. tubérculo ventral médio, TVI. tubérculo ventral interno (Florez, & Wolff, 2009).....	31
Figura 20- Larvas de 1º instar de <i>Calliphora vicina</i> observadas ao MEV (A) Larva a eclodir do ovo; (B) larva em vista dorsal; (C) região posterior da larva; (D) segmentos torácicos; (E) espiráculo posterior; (F) espinhos torácicos; (G) detalhe do espiráculo posterior; (H) região anterior da larva (região cefálica) (fotos de Neiva Centeio).	32
Figura 21 - Larvas de 2º instar de <i>Calliphora vicina</i> observadas à lupa. (A) vista lateral; (B) região anterior com a armadura bucal; (C) espiráculo posterior; (D) segmentos torácicos (E) esqueleto cefalo-faríngeo 2º instar) (fotos de Neiva Centeio).	33
Figura 22 - Larvas de 3º instar de <i>Calliphora vicina</i> observadas à lupa. (A) espiráculo posterior; (B) armadura bucal com detalhe do esclerito oral no meio; (C) tubérculos; (D) espiráculo anterior; (E) segmentos torácicos; (F) bandas de espinhos segmentares (fotos de Neiva Centeio). Barra A.a, D e F =200 µm; Barra A, B, C e E=1mm.....	35
Figura 23 - Larvas de <i>Calliphora vicina</i> (3º instar) observadas ao microscópio óptico. (A e B) espiráculo anterior; (C) Vista lateral esqueleto cefalo-faríngeo mostrando os ganchos orais (GO), esclerito oral (EO), esclerito parastomal (EP), cornos dorsais (CD) e os cornos ventrais (CV); (D) espiráculo anterior; (E) bandas torácicas; (F) pormenor de espiráculo posterior (fotos de Neiva Centeio).....	35
Figura 24- Larvas de 1º instar de <i>Lucilia sericata</i> observadas à lupa. (A) Vista dorsal da larva; (B) esqueleto cefalo -faríngeo; (C) espiráculo posterior (fotos de Neiva Centeio).....	36

Figura 25 -Larvas de 2º instar de *Lucilia sericata* observadas à lupa. (A) espiráculo posterior; (B) vista dorsal; (C) segmentos torácicos; (D) esqueleto cefalo-faríngeo; (F) espiráculo anterior (fotos de Neiva Centeio)37

Figura 26- Larvas de 3º instar de *Lucilia sericata* observadas à lupa. (A) bandas de espinhos; (B) espiráculo posterior; (C e G) tubérculos (D) armadura bucal; (E) espiráculo anterior; (F) extremidade anterior e posterior da larva (fotos de Neiva Centeio).....38

Figura 27-larvas de *Lucilia sericata* (3º instar) observadas no microscópio óptico. (A e B) esqueleto cefalo-faríngeo na vista lateral mostrando os ganchos orais (GO), esclerito parastomal (EP), cornos dorsais (CD) e os cornos ventrais (CV); (C) espiráculo posterior; (D) espiráculo anterior; (E) bandas de espinhos; (F) pormenor de espiráculo posterior (fotos de Neiva Centeio). Barra =500 µm.....38

Figura 28- Diâmetro do espiráculo (cinza) e a distância entre os espiráculos posteriores (verde) de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*.....40

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1-Espécies de Calliphoridae colectadas em animais selvagens da Serra da Estrela.	19
Tabela 2-Espécies de Calliphoridae encontradas nas armadilhas de isco (Campo Grande, Sertã e Aroeira)	20
Tabela 3-Tabela comparativa da dimensão (μm) dos ovos, área média e anastomoses de <i>Calliphora vicina</i> e <i>Lucilia sericata</i>	28
Tabela 4-Resultados do teste ANOVA unifactorial para dimensão (μm) dos ovos, área média e anastomoses de <i>Calliphora vicina</i> e <i>Lucilia sericata</i> . ..	29
Tabela 5-Tabela comparativa do comprimento (μm) da Larva, diâmetro dos espiráculos e distância entre os espiráculos posteriores de <i>Lucilia sericata</i> e <i>Calliphora vicina</i>	39
Tabela 6-Resultado do teste ANOVA unifactorial em relação ao comprimento (μm) da larva, ao diâmetro dos espiráculos e à distância entre os espiráculos posteriores de <i>Lucilia sericata</i> e <i>Calliphora vicina</i>	40



■ INTRODUÇÃO

I.1. Entomologia forense

Entomologia forense (EF) é a ciência que estuda o papel dos insectos associados à decomposição de cadáveres sendo um dos usos mais comuns a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) (Mendonca *et al.*, 2008).

O conhecimento resultante do estudo dos insectos associados a cadáveres pode ajudar a determinar uma série de circunstâncias de importância decisiva para a investigação criminal, em particular o IPM (Amendt *et al.*, 2000; Amendt *et al.*, 2004; Anderson, 2004; Donovan *et al.*, 2006; Amendt & Hall 2007) tendo-se desde o início afirmado, por este facto, como uma disciplina – no âmbito da medicina legal – vocacionada para a resolução de homicídios. No entanto, com a aplicação de técnicas elaboradas, os especialistas em entomologia forense podem colectar fortes evidências entomológicas e fornecer informações úteis não só em caso de investigação de morte, como também em casos de deslocações do cadáver, identificação do local onde o crime ocorreu, e ainda em situações de negligência infantil, abuso sexual e identificação de suspeitos (Campobasso & Introna 2001) ou sobre a detecção de drogas e outros produtos tóxicos em tecidos em decomposição (Introna *et al.*, 2001).

O estudo da biologia de insectos necrófagos tem-se revelado útil, não só na perspectiva dos conhecimentos desenvolvidos no âmbito da EF médico-legal, mas também no âmbito da entomotoxicologia, como no caso de investigação da aplicação não controlada de herbicidas e

insecticidas ou da utilização intencional de venenos e, também, no controlo de contaminação química não intencional, assumindo-se, deste modo, os insectos necrófagos como bioindicadores ambientais de maior relevância (Gusmão, 2008).

Dentro da ordem Diptera, estão inseridas as famílias mais relevantes para a EF (Goff, 2001; Gennard, 2007) por nelas se incluírem as espécies pioneiras na colonização de cadáveres (pela sua maior apetência por estados caracterizados por um maior teor de humidade) e destacam-se, pela sua ubiquidade e preponderância, as seguintes: Calliphoridae, onde se incluem as “moscas varejeiras”; Sarcophagidae, compreendendo as espécies vulgarmente conhecidas por “moscas da carne” e Muscidae, da qual fazem parte as moscas domésticas. Ainda na ordem Diptera, mas normalmente de ocorrência mais tardia na colonização de cadáveres, destaca-se a família Piophilidae, onde se inclui a “mosca do queijo” e mais posterior ainda a Sepsidae, ou “mosca necrófaga negra” (Gennard, 2007).

I.2. Entomologia Forense da Vida Selvagem

Actualmente a utilização de insectos necrófagos em investigações criminais está bem documentada (Benecke, 1998). Contudo, existem poucas referências que atribuam importância aos insectos em investigações sobre animais vitimados por crimes que acometem a vida selvagem (Watson, 2003; Watson & Carlton 2005).

Os crimes contra a fauna estão entre os maiores impactos nas populações de animais silvestres, afectando, sobretudo as espécies mais ameaçadas. O tráfico destes animais e a caça ilegal, ao contrário de outros impactos causados pelo homem tem como principais motivações o

desporto, o lazer, a criação de animais de estimação e a confecção de vestuário de pele (Taylor & Dustone 1996; Jaques, 2005).

O uso de venenos e pesticidas tem sido referido em várias partes do mundo como uma causa importante de extinções ou diminuições drásticas de algumas populações de animais selvagens, nomeadamente aves necrófagas. Em Portugal, as referências ao uso de venenos para controlo de animais considerados nocivos remontam ao século XIX e desde essa época que há relatos de vários casos de envenenamento intencional de animais e até de pessoas (Brandão, 2005). Os venenos são usados principalmente para tentar controlar animais considerados nocivos, ou seja, os iscos envenenados são direccionados a predadores das espécies pecuárias e cinegéticas. As espécies-alvo são os Cães (*Canis lupus familiaris*) e Gatos (*Felis silvestris catus*) assilvestrados, Lobos (*Canis lupus signatus*) e mamíferos de pequeno e médio porte, como a Raposa (*Vulpes vulpes*) e o Sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), entre outros. O uso de pesticidas para controlo de roedores e aves silvestres consideradas prejudiciais às actividades agrícolas continua a ser uma prática frequente e pouco controlada, com consequências pouco conhecidas. A mortalidade de animais por envenenamento tem sido pouco estudada em Portugal e por essa razão tem sido subestimada (Álvares, 2003).

A incorporação de evidência entomológica tornou extremamente valiosa na determinação de intervalos pós-morte de animais selvagens capturados ilegalmente, bem como homicídios humanos, suicídios e outras mortes autónomas (Keh, 1985). Entomologistas aplicam os princípios da ecologia de atracção de insectos necrófagos por carne putrefacta, juntamente com a compreensão das suas taxas de desenvolvimento e ciclos de vida, para estimar o tempo mínimo decorrido

desde a morte. Os insectos de maior importância forense são as espécies que estão intrinsecamente associadas à decomposição ou seja, necrófilos (moscas e besouros) (Watson, 2004).

Os critérios entomológicos utilizados na determinação do tempo de morte para os animais mortos na vida selvagem são os mesmos que os aplicáveis a seres humanos. Insectos presentes nas carcaças dos animais selvagens podem proporcionar aos agentes de execução do direito dos animais selvagens, valiosas informações necessárias para incriminar os caçadores furtivos (Watson, 2004; Gonder, 2008), por exemplo.

Alguns animais, em particular, coelhos, porcos, cães e carneiros podem ser vítimas de um ataque de moscas por causa da urina ou material fecal agregado à sua pele, lã, ou quartos traseiros por negligência, mau enjaulamento e condições sanitárias deploráveis. Tais casos são considerados como abuso físico, uma vez que as vítimas são incapazes de remover os ovos ou as larvas (Gennard, 2007).

A entomologia forense é também uma ferramenta auxiliar na área da Veterinária Forense com base no estudo da colonização entomológica de cadáveres da fauna selvagem. A EF da Fauna Selvagem visa a monitorização das causas de morte, ou a detecção de maus tratos por negligência das espécies protegidas (em convalescença ou em cativeiro) viabilizando, deste modo, uma melhor gestão ambiental.

I.3.Importância de Diptera Calliphoridae em Entomologia Forense

Quando um cadáver é encontrado, a evidência entomológica pode ser o único método disponível para estimar o tempo desde sua morte. Todas as actividades do insecto envolvido com um cadáver, invariavelmente, deixam vestígios da sua presença, tais como: tegumento larval, invólucros de pupários vazios e outras provas de metamorfose.

Existem duas abordagens complementares quando os insectos são utilizados como indicadores do intervalo pós-morte. São elas:

1. Reconhecer o estágio de desenvolvimento dos insectos encontrados no cadáver. Este método requer a presença de larvas imaturas para ser possível calcular o tempo de oviposição, a fim de determinar uma estimativa de tempo exacto.
2. Reconhecer a sucessão entomológica no cadáver. Como os insectos colonizam um cadáver de uma forma cronológica previsível, em que a sua presença ou ausência é uma boa indicação do tempo desde a sua morte, este método é muito útil quando os cadáveres são expostos aos artrópodes por períodos superiores a uma semana, mês ou mesmo anos (Smith, 1986; Anderson, 2000; Byrd & Castner 2001).

Entre as espécies de dípteros, as larvas de mosca varejeira são consideradas as melhores ferramentas que os entomólogos forenses usam para estimar o intervalo pós morte. Há cerca de cinquenta espécies destas moscas que foram identificadas como potenciais indicadoras do IPM (Gruner *et al.*, 2007). As Larvas de mosca varejeira têm grande impacto durante os primeiros estágios de decomposição do cadáver (Putman, 1978) e com bons registos de temperatura ambiente, o intervalo pós-

morte pode ser calculado com um erro de apenas algumas horas, mesmo quando a morte possa ter ocorrido 2-3 semanas antes (Meyer, 2007).

I.4. Caracterização Geral, Biologia e Ecologia de Calliphoridae

A ordem Díptera (moscas verdadeiras) é composta por mais de 86 mil espécies conhecidas, uma das maiores da classe Insecta. Cerca de 150.000 espécies de Díptera estão descritos em cerca de 10.000 géneros e 150 famílias, sendo que 132 famílias ocorrem na Europa (Scudder & Cannings 2006). A família Calliphoridae é a maior da ordem Diptera, com mais de 1000 espécies em todo o mundo (Smith, 1986), em que cerca de 115 estão presentes na Europa (Oosterbroek, 2006; Castro, *et al.*, 2009).

Os Califorídeos são encontrados em praticamente todos os nichos. A família é composta por géneros conhecidos como “moscas verde-garrafa” (género *Lucilia*), “moscas azuis” (género *Calliphora*), e “moscas bicheiras” (género *Cochliomyia*), entre outros. A carne putrefacta, excrementos e também carne fresca compõem a maior parte dos recursos alimentares das suas larvas (Hall, 1948).

Os adultos são caracterizados por um par de asas (o segundo par reduzido, chamado haltere), grandes olhos compostos, e armaduras bucais variando de acordo com o substrato sobre o qual se alimentam (Cranston, 2008).

A oviposição é estimulada principalmente pela presença de compostos ricos em amónia, humidade, feromonas e estímulos tácteis (Cragg & Cole 1956; Ashworth & Wall 1994). Os ovos geralmente eclodem em 1-3 dias, dependendo da espécie e condições ambientais (Catts & Haskell 1997). As larvas das moscas crescem rapidamente, passando por três estádios de

desenvolvimento antes de atingir o seu tamanho final. Estes estádios são previsíveis, sendo altamente influenciados pela temperatura e, em menor grau, pela humidade relativa do ar. As larvas crescem juntas, em grandes massas e movimentam-se em torno do corpo promovendo, assim, a disseminação de bactérias e a secreção de enzimas, o que torna possível o consumo dos tecidos moles do cadáver de que se alimentam. O desenvolvimento das larvas leva vários dias dependendo tanto das espécies e das condições ambientais, como do número de indivíduos presentes (Anderson, 2000; Vanegas, 2007).

O comportamento da localização dos hospedeiros ideais para o desenvolvimento das formas imaturas dos califorídeos pode ser afectado por estímulos visuais, tais como azul, branco e amarelo (Wall *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1995).

I.5. Objectivos

O principal objectivo deste trabalho foi recolher informação morfológica de adultos e estádios imaturos de espécies de Calliphoridae (Insecta, Diptera) com interesse forense que permitam uma fácil identificação e diferenciação morfológica através de microscopia electrónica e óptica. O material (registo fotográfico) obtido no estudo dos adultos irá servir para elaboração de uma chave dicotómica de identificação de espécies de Calliphoridae para Portugal. Envolveu estudos de biologia em laboratório (manutenção e estudo da duração dos diferentes estádios larvares; identificação ao nível de espécies dos exemplares e caracterização das diferenças nos ovos, larvas, e adultos) e no campo (recolha de exemplares em armadilhas de isco).

Este trabalho restringiu-se ao estudo de uma única família, a família Calliphoridae, por ser o principal grupo necrófago (Reed, 1958; Silva *et al.*, 2010) e estar entre as mais utilizadas em análises forenses de humanos e de espécies selvagens por apresentar uma distribuição espacial e temporal extremamente específicas, além de responder singularmente a corpos em diferentes estágios de decomposição (Stevens, 2001; Carreira *et al.*, 2008).

A caracterização morfológica para identificação de espécies de larvas e pupas de insectos encontrados em cadáveres é necessária para determinação do intervalo pós morte, sendo assim fundamental o conhecimento das espécies com interesse forense, de forma a servir de ferramentas na resolução de casos de crime contra animais que acontecem na vida selvagem, e de casos de negligência contra animais que se encontram em cativeiro.

Este trabalho fornece apoio à elaboração de uma base de dados nacional de dípteros com interesse forense no âmbito do projecto *Entomologia Forense: Banco de Dados Morfométricos e Moleculares (mtDNA) necessário à identificação de espécies (Diptera e Coleoptera) com interesse forense* (PTDC/SAL-ESA/101228/2008).

II

■ MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. Exemplos estudados.

Os exemplares utilizados neste estudo provieram de animais selvagens da Serra da Estrela e de armadilhas de isco que permitiram a colecta de exemplares na região de Lisboa (presente trabalho) e noutros pontos do país (no âmbito do projecto no qual este trabalho está inserido).

Começou-se por identificar todos os espécimes da família Calliphoridae que povoaram cadáveres de alguns vertebrados (aves e mamíferos) da macrofauna autóctone da Serra da Estrela (usando material recolhido no âmbito do projecto em que este estudo se insere). Foram utilizados cadáveres de Geneta (*Genetta genetta* (Linnaeus, 1758)); de Raposa (*Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758)); de Águia-de-asa-redonda (*Buteo buteo* (Linnaeus, 1758)); de Pombo-torcaz (*Columba palumbus* (Linnaeus, 1758)); Pombo doméstico (*Columba livia* (Gmelin 1789)); de Coelho bravo (*Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus 1758)) e de Javali (*Sus scrofa* (Linnaeus 1958)).

Sendo o principal objectivo a recolha de exemplares de Diptera (Calliphoridae) com hábitos necrófagos, os insectos foram também colectados em diferentes pontos do país (Campo Grande, Aroeira e Sertã) usando armadilhas de isco contendo carne de porco, fígado de porco, e peixe.

II.2. Manutenção em laboratório de Calliphoridae.

Os adultos capturados nas armadilhas foram colocados em frascos com álcool (70%) devidamente etiquetados.

Para a criação de Dípteros, as armadilhas de iscos que apresentaram ovos foram colocados cuidadosamente em caixas com terra/feno e mantidos em laboratório (fig. 1.a) onde pudessem eclodir e as larvas desenvolverem-se até atingirem a fase de pupa (fig. 1.b). As pupas foram depois transferidas para uma gaiola de rede onde ocorreu a emergência dos adultos e confirmação da espécie (fig.1.c). Os adultos foram mantidos à base de água e açúcar à temperatura ambiente a fim de copularem. A criação em laboratório dos espécimes também serviu para o estudo de ciclo de vidas das espécies encontradas.

O objectivo principal era manter os insectos adultos saudáveis para posteriormente colocarem ovos a ser utilizados para o estudo das fases imaturas. Para promover a oviposição das moscas, usou-se carne de porco aquecida, tendo-se obtido bons resultados (fig.1.d).

Alguns ovos foram fixados para observação ao MEV (II.3.2.1.1 e III.2.2) e os restantes foram usados para criação de larvas que foram fotografadas nos seus diferentes estádios de desenvolvimento (III.2.3).

As larvas foram mantidas em caixas com carne à temperatura e humidade ambiente. Ao longo dos seus diferentes estádios de crescimento foram sacrificadas em água destilada aquecida a aproximadamente 70Cº, durante 30s e transferidas para frascos devidamente etiquetados, contendo solução de álcool etílico a 70% (Adams & Hall 2003).

As espécies criadas em laboratório (temperatura e humidade ambiente) foram fotografadas nos seus diferentes estádios de desenvolvimento de forma a ter um registo completo do ciclo de vida.



Figura 1. Etapas da criação de *Calliphora vicina* em laboratório. a) Caixas contendo ovos e larvas; b) pupas; c) gaiolas para criação de adultos e d) caixa de Petri com carne de vaca para postura de ovos (fotos de Neiva Centeio).

II.3. Estudo comparativo das diferentes espécies de Calliphoridae com interesse forense: Adultos e estádios imaturos.

A informação recolhida no total das identificações de adultos foi utilizada na construção de uma chave dicotómica e numa lista de espécies que contribuirá para a base de dados do projecto em que este trabalho se insere.

II.3.1. Estudo comparativo dos adultos

Para uma melhor identificação morfológica é crucial que os espécimes estejam bem conservados mantendo todas as suas características.

A identificação morfológica dos dípteros adultos de interesse forense foi feita através de chaves dicotómicas que se baseiam, preponderantemente, nos padrões de segmentação das antenas, nervuras das asas, distribuição de cerdas, pigmentação do corpo e estrutura da genitália masculina (Oliveira, 2007). Sendo este último carácter o único recurso para a distinção de várias espécies, principalmente dentro da família Sarcophagidae (Carvalho & Mello-Patiu 2008).

Todos os adultos colectados foram identificados à lupa (Olympus SZX7) até a espécie, usando as chaves dicotómicas de dípteros com interesse forense (**a e b**) e Calliphoridae em particular (**c e d**):

a) *Key to families of the European Diptera of forensic importance* (Szpila, 2010).

b) *The European Families of the Diptera identification, diagnosis, biology* (Oosterbroek, 2006).

c) *Key for identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera Calliphoridae) of forensic importance adult* (Szpila, 2010).

d) *Fauna Entomologica Scandinavica volume 24-1991 blowflies (Diptera, Calliphoridae) of Fennoscandia and Denmark* (Rognes, 1991).

II.3.2. Estudo comparativo dos estádios imaturos de *C. vicina* e *L. sericata*

Para este estudo recorreu-se ao microscópio electrónico de varrimento (MEV (Jeol JSM-5200LV)), microscópio óptico (MO (Olympus BX60)) com câmara associada (Olympus DP50) e a máquina fotográfica (Olympus SC30) acoplada à lupa (Olympus SZX7) de forma a obter maior informação morfológica, permitindo assim uma melhor diferenciação entre as espécies.

Os ovos utilizados neste estudo foram obtidos a partir de Dípteros criados no laboratório das instalações do Departamento de Biologia Animal, laboratório de Entomologia da FCUL.

Os ovos resultantes da postura da segunda geração foram utilizados para identificação/diferenciação morfológica no microscópio electrónico de varrimento (MEV). Para cada espécie foi feito um registo fotográfico utilizando em média 40 ovos. As larvas (terceiro estágio de desenvolvimento) foram diferenciadas recorrendo a chaves de identificação, nomeadamente Szpila (2010), ao microscópio óptico através de fotografias feitas em preparações simples e fotografias feitas à lupa com câmara acoplada.

Aplicou-se um teste ANOVA unifactorial para comparar a dimensão dos ovos, o comprimento da área média e o comprimento das ligações entre as ilhas das duas espécies. Relativamente às larvas, a medição dos exemplares foi realizada recorrendo ao programa de tratamento de imagens AnalySIS getIT tendo sido posteriormente aplicado o teste estatístico ANOVA unifactorial para comparar o comprimento das larvas, o tamanho dos espiráculos e a distância entre eles nas duas espécies.

II.3.2.1. Preparação das amostras para observação ao microscópio electrónico de varrimento (ovos) e ao microscópio óptico (larvas).

Para cada espécie foi utilizada uma média de 100 ovos de forma a garantir uma amostra representativa e eliminar o risco de se perder a amostra, visto que, o processo desidratação do ponto crítico é um processo muito delicado que apresenta riscos e alguns ovos podem sofrer deformações.

Apesar de só as larvas do terceiro instar serem utilizadas para diferenciação das espécies, algumas larvas do primeiro e segundo instar foram fotografadas à lupa e ao MEV para servir de auxílio na identificação de todos os estádios. Todas as características morfológicas como: disposição e morfologia dos espiráculos, esqueleto cefalo-faríngeo, tubérculos e espinhos (3º anel torácico) do 3º estágio de desenvolvimento foram fotografadas de forma a permitir a diferenciação entre larvas das duas espécies.

As larvas foram sacrificadas (imersão em água quente (mais de 80 °C) por pelo menos 30s) diariamente numa média de 6 larvas por dia para que depois se pudesse escolher dentre estas as que se apresentassem em melhores condições. As larvas do terceiro instar foram sacrificadas depois de terem abandonado o substrato alimentar (Adams & Hall 2003).

II.3.2.1.1. Preparação dos ovos para MEV.

A utilização do microscópio electrónico de varrimento requer cuidados especiais com a amostra. Devido à condição natural hidratada, a amostra biológica apresenta relativa complexidade de processamento; somente objectos rígidos como sementes, espículas, entre outros, podem ser observados no MEV com um tratamento preliminar mínimo (Silveira, 1989).

Os ovos e as larvas apresentam fragilidade nas estruturas externas tornando-se assim passíveis de deformações por secagem directa, necessitando por isso de ser desidratados utilizando-se um aparelho de “ponto crítico” após o processo de fixação convencional. O procedimento usual segue a ordem: fixação/desidratação/secagem pelo método do “ponto crítico” (Azevedo Filho *et al.*, 2008).

Para fixação dos ovos foi utilizada a solução glutaraldeído (2.5%) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 24 horas. Seguidamente, os ovos foram lavados com o tampão cacodilato de sódio três vezes durante 10 minutos cada lavagem. Posteriormente foram desidratados em banhos de soluções de acetona (30, 50, 70, 80, 95% e 100%) durante 10 minutos cada concentração. Para secagem das amostras no aparelho de “ponto crítico”, foi usando gás carbónico (Castro, 2001; Azevedo Filho *et al.*, 2008; Mendonça *et al.*, 2008).

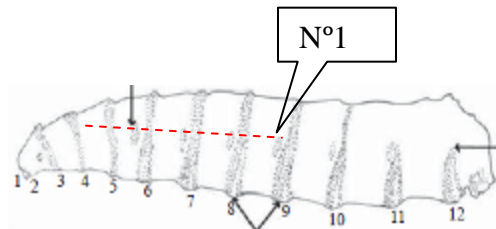
Depois de serem submetidas ao ponto crítico os ovos que apresentavam melhores condições foram coladas em pionéses para serem metalizados e observados ao MEV.

Para auxiliar na diferenciação, os ovos foram fotografadas em diferentes planos, tendo em atenção algumas estruturas cruciais (área média, *plastron*, ilhas, células coriônicas).

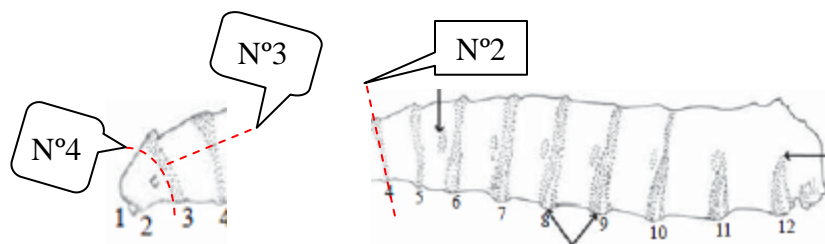
II.3.2.1.2. Preparação das larvas para MO.

As larvas foram submetidas a um processo de preparação que consiste no corte em seis zonas específicas de forma a observar em detalhe as características que permitam diagnosticar a espécie.

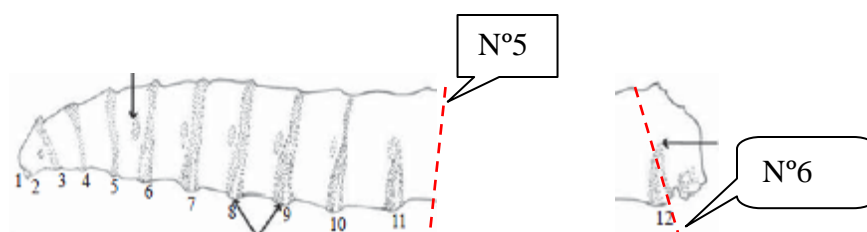
O primeiro corte é feito longitudinalmente a partir do terceiro segmento torácico até o nono segmento. Depois do corte mergulhou-se a larva numa solução de hidróxido de potássio (KOH 3-5%) por 24 horas. Passados os 24 horas colocou-se em água destilada e removeram-se os restos do interior da larva.



O segundo corte é feito na região anterior (três primeiros segmentos torácicos). Depois de separar a parte anterior do resto da exúvia, esta é aberta (3º corte), e com a ajuda de um alfinete e um microscópio óptico separou-se as partes das peças bucais (4º corte).



O quinto corte é feito na parte posterior da larva. Depois de fazer este corte, foi feito um novo corte (6º corte) apenas ao nível do espiráculo posterior e dos tubérculos.



Por fim, as amostras foram preparadas para observações temporárias que consistem unicamente em colocar cada uma das estruturas (esqueleto cefalo-faríngeo, espiráculo anterior, espiráculo posterior e bandas de espinhos torácicos) em lâminas com glicerina (Szpila, 2010).

III

■ RESULTADOS

III.1. Espécies de Calliphoridae identificadas.

III.1.1. Espécies recolhidas em cadáveres de animais selvagens.

Foram identificadas 10 espécies de Calliphoridae nos exemplares que foram colectados em animais selvagens da Serra da Estrela (Tab.1): *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758); *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794); *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Lucilia illustris* (Meigen, 1826); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Calliphora loewi* (Enderlein, 1903); *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922) e *Pollenia angustigena* (Wainwright, 1940).

Tabela 1. Espécies de Calliphoridae colectadas em animais selvagens da Serra da Estrela.

Família	Espécie	Animais selvagens						Nº total de indivíduos
		Águia d'asa redonda	Coelho	Geneta	Javali	Pombo	Raposa	
Calliphoridae	<i>Calliphora vomitoria</i>	2	6	9	1	3	5	26
	<i>Lucilia caesar</i>	2		1	1	1		5
	<i>Pollenia rudis</i>		1				1	2
	<i>Chrysomya albiceps</i>			4			1	5
	<i>Lucilia illustris</i>	2		1				3
	<i>Lucilia sericata</i>			1		2		3
	<i>Calliphora vicina</i>	2	10	5		10	2	29
	<i>Calliphora loewi</i>					2		2
	<i>Lucilia ampullacea</i>	1						1
	<i>Pollenia angustigena</i>						1	1
	<i>L.caesar./L.illustris</i>		3	1	1		1	6
	<i>Pollenia sp.</i>			2		2	8	12

III.1.2 Espécies recolhidas em armadilhas de isco.

Foram identificados 9 espécies em exemplares adultos colectados no campo e que emergiram dos estágios imaturos criados em laboratório (tab.2): *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758); *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Lucilia illustris* (Meigen, 1826); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda gentilis* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda viridicyanea* (Robineau-Desvoidy, 1830) e *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922).

Tabela 2. Espécies de Calliphoridae encontradas nas armadilhas de isco (Campo Grande, Sertão e Aroeira).

Espécies de Calliphoridae	<i>Calliphora vomitoria</i>	<i>Chrysomya albiceps</i>	<i>L.caesar/ilus tris</i>	<i>Lucilia sericata</i>	<i>Calliphora vicina</i>	<i>Melinda viridicyanea</i>	<i>Lucilia ampullacea</i>	<i>Pollenia sp.</i>	<i>Melinda gentilis.</i>	Total
Exemplares capturados	11	32	166	167	281	1	31	2	1	692

III.1.2.1.Ciclo de vida de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*.

O registo do ciclo de vida de *Calliphora vicina* foi feito em laboratório durante o mês de Dezembro de 2010 numa temperatura média de 10°C.

Os ovos (Fig.2.a) encontrados no isco demoraram entre 1 a 2 dias a eclodirem (Fig.2.b). As larvas levaram 7 dias a atingir o terceiro estágio, altura em que abandonaram a carne e começaram a pupar (Fig.2.c). Depois de 5 a 7 dias na forma pupal começaram a eclodir. Os adultos foram mantidos numa gaiola de rede e identificados como pertencentes à espécie *Calliphora vicina* (Fig.2.d).

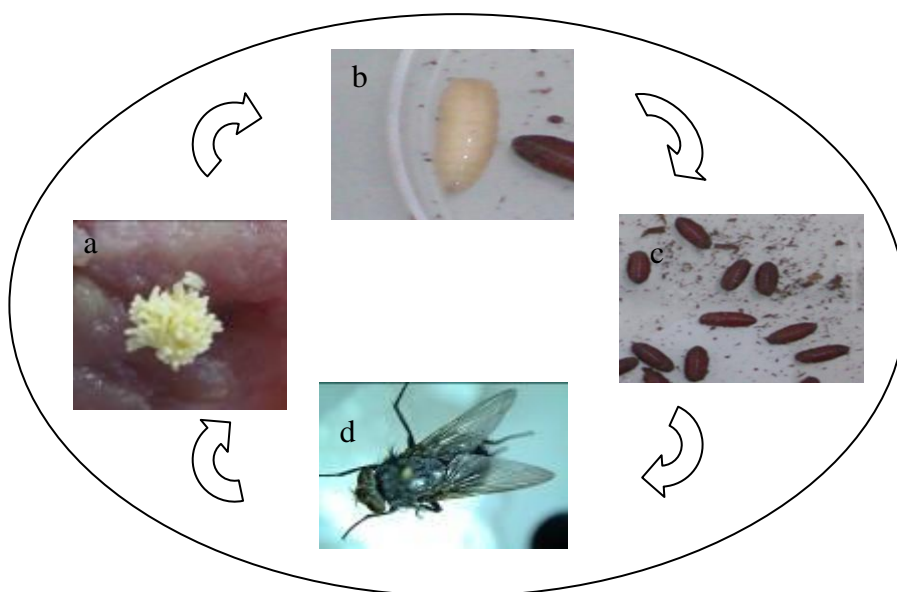


Figura 2. Ciclo de vida de *Calliphora vicina* em laboratório. a) Ovos; b) larvas; c) pupas e d) adulto (foto de Neiva Centeio).

Os ovos de *Lucilia sericata* foram criados em laboratório nas mesmas condições que os de *Calliphora vicina* contudo tendo sido numa altura do ano diferente (Maio 2011) registou-se a uma temperatura média de 18°C.

Os ovos (Fig.3.a) encontrados no isco demoraram entre 16 a 24 horas a eclodir (Fig.3.b). As larvas levaram 4 dias a atingir o terceiro estágio, e mais 2 dias até abandonar a carne e puparem (Fig.3.c). Depois de 5 a 8 dias na forma de pupa emergiram os adultos (Fig.3. d).

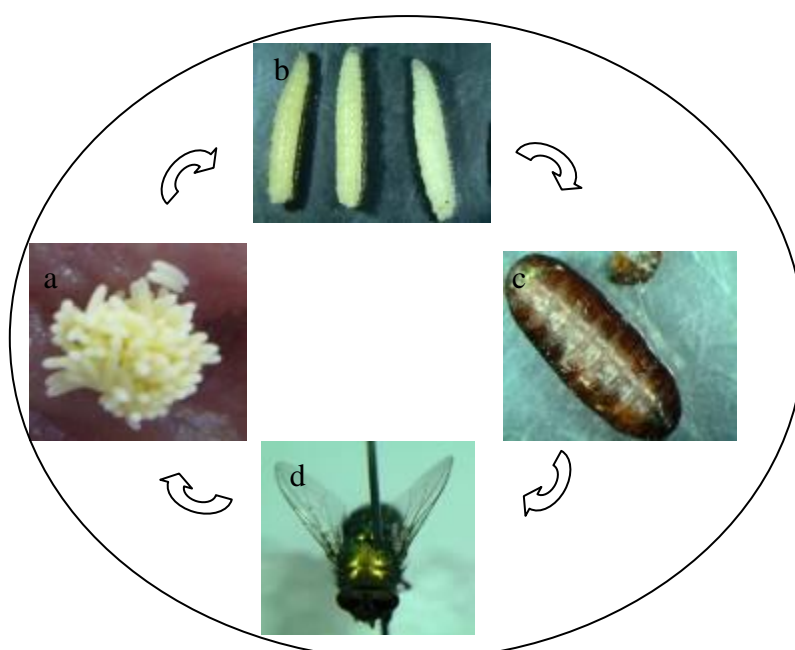


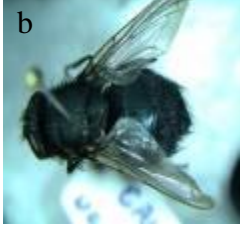
Figura 3. Ciclo de vida de *Lucilia sericata*. a) Ovos; b) larvas; c) pupas e d) adulto (foto de Neiva Centeio).

III.2. Contribuição para a elaboração de uma base de dados

Arquivos com informações taxonómicas dos estádios imaturos e adultos dos Díptera estudados, bem como imagens que permitem um fácil reconhecimento foram adicionados a um banco de dados em elaboração no âmbito do projecto. “Forensic Entomology: Morphometric and Molecular databank (mtDNA) to identify species (Diptera and Coleoptera) with forensic interest” -PTDC/SAU-ESA/101228/2008.

III.2.1. Características diagnosticantes de adultos de Calliphoridae de importância forense.

Neste trabalho foram identificadas 12 espécies e 5 gêneros da família Calliphoridae: *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758); *Polenia rudis* (Fabricius, 1794); *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Lucilia illustris* (Meigen, 1826); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda gentilis* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda veridicyanea* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Calliphora loewi* (Enderlein, 1903); *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922) e *Pollenia angustigena* (Wainwright, 1940) cujas características diagnosticantes se descrevem resumidamente a seguir.



Calliphora vomitoria
(Lineu.1758)

Família: Calliphoridae

Gênero: *Calliphora*

Tamanho: 9-14 mm de comprimento

Cor: Tórax preto e abdômen azul prateado

Características específicas: As cerdas da região inferior da bucca são cor de laranja. O espiráculo anterior é preto e a basicosta é de cor preta

Figura 4.a) Cabeça de *C.vomitoria* com detalhe da bucca com cerdas laranja; b) adulto de *C.vomitoria* (fotos de Neiva Centeio).



Calliphora vicina (Robineau Desvoidy, 1830)

Família: Calliphoridae

Gênero: *Calliphora*

Tamanho: 5-12 mm de comprimento

Cor: Tórax preto e abdômen azul prateado.

Características específicas: A bucca, o espiráculo anterior e a basicosta são laranja.

Figura 5.a) Cabeça de *C.vicina* com detalhe da bucca laranja; b) adulto de *C.vicina* (fotos de Neiva Centeio).



Lucilia sericata (Meigen1826)

Família: Calliphoridae

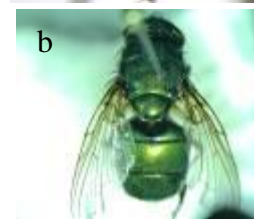
Gênero: *Lucilia*

Tamanho: 5-10 mm de comprimento

Cor: Verde metálico

Características específicas: A supra-esquama tem tufo de cerdas, a nervura basicostal é de cor amarela e tem 3 cerdas acrósticas pós-suturais e coxopleura presente.

Figura 6.a) Basicosta de *L. sericata*; b) adulto de *L.sericata* (fotos de Neiva Centeio).



Lucilia illustris (Meigen 1826)

Família: Calliphoridae

Gênero: *Lucilia*

Tamanho: 5.5-11 de comprimento

Cor: Verde metálico

Características específicas: A cor da basicosta varia de castanho-escuro a preto. Tem 2 cerdas acrósticas pós-suturais; coxopleura presente e nas fêmeas o t6 não apresenta forma convexa na vista lateral.

Figura 7.a) Cabeça de *L. illustris*; b) adulto de *L.illustris* (fotos de Neiva Centeio).



Lucilia ampullacea

Família: Calliphoridae

Gênero: *Lucilia*

Tamanho: 5-11 mm de comprimento

Cor: Verde metálico

Características específicas: A cor da basicosta varia de castanho-escuro a preto. Tem 2 cerdas acrósticas e coxopleura ausente.

Figura 8.a) Adulto de *L. ampullacea*; b) cabeça de *L.ampullacea* (fotos de Neiva Centeio).



Lucilia caesar (L1758.)

Família: Calliphoridae

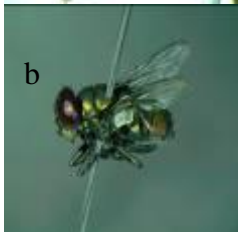
Gênero: *Lucilia*

Tamanho: 5.5-11.5 mm de comprimento

Cor: Verde metálico

Características específicas: A cor da basicosta varia de castanho-escuro a preto. Tem 2 cerdas acrósticas, tem coxopleura presente e nas fêmeas o t6 não apresenta forma convexa na vista lateral.

Figura 9. Adulto de *L. caesar* (fotos de Neiva Centeio).



Chrysomia albiceps
(wiedemann, 1819)
Família: Calliphoridae
Género: *Chrysomia*
Tamanho: 5-12 de comprimento
Cor: Verde metálico
Características específicas: Veia tronco com cerdas, bucca laranja, asa transparente e espiráculo anterior claro.

Figura 11.a) Cabeça de *C.albiceps*; b) adulto de *C.albiceps* (fotos de Neiva Centeio).



Melinda veridicyanea
(Robineau-Desvoidy 1830)
Família: Calliphoridae
Género: *Melinda*
Tamanho: 5-9 mm de comprimento
Cor: Azul metálico
Características específicas: Veia anal completa, tórax com 3 riscas longitudinais, palpus preto; ausência da cerda pré-sutural intraalar e abdómen azul metálico.

Figura 10.a) Cabeça de *M. veridicyanea*, b) adulto de *Melinda veridicyanea* (fotos de Neiva Centeio).



Pollenia rudis (Fabricius, 1794)
Família: Calliphoridae
Género: *Pollenia*
Tamanho: 5-10.5 mm de comprimento
Cor: Preto
Características específicas: Cerdas laranja no tórax, 2ºfémur e 3ºfémur com cerdas posteroventral pretas

Figura 12. Adulto de *Pollenia rudis* (fotos de Neiva Centeio).



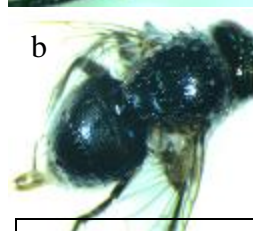
Calliphora loewi (Enderlein, 1903)
Família: Calliphoridae
Género: *Calliphora*
Tamanho: 7-12 mm de comprimento
Cor: Tórax preto e abdómen azul.
Características específicas: As cerdas da região inferior da bucca são pretas. O espiráculo anterior é preto e a basicosta é de cor acastanhada.

Figura 13. Adulto de *Calliphora loewi* (fotos de Neiva Centeio).



Pollenia angustigena
(Wainwright, 1940)
Família: Calliphoridae
Género: *Pollenia*
Tamanho: 5-9.5 mm de comprimento
Cor: Preto
Características específicas: Cerdas laranja no tórax, 2ºfémur e 3ºfémur com cerdas posteroventral amarelos.

Figura 15.a) Vista dorsal de Adulto de *Pollenia angustigena*; b) torax de *Pollenia angustigena* com detalhe das cerdas amarelas (fotos de Neiva Centeio).



Melinda gentilis (Robineau-Desvoidy, 1830)
Família: Calliphoridae
Género: *Melinda*
Tamanho: 5-10 mm de comprimento
Cor: Azul metálico
Características específicas: Palpus e basicosta castanho, cerda pré-sutural intraalar presente, tergito 4 sem cerdas discal e calipteros claros e sem pelos.

Figura 14.a) Cabeça de *M.gentilis*; b) vista dorsal de Adulto de *Melinda gentilis* (fotos de Neiva Centeio).

III.2.2. Características diagnosticantes de ovos de Calliphoridae de interesse forense

Os ovos apresentaram forma alongada, curvada com superfície côncava localizada dorsalmente. Apresentam uma abertura que é quase do comprimento do ovo, denominada área mediana (Fig.16A). A restante superfície do ovo é coberta por células coriônicas com formas hexagonais (Fig.16.G e Fig.17A). A zona coriônica dentro da área mediana apresenta estruturas diferentes da restante área, denominada de “ilhas”. Os resultados da dimensão da área média, comprimento total e anastomoses (ligações entre as ilha) das espécies estudadas encontram-se na tabela 3.

Informações detalhadas sobre as características morfológicas de ovos de duas espécies (*Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*) foram registradas no MEV.

III.2.2.1. Aspectos morfológicos dos ovos de *Calliphora vicina*.

Os ovos apresentaram um comprimento médio de 1,2 μm , uma forma cilíndrica alongada (Fig.16A) e uma cor branca. O corion é coberto por uma camada com padrões geométricos em forma de hexágonos (Fig.16B e 16G). A *micropyle* que se situa na região apical anterior do ovo é simples (Fig.16H). O *plastron* atinge a *micropyle*, terminando de forma arredondada na parte anterior e abruptamente perto do fim do ovo (Fig.16E e Fig.16F). As ilhas dentro do *plastron* apresentaram algumas anastomoses (Fig.16C) com vários orifícios (Fig.16D).

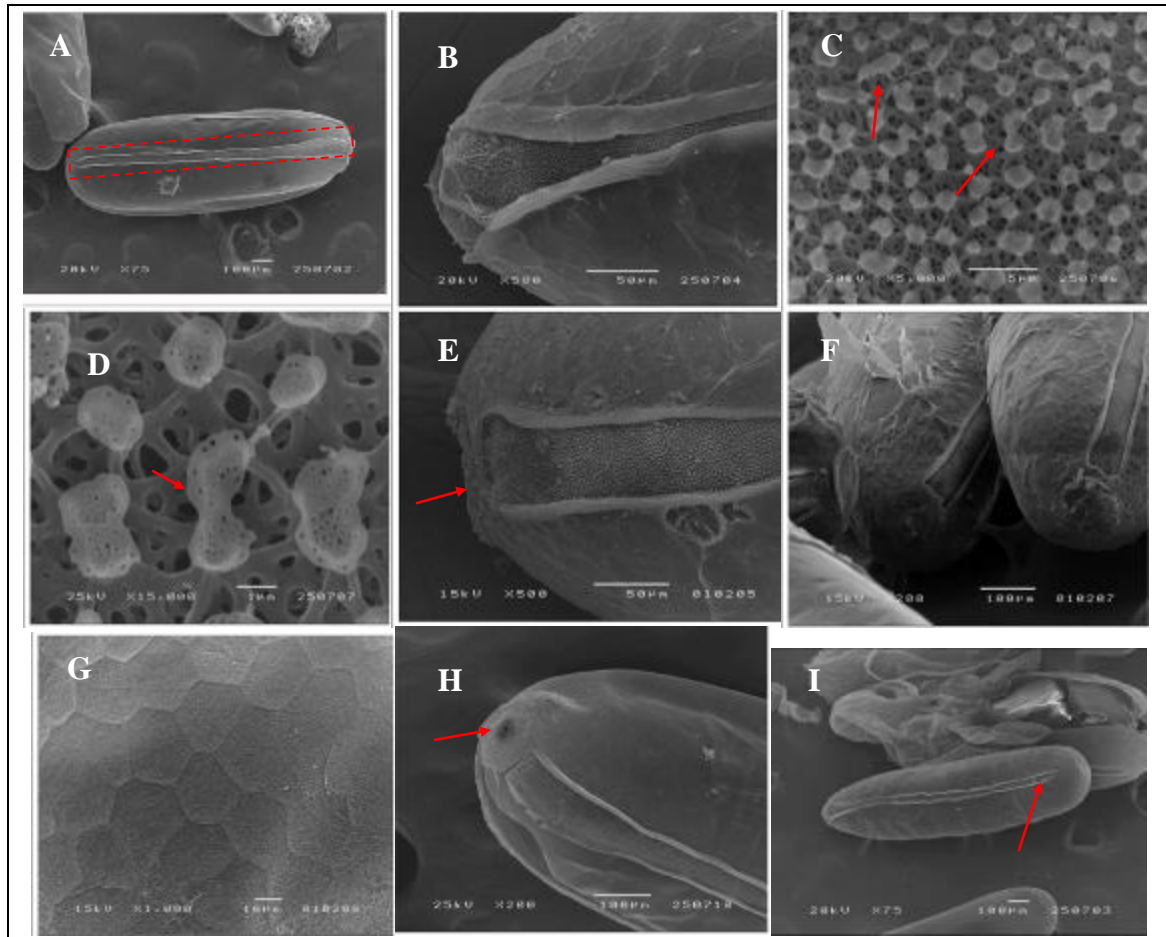


Figura 16 - Imagem do MEV de ovos de *Calliphora vicina*. (A) vista dorsal do ovo mostrando a área média; (B) região anterior do ovo; (C) ilhas com anastomoses; (D) anastomoses com orifício; (E) região anterior do ovo com a terminação da *plastron*; (F); grupo de ovos com detalhe da terminação do *plastron*; (G) padrão hexagonal do corion; (H) *micropyle (I)* terminação do *plastron* na região posterior (fotos de Neiva centeio).

Barra A, F, H e I = 100 µm; Barra B, e E=50 µm; Barra D=1 µm; Barra G=10 µm ; Barra C=5 µm

III.2.2.2. Aspectos morfológicos dos ovos de *Lucilia sericata*

Os ovos tinham um comprimento médio de 1,4 mm, ligeiramente superior a *Calliphora vicina* (1,2 mm). Apresentaram cor branca e forma cilíndrica alongada (Fig.17 F). O corion é coberto por uma fina camada com padrões geométricos em forma de hexágonos (Fig.17A). O *plastron* atinge a *micropyle*, e bifurca-se em forma de “y” (Fig.17B). As ilhas dentro do *plastron* apresentavam algumas anastomoses (Fig.17D e E) com poucos orifícios (Fig. 17C).

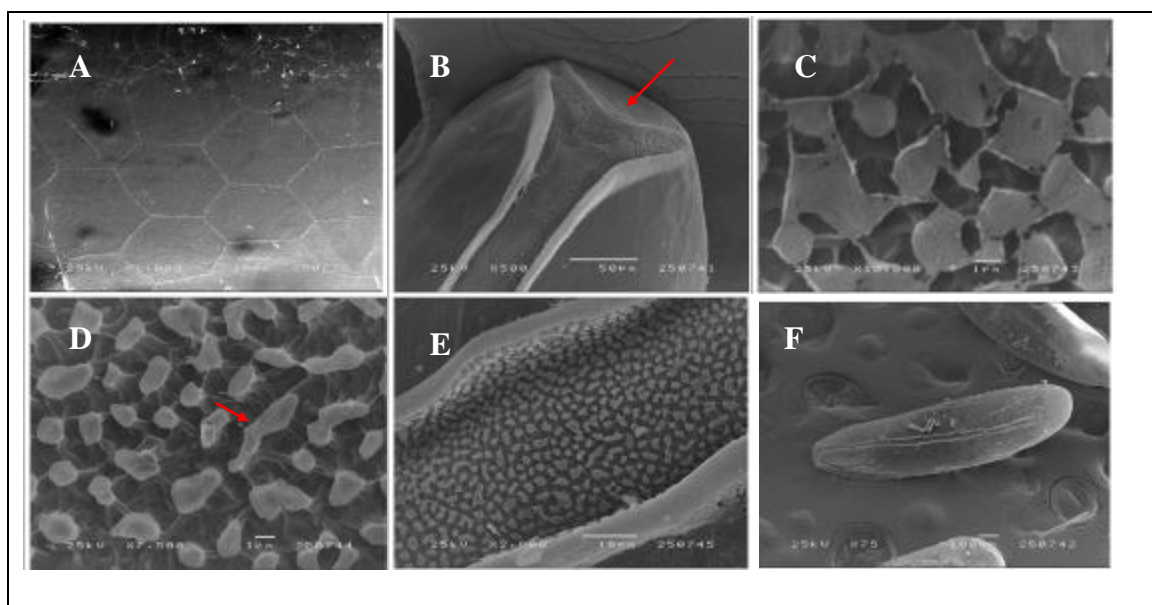


Figura 17 - Imagem de MEV de ovos de *Lucilia sericata*. (A) Padrão hexagonal do corion; (B) região anterior do ovo com o *plastron* a bifurcar em forma de y; (C) anastomoses com orifício; (D) ilhas com anastomoses; (E) região do ovo dentro da área média denominada de ilhas; (F) vista dorsal do ovo (fotos de Neiva Centeio).

Barra A, D e C= 1 μ m; Bar B =50 μ m; Barra E=10 μ m; Barra F=100 μ m

A comparação dos ovos das duas espécies revela uma pequena diferença em relação ao comprimento dos ovos, ao comprimento da área média e às anastomoses, sendo *Lucilia sericata* maior (Tab.3). Contudo quando tratadas estatisticamente, as duas espécies não revelam diferenças (Tab.4 e Fig.18).

Tabela 3-Tabela comparativa da dimensão (μm) dos ovos, área média e anastomoses de *Calliphora vicina* e *Lucília sericata*.

Estatística Descritiva

		N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	95% intervalo de confiança para média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
Comp do ovo	<i>Calliphora vicina</i>	10	1227,7587	226,70044	71,68897	1065,5870	1389,9304	854,91	1443,91
	<i>Lucilia sericata</i>	10	1400,4155	166,11988	52,53172	1281,5805	1519,2505	1019,82	1601,09
	Total	20	1314,0871	212,74546	47,57133	1214,5192	1413,6551	854,91	1601,09
Área média	<i>Calliphora vicina</i>	10	1116,5282	200,42706	63,38060	973,1513	1259,9051	811,63	1377,63
	<i>Lucilia sericata</i>	10	1242,8742	157,88234	49,92678	1129,9320	1355,8164	905,09	1450,33
	Total	20	1179,7012	187,18090	41,85492	1092,0978	1267,3046	811,63	1450,33
Anastomoses	<i>Calliphora vicina</i>	10	2,2478	,74070	,23423	1,7179	2,7776	1,34	3,73
	<i>Lucilia sericata</i>	10	2,3429	1,08892	,34435	1,5639	3,1219	1,34	5,02
	Total	20	2,2953	,90771	,20297	1,8705	2,7202	1,34	5,02

Tabela 4-Resultados do teste ANOVA unifactorial para dimensão (μm) dos ovos, área média e anastomoses de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*.

		ANOVA				
		Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Significância
comp_do_ovo	Entre grupos	149051,867	1	149051,867	3,774	,068
	Dentro do grupo	710900,140	18	39494,452		
	Total	859952,007	19			
área_média	Entre grupos	79816,556	1	79816,556	2,452	,135
	Dentro do grupo	585880,552	18	32548,920		
	Total	665697,108	19			
anastomoses	Entre grupos	,045	1	,045	,052	,822
	Dentro do grupo	15,609	18	,867		
	Total	15,655	19			

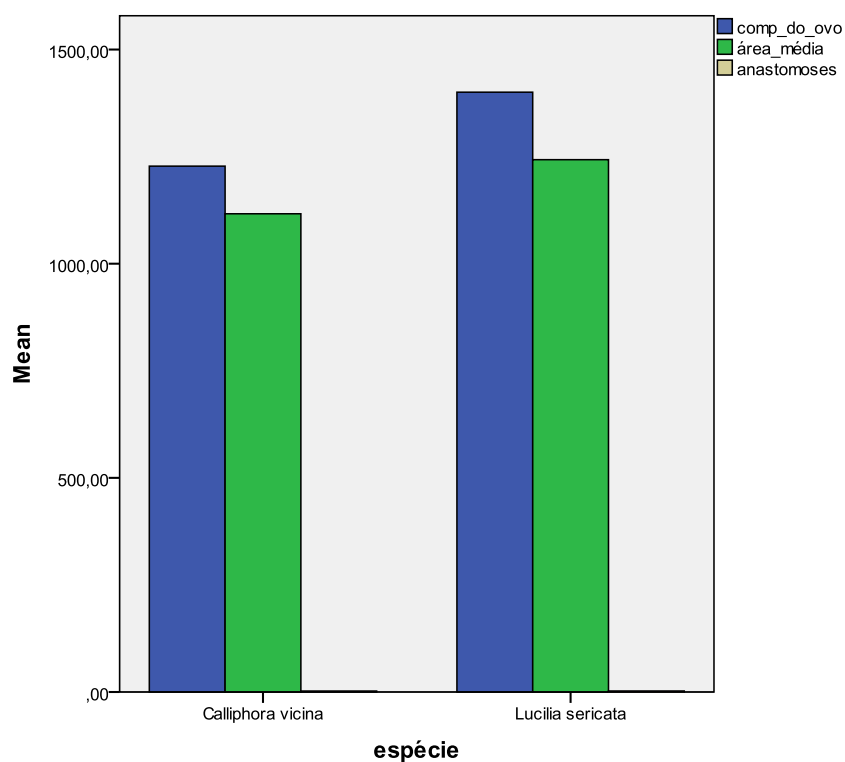


Figura 18 - Dimensão média dos ovos (azul), área média (verde) e anastomoses (cinza) de *Lucilia sericata* e *Calliphora vicina*.

III.2.3. Características diagnosticantes de larvas de Calliphoridae com interesse forense.

As larvas de Calliphoridae são acéfalas. Algumas espécies têm placas laterais de espinhos localizados entre os segmentos da área posterior chamadas fusiformes (Fig.19.a). O corpo compreende 12 segmentos: A região cefálica, três segmentos torácicos, seguidos de oito segmentos abdominais com anéis de espinhos pigmentados paralelos ou irregulares que podem cobrir a totalidade do segmento ou só uma porção (Fig.19.b,c).

O esqueleto cefalo-faríngeo usualmente tem pigmentação escura, mandíbulas formadas por dois ganchos bucais fortemente esclerotizados, entre os quais pode apresentar ou não um esclerito oral pigmentado (Fig.19.d, f). Os espiráculos anteriores têm lóbulos (Fig.19.e) e o espiráculos posteriores não são aproximados ou fundidos nem localizados numa cavidade, são formados por um anel externo chamado peritrema que em larvas maduras apresentam três aberturas estigmáticas mais ou menos transversais (Fig.19.g). A extremidade caudal é truncada ou arredondada, com diferentes processos que podem ser quatro ou mais, localizada na região ventral, lateral dorsal ou às vezes em relação aos espiráculos posteriores (Fig.19.h).

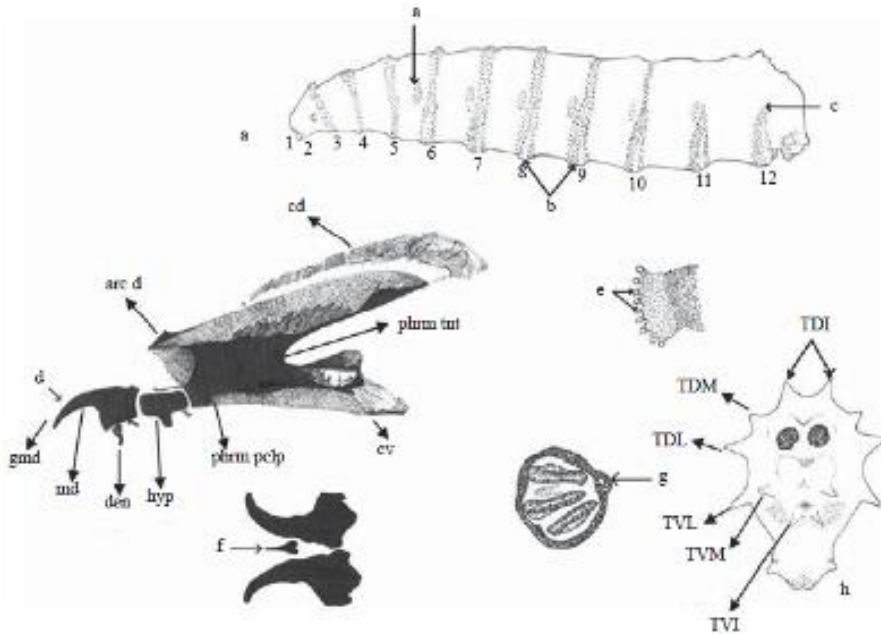


Figura 19 - Morfologia de larva de Calliphoridae. a. áreas fusiformes da larva de terceiro instar (*Cochliomyia macellaria*), b. anéis de espinhos (*C. macellaria*), c. anéis de espinhos com uma fracção de 1/2, d. esqueleto cefalo-faríngeo (*C. macellaria*): d. denticulo, gmd. gancho da mandíbula, md. mandíbula, do. esclerito dental, hyp. esclerito hipofaríngeo, phrm pcp. fragma para clipeal, cv. corno ventral, phrm tint. fragma tentorial, cd. corno dorsal, arch d. arco dorsal, e. brânquias do espiráculo anterior (*Sarconesiopsis magellanica*), f. esclerito oral pigmentado (*Calliphora vicina*), g. botão do espiráculo posterior (*Lucilia peruviana*), h. processos no segmento caudal (*Chrysomya albiceps*): TDI. tubérculo dorsal interno, TDM. tubérculo dorsal médio, TDL. tubérculo dorsal lateral, TVL. tubérculo ventral lateral, TVM. tubérculo ventral médio, TVI. tubérculo ventral interno (Florez, & Wolff, 2009).

As larvas do presente estudo foram diferenciadas por observação em MEV (Fig.20), microscópio óptico (Figs.23 e 27) e lupa (Fig.21,22 e 24,25,26).

III.2.3.1 Aspectos morfológicos das larvas de *Calliphora vicina*.

As larvas de *Calliphora vicina* apresentaram uma cor branca leitosa.

As imagens do 1º instar foram tiradas no MEV (fig.20). Apresentaram um tamanho médio de 4-6 mm (Fig.20.A e B). A “região cefálica” (Fig.20.D.) encontrava-se pouco desenvolvida e praticamente indivisa do segmento prototorácico. O espiráculo posterior apresentou peritrema indistinguível e aberturas estigmáticas de difícil visualização (Fig.20.C, E e G) As

estruturas sensoriais apresentavam-se pouco desenvolvidas e consequentemente de difícil visualização (Fig.20.F e H).

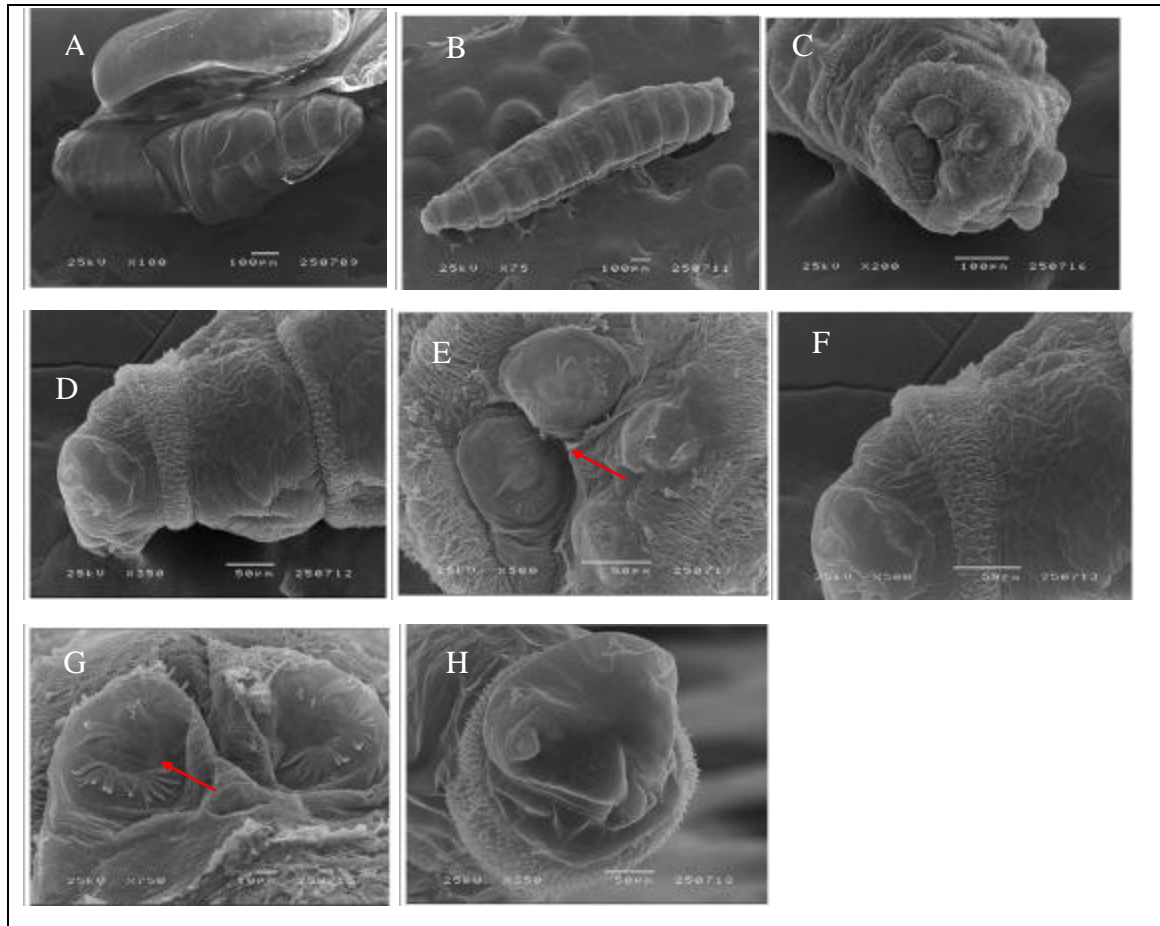


Figura 20 - Larvas de 1º instar de *Calliphora vicina* observadas ao MEV (A) Larva a eclodir do ovo; (B) larva em vista dorsal; (C) região posterior da larva; (D) segmentos torácicos; (E) espiráculo posterior; (F) espinhos torácicos; (G) detalhe do espiráculo posterior; (H) região anterior da larva (região cefálica) (fotos de Neiva Centeio).

Barra A, B e C=100 µm; Barra D, E, F e H=100 µm; Barra G=10µm.

As larvas do 2º instar apresentaram um comprimento médio total de 7-9 mm, incluindo a “região cefálica” (Fig.21.A). Esta (Fig.21.B) tem o sulco longitudinal mais proeminente do que nas larvas de primeiro instar, realçando os dois lobos cefálicos, cada qual com estruturas sensoriais na extremidade apical, estas mais desenvolvidas do que nas larvas de primeiro instar. O esqueleto cefalo-faríngeo (Fig.21.F) é semelhante ao de primeiro instar, porém, mais esclerotizado, de tamanho maior e com escleritos mais evidentes. Os ganchos orais são desenvolvidos, os espiráculos anteriores (Fig.21.D) localizam-se lateralmente na região posterior do segmento prototorácico e os posteriores (Fig.21.C) possuem peritrema evidente e incompleto, cada um com duas aberturas estigmáticas, ovais alongadas (Fig.21.C.c).

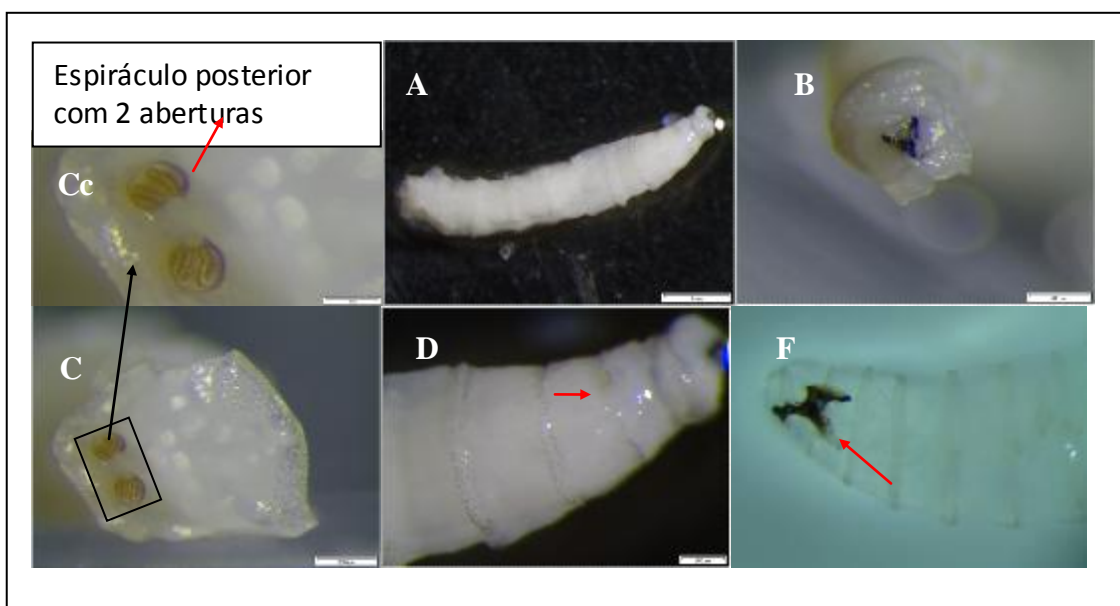


Figura 21 - Larvas de 2º instar de *Calliphora vicina* observadas à lupa. (A) vista lateral; (B) região anterior com a armadura bucal; (C) espiráculo posterior; (D) segmentos torácicos (E) esqueleto cefalo-faríngeo 2ºinstar) (fotos de Neiva Centeio).

Barra A, B e C=200 µm ; Barra D=1mm Barra Aa=100 µm

As larvas do 3º instar tinham um tamanho médio de 15,5 mm. A região cefálica (Fig.22.B) era semelhante à larva de segundo instar com esqueleto cafo-faríngeo (Fig.23.C) fortemente esclerotizado onde podemos observar o esclerito oral (Fig.22.B e Fig.23.C). Espiráculos anteriores (Fig.22.D e E) apresentam a mesma posição e forma como nas larvas de segundo instar, porém maiores (Fig.23.A e B) com 7 a 8 glóbulos; as bandas de espinhos torácicos (Fig.23.E e 22.F) eram compostas por espinhos simples, dispostos em número variável de fileiras, normalmente com 6 a 8 fileiras.

Os espiráculos posteriores (Fig.22.A) que se localizam na região postero-dorsal do oitavo segmento abdominal, tem peritrema completo que circunda completamente as três fendas espiraculares (Fig.23.D e F).

Os tubérculos dorsais internos que se encontram na região caudal são pequenos e amplamente separados (Fig.22.C).

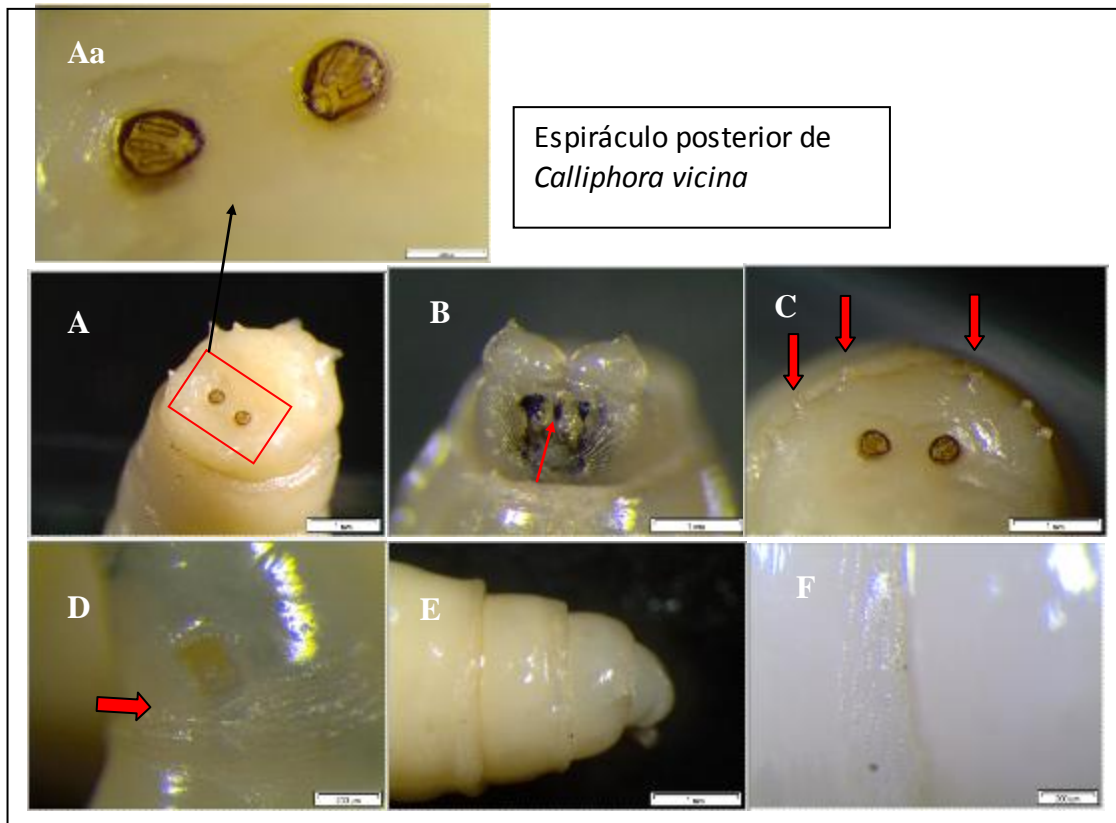


Figura 22 - Larvas de 3º instar de *Calliphora vicina* observadas à lupa. (A) espiráculo posterior; (B) armadura bucal com detalhe do esclerito oral no meio; (C) tubérculos; (D) espiráculo anterior; (E) segmentos torácicos; (F) bandas de espinhos segmentares (fotos de Neiva Centeio). Barra A.a, D e F =200 µm; Barra A, B, C e E=1mm.

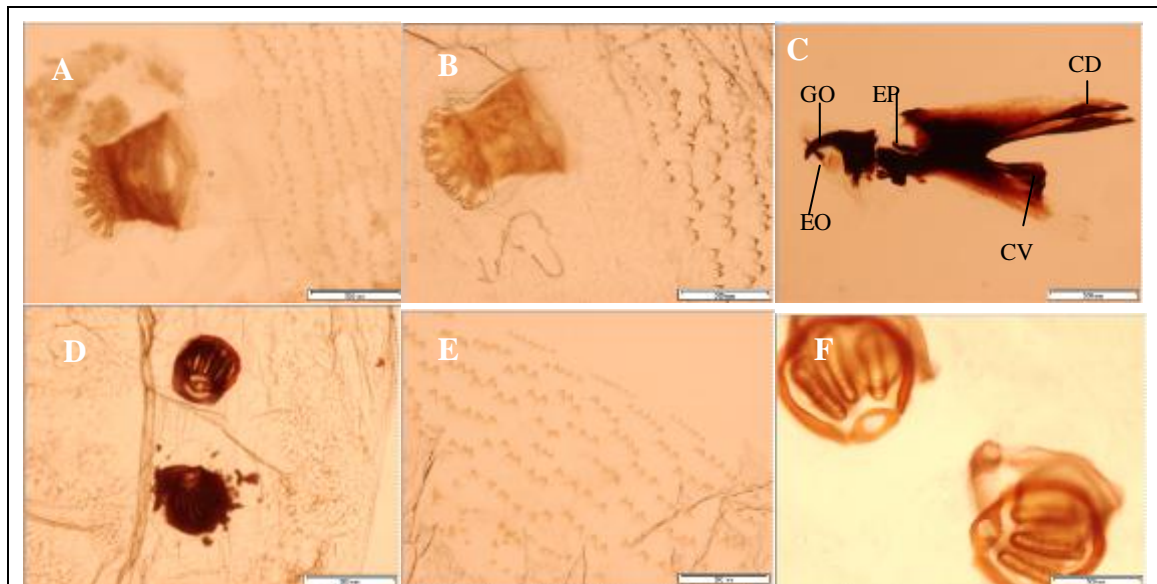


Figura 23 - Larvas de *Calliphora vicina* (3º instar) observadas ao microscópio óptico. (A e B) espiráculo anterior; (C) Vista lateral esqueleto cefalo-faríngeo mostrando os ganchos orais (GO), esclerito oral (EO), esclerito parastomal (EP), cornos dorsais (CD) e os cornos ventrais (CV); (D) espiráculo anterior; (E) bandas torácicas; (F) pormenor de espiráculo posterior (fotos de Neiva Centeio).

Barra =500µm

III.2.3.2. Aspectos morfológicos das larvas de *Lucília sericata*.

As larvas de *Lucília sericata* apresentaram uma cor ligeiramente mais clara do que *Calliphora vicina*.

As larvas do 1º instar de *Lucília sericata* apresentaram um tamanho médio de 4-6 mm (Fig.24.A). A “região cefálica” tinham tamanho reduzido e o esqueleto cefalo-faríngeo (Fig.24.B) encontrava-se pouco desenvolvido. Os espiráculos posteriores apresentaram peritrema indefinido e estigmas pouco desenvolvidos e consequentemente de difícil visualização (Fig.24.C).

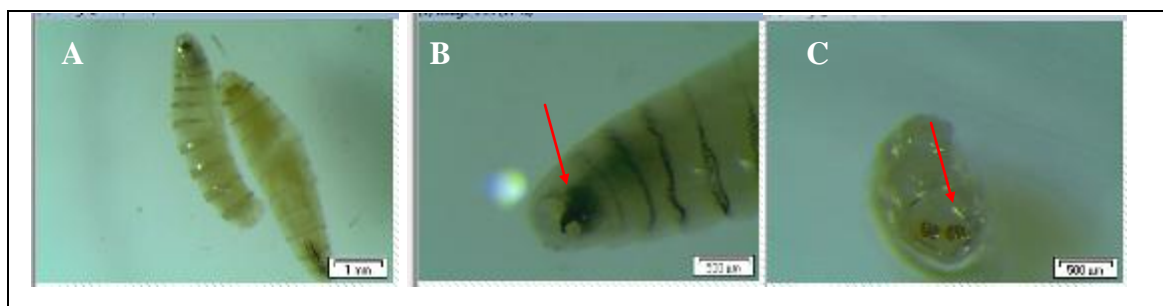


Figura 24 -Larvas de 1º instar de *Lucília sericata* observadas à lupa. (A) Vista dorsal da larva; (B) esqueleto cefalo -faríngeo; (C) espiráculo posterior (fotos de Neiva Centeio).
Barra A=5 mm; B e C= 500 µm

As larvas do 2º instar tinham um comprimento médio total 6-9mm (Fig.25.B). A região cefálica (Fig.25.C) tem dois lobos cefálicos pouco desenvolvidos. O esqueleto cefalo-faríngeo (Fig.25.D) é semelhante ao de primeiro instar mas com os ganchos orais mais desenvolvidos. Os espiráculos anteriores encontram-se visíveis nesta fase (Fig.25.F). Os espiráculos posteriores (Fig.25.A) apresentavam peritrema incompleto, cada um com duas aberturas estigmáticas, ovais alongadas (Fig.25.A.a).

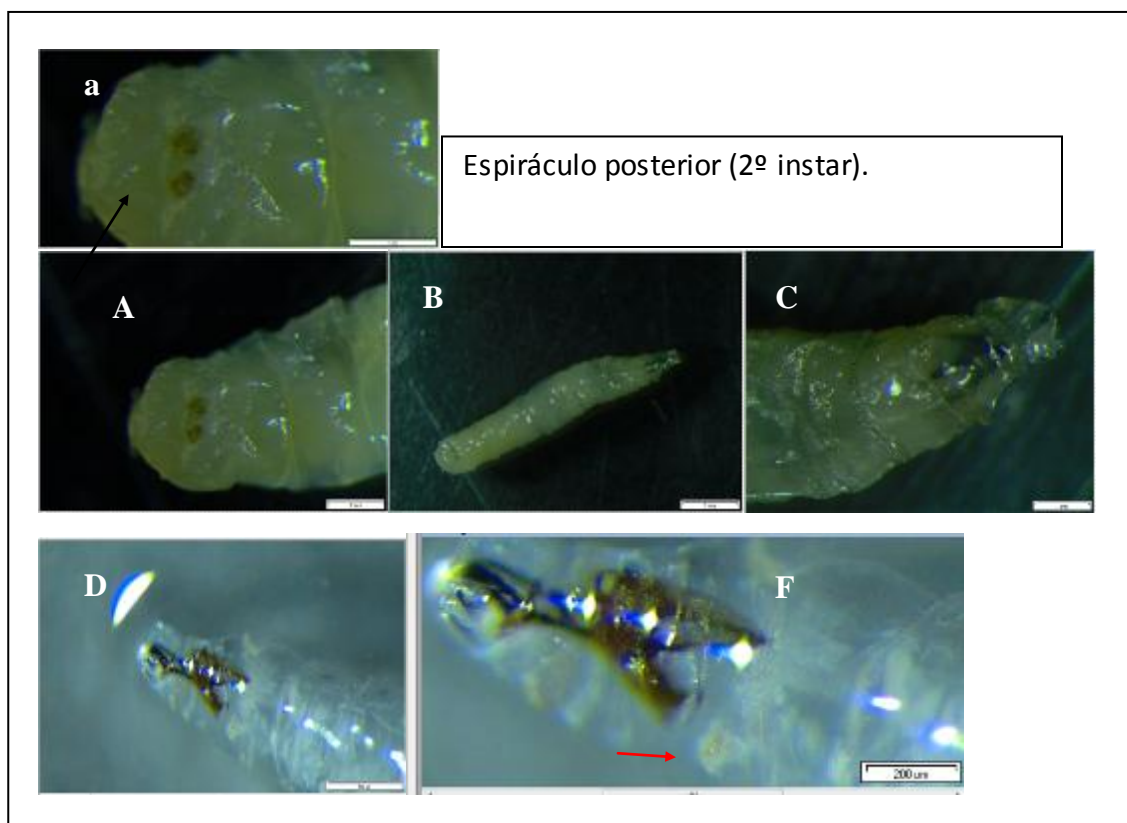


Figura 25 -Larvas de 2º instar de *Lucilia sericata* observadas à lupa. (A) espiráculo posterior; (B) vista dorsal; (C) segmentos torácicos; (D) esqueleto cefalo-faríngeo; (F) espiráculo anterior (fotos de Neiva Centeio)

Barra A, B, C e D=1mm;F=200µm

As larva do 3º instar possuíam um tamanho médio de 15,1mm. A região cefálica apresentou esqueleto cefalofaríngeo fortemente esclerotinado, porém sem o esclerito oral (Fig.27.A e B). Os espiráculos anteriores (Fig.26.E) apresentam a mesma posição e forma como nas larvas de segundo instar, contudo maiores com 7-8 glóbulos (Fig.27.D). As bandas de espinhos segmentares (Fig.26.A.a e 27. E) são compostas por espinhos simples. Os espiráculos posteriores (Fig.26.B e 27.C) estão completos com peritrema circundando completamente as três fendas espiraculares (Fig.27.F e 26.Bb). A distância entre o tubérculo dorsal interno, dorsal médio e lateral é aproximadamente igual (Fig.26.G).

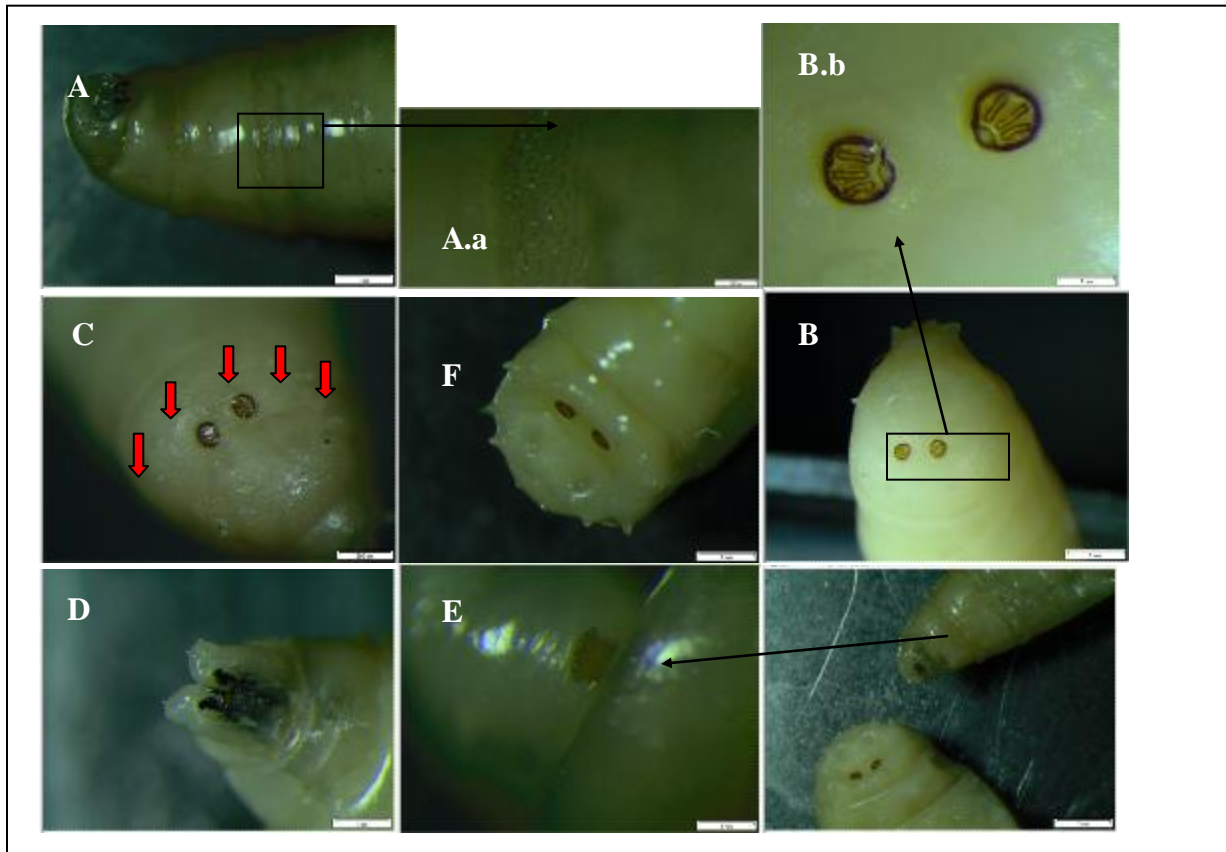


Figura 26 - Larvas de 3º instar de *Lucilia sericata* observadas à lupa. (A) bandas de espinhos; (B) espiráculo posterior; (C e G) tubérculos (D) armadura bucal; (E) espiráculo anterior; (F) extremidade anterior e posterior da larva (fotos de Neiva Centeio).

Barra A, B, B.b, D, F, e E= 1mm; Barra A. a =200µm; Barra C, =500 µm

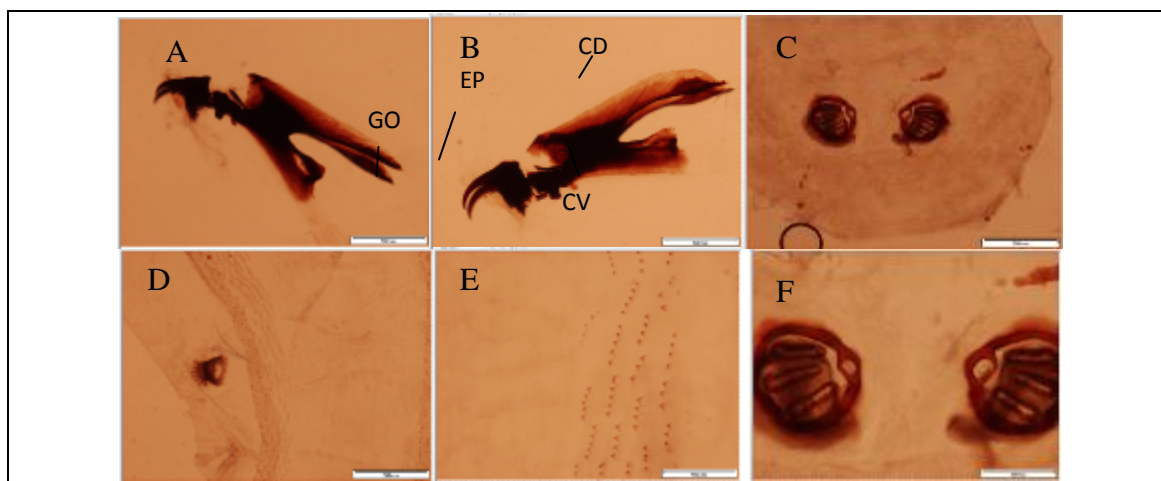


Figura 27 - larvas de *Lucilia sericata* (3º instar) observadas no microscópio óptico. (A e B) esqueleto cefalo-faríngeo na vista lateral mostrando os ganchos orais (GO), esclerito parastomal (EP), cornos dorsais (CD) e os cornos ventrais (CV); (C) espiráculo posterior; (D) espiráculo anterior; (E) bandas de espinhos; (F) pormenor de espiráculo posterior (fotos de Neiva Centeio). **Barra =500 µm**

De acordo com a tabela descritiva (Tab.5) as larvas de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata* apresentaram um comprimento semelhante sendo *Calliphora vicina* ligeiramente maior com uma diferença de 0,5 mm. Em relação ao tamanho do espiráculo e à distância que os separa, as larvas de *C.vicina* apresentam um espiráculo menor e com uma maior distância a separá-los.

Os resultados da análise estatística ANOVA (Tab.6 e Fig.28) mostram que a relação entre o tamanho do espiráculo e distância que os separa apresentou diferenças para um nível de significância de 95%, podendo ser utilizada na diferenciação entre as duas espécies. O tamanho das larvas e diâmetro dos espiráculos não apresentaram diferenças.

Tabela 5-Tabela comparativa do comprimento (μm) da Larva, diâmetro dos espiráculos e distância entre os espiráculos posteriores de *Lucilia sericata* e *Calliphora vicina*.

		Tabela Descritiva							
		N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	95% Intervalo de confiança para Média		Mínimo	Máximo
						Limite inferior	Limite superior		
com_da_larva	<i>Calliphora vicina</i>	6	15568,7450	2753,2606	1124,0139	12679,3752	18458,1148	12413,55	19390,58
	<i>Lucilia sericata</i>	6	15135,1533	512,74014	209,32529	14597,0656	15673,2411	14628,20	15772,10
	Total	12	15351,9492	1901,6915	548,97106	14143,6720	16560,2263	12413,55	19390,58
Diam_do_esp	<i>Calliphora vicina</i>	6	195,3433	16,79522	6,85662	177,7178	212,9688	172,00	211,10
	<i>Lucilia sericata</i>	6	228,3850	30,69671	12,53188	196,1708	260,5992	193,68	266,48
	Total	12	211,8642	29,22809	8,43742	193,2935	230,4348	172,00	266,48
Distan_entre_esp	<i>Calliphora vicina</i>	6	300,9600	30,19289	12,32620	269,2745	332,6455	240,26	320,18
	<i>Lucilia sericata</i>	6	246,8717	32,92578	13,44189	212,3182	281,4252	208,57	289,65
	Total	12	273,9158	41,29190	11,91995	247,6802	300,1515	208,57	320,18

Tabela 6-Resultado do teste ANOVA unifactorial em relação ao comprimento (μm) da larva, diâmetro dos espiráculos e à distância entre os espiráculos posteriores de *Lucília sericata* e *Calliphora vicina*.

ANOVA						
		Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	F	Significância
com_da_larva	Entre Grupos	564005,200	1	564005,200	,144	,712
	Dentro do Grupo	39216732,962	10	3921673,296		
	Total	39780738,162	11			
Diâm_do_esp	Entre Grupos	3275,255	1	3275,255	5,350	,043
	Dentro do Grupo	6121,839	10	612,184		
	Total	9397,094	11			
Distân_entre_e sp	Entre Grupos	8776,643	1	8776,643	8,795	,014
	Dentro do Grupo	9978,589	10	997,859		
	Total	18755,232	11			
razão_distânci a_diametro_es piraculo	Entre Grupos	,639	1	,639	14,049	,004
	Dentro do Grupo	,455	10	,045		
	Total	1,093	11			

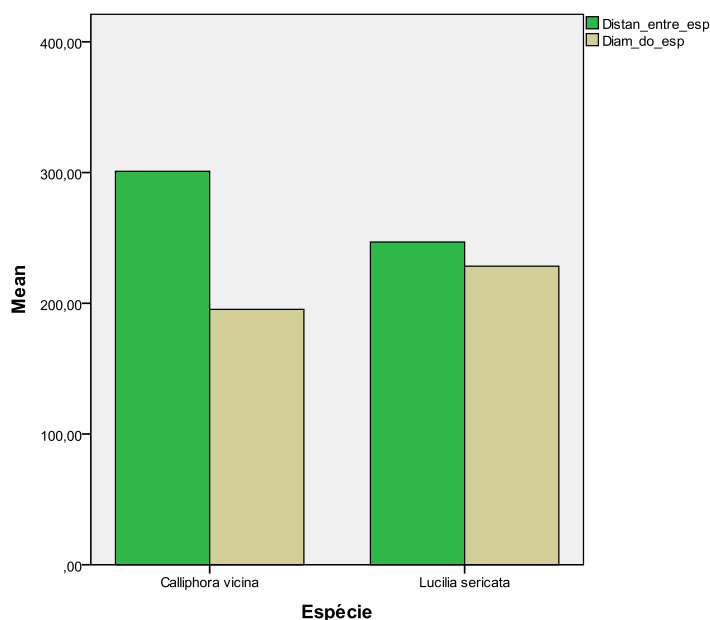


Figura 28 - Diâmetro do espiráculo (cinza) e a distância entre os espiráculos posteriores (verde) de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*.

III.3-Chave dicotômica para as espécies de Calliphoridae identificadas neste estudo.

Considerando a importância da identificação de insectos necrófagos para a utilização na investigação criminal, compreende-se a necessidade de estudos detalhados de Sistemática.

Foi elaborada uma chave-dicotômica que permite a identificação das 12 espécies de Calliphoridae estudadas. As espécies estão distribuídas pelas subfamílias Chrysomyinae, Calliphorinae, Luciliinae, Polleniinae e Melanomynae.

1)

-Veia tronco (Stem- vein) com cerdas na face e sem cerdas na face ventral dorsal, arista na extremidade distal plumosa..... (Crhysomyinae) (Fig.1) 3

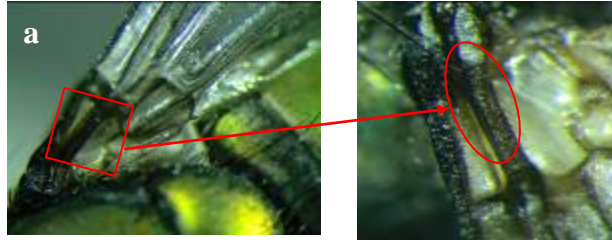


Figura 1-a) Asa de *chrysomia albiceps*; b)detalhe da asa com as cerdas na veia tronco (stem-vein) (fotos de Neiva Centeio).

-Veia tronco (Stein-vein) sem cerdas na face dorsal..... 2

2)

-Caliptera inferior com pelos na parte superior, tórax preto e abdómen azul (Fig.2a); Caliptra inferior castanha, parte inferior da costa sem cerdas após junção da veia R1; Parafacialia com cerdas, palpos amarelos (Calliphorinae) (Fig.2) 7

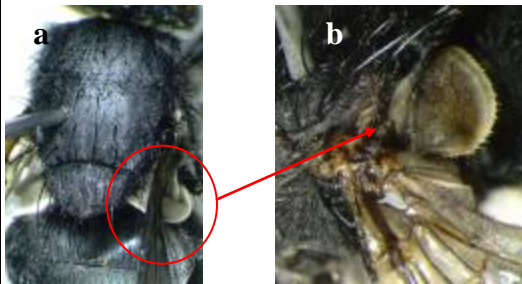


Figura 2. a). Tórax de *Calliphora vicina*. b) caliptera inferior de *Calliphora vicina* (fotos de Neiva Centeio).

-Caliptera inferior sem pelos;4

3)

- Moscas com bucca laranja, caliptera inferior com cerdas claras, asa transparente (Fig.3b) e espiráculo anterior claro (Fig.3 a).....(*Chrysomia albiceps*)

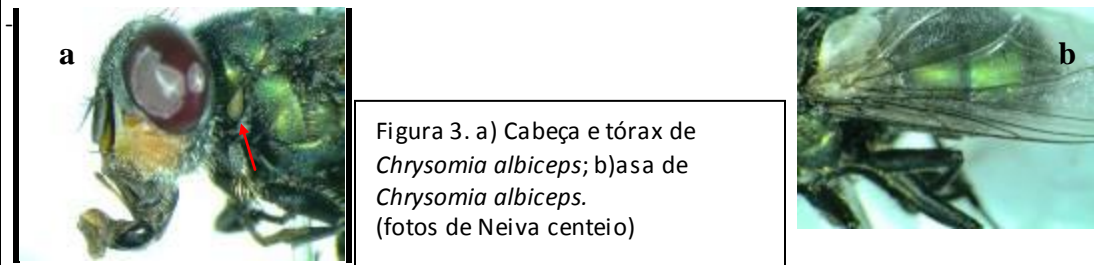


Figura 3. a) Cabeça e tórax de *Chrysomia albiceps*; b)asa de *Chrysomia albiceps*. (fotos de Neiva centeio)

4)

- Coxopleura ausente (fig.4a), corpo não metálico ou metálico num tom azul escuro, palpos escuros, região inferior da costa com cerdas para além da junção com R1 (fig4b))..... (Melanomynae) 12

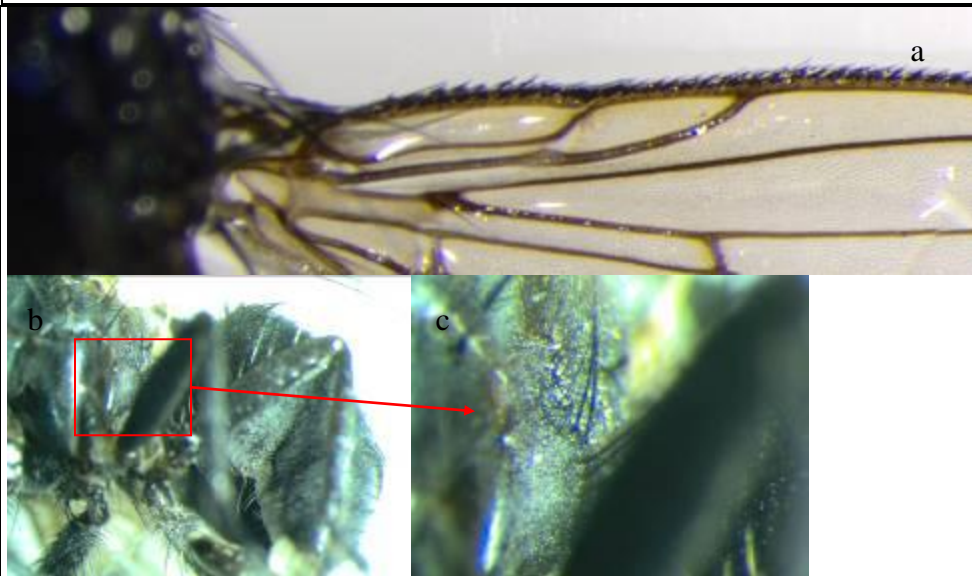


Figura. 4) a) Costa de *Melinda Veridicyanea*; b)tórax de *Melinda gentilis*; c)detalhe do hipopleuro com ausência do coxopleuro (fotos de Neiva Centeio).

-Coxopleura presente (fig.5) (ausente em *Lucilia ampullacea*)..... 5



Fig.5.Tórax de *Pollenia rudis* (fotos de Neiva Centeio).

5)

- Moscas completamente verdes metálicas (Fig.6.a); caliptra inferior sem pelos (Fig.6.b); superfície imediatamente acima das coxas traseiras com cerdas finas; parafacialia nua.....(Luciliinae).8

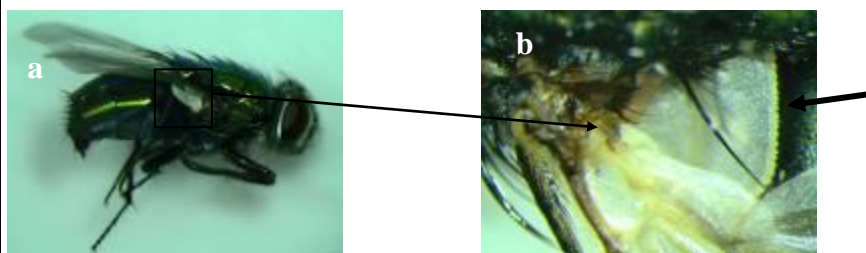


Fig 6-a) *Lucilia sericata*; b)caliptera inferior de *Lucilia sericata* (fotos de Neiva Centeio).

-Moscas não metálicas, superfície imediatamente acima das coxas traseiras sem pelos..... 6

6)

-Caliptera inferior geralmente larga, com bordas internas convergindo para trás, R_{4+5} com cerdas em ambos lados da asa, vestiduras amarelas presentes em adição as cerdas normais da mosca

.....13(Polleniinae)



Fig.7 *Pollenia rudis* (fotos de Neiva Centeio)

7)

-Basicosta (fig. 8b), estigma anterior e bucca amarelas (Fig. 8a).....(*Calliphora vicina*)

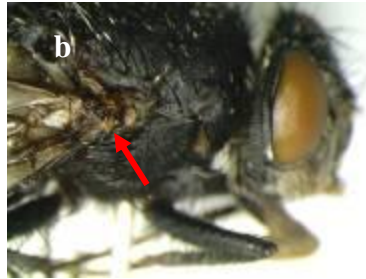
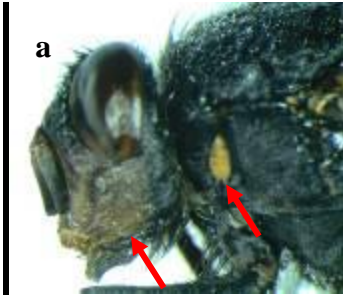


Fig.8 a)Cabeça e tórax de *Calliphora vicina*
b)Basicosta de *Calliphora vicina* (fotos de Neiva Centeio).

-Basicosta (fig. 9.a) e bucca pretas; três cerdas acrósticas (Fig.9.b).....9

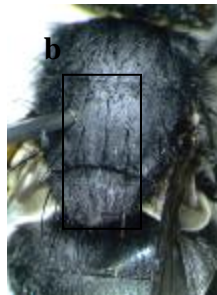


Fig. 9 a)Basicosta de *Calliphora vomitoria*
b) Tórax de *Calliphora vomitoria* (fotos de Neiva Centeio)

8)

-Basicosta (fig.10b) e palpo amarelos (Fig.10 c), três cerdas acrósticas (fig. 10a).....(*Lucilia sericata*).



Fig.10 a) Torax de *Lucilia sericata*; b) basicosta e c) cabeça de *Lucilia sericata* com detalhe dos palpos (fotos de Neiva Centeio).

-Basicosta preta (Fig.11 b); Duas cerdas acrósticas (Fig.11a).....10

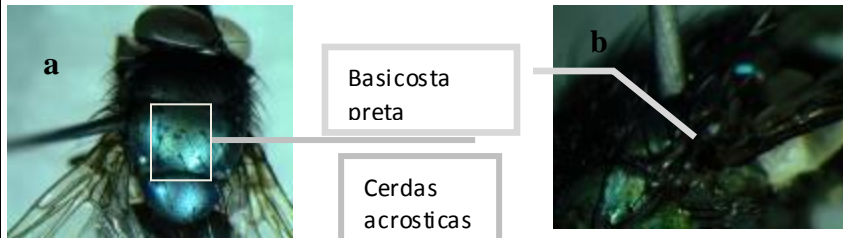


Fig.11 a) Tórax de *Lucilia ampulla*; b) detalhe da basicosta de *Lucilia caesar* (fotos de Neiva Centeio).

9)

-Parte inferior da bucca com cerdas pretas (Fig.12).....(*Calliphora loewi*)



Fig.12-Cabeça de *Calliphora loewi* (fotos de Neiva Centeio).

- Parte inferior da bucca com cerdas amarela (fig.13).....(*Calliphora vomitoria*)



Fig.13-Cabeça de *Calliphora vomitoria* (fotos de Neiva Centeio).

10)

- Com coxopleura (Fig.14).....11

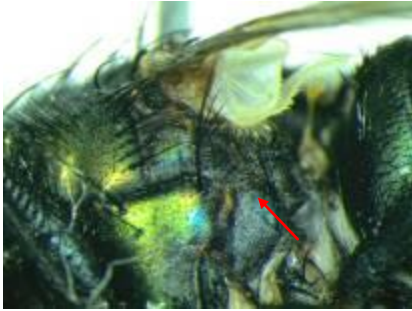


Fig.14-Torax de *Lucilia sericata* (fotos de Neiva Centeio).

-Sem coxopleura (Fig.15).....(*Lucilia ampulacea*)



Fig.15-a)Tórax de *Lucilia ampullacea*
b)Detalhe do tórax de *Lucilia ampullacea* (fotos de Neiva Centeio).

11)

-Nas fêmeas no 6º tergito tem cerdas marginais curtas de lado e 2-4 cerdas mais compridas no meio (fig.16 b); o 6º tergito tem uma forma convexa quando visto lateralmente (fig16.a)..... (*Lucilia caesar*).

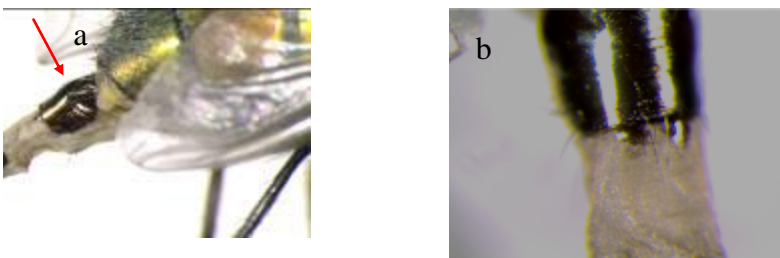


Fig.16- Detalhe do 6º tergito de *Lucilia caesar* (fotos de Neiva Centeio).

-O 6º tergito tem uma fila completa de cerdas marginais e não apresenta curva quando visto lateralmente.....(*Lucilia illustris*)



Fig 17 *Lucilia illustris* (fotos de Neiva Centeio).

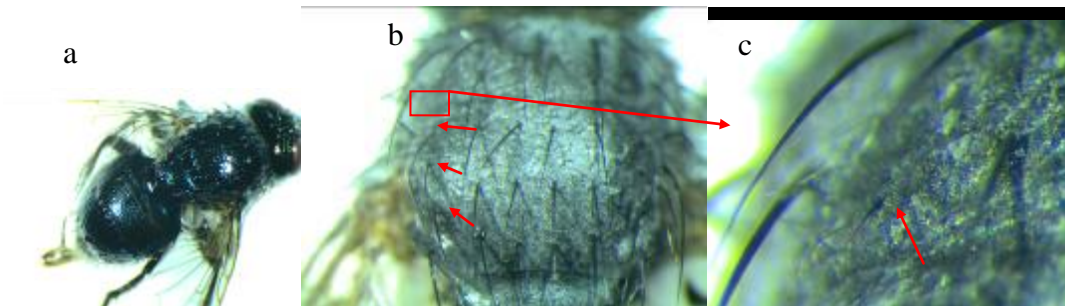
12)

-Tórax com 3 riscas longitudinais e abdómen com tom metálico azul-escuro (fig.18.a), parte inferior da costa com cerdas para além da junção R1 (fig.18c), lununa nua, veia anal completa (Fig 18.b); 3 cerdas pós-sutural intra-alar. Fêmea com t6 e st6 sem cerdas, cerdas pré-sutural intraalar usualmente ausente, palpos pretos (fig.18d),.....(*Melinda veridicyanea*).



Fig.18) Adulto de *Melinda veridicyanea*, b) Detalhe da veia anal, c) Costa com cerdas, d) palpus, e) tórax com detalhe da ausência da cerda prst ia (fotos de Neiva Centeio).

- Mesonoto com 5 riscas longitudinais na vista posterior, abdómen com tom metálico azul-escuro (fig.19.a), parte inferior da costa com cerdas para além da junção R1; 3 cerdas pos-sutural intra-alar; cerdas pré-sutural intraalar quase sempre presente (fig.19 c), palpos castanhos (fig.19.d).....(*Melinda gentilis*).



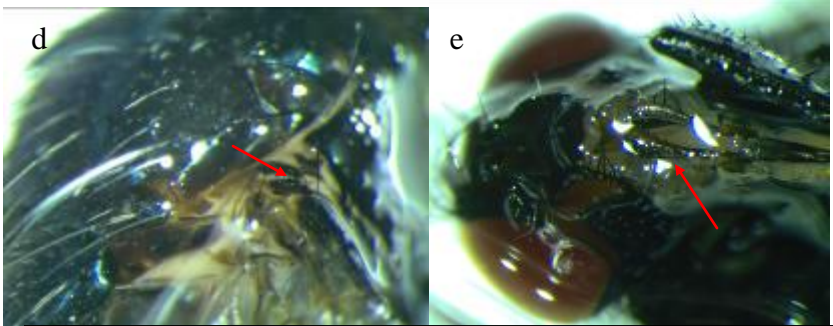


Fig.19) a) Adulto de *Melinda veridicyanea*, b) tórax com as cerdas prstia e postia, c) detalhe da cerda prstia d) basicosta e e) palpus (fotos de Neiva Centeio).

13)

-A tibia do meio tem 1cerda Antero-dorsal; fémur do meio e o fémur traseiro tem cerdas postero-ventrais amarelas; vestidura ventral do abdómen predominantemente preta.
*Pollenia angustigena*

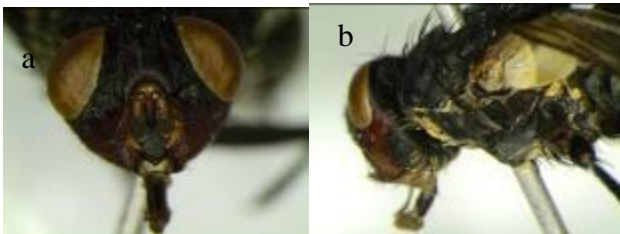


Fig.19) *Pollenia angustigena*. a)Cabeça; b)tórax (fotos de Neiva Centeio).

-fémur do meio e traseiro com cerdas postero-ventral pretas; vestidura ventral abdominal na maioria das vezes predominantemente preto.....*Pollenia rudis* (Fabricius)



Fig.20)*Polenia rudis* (fotos de Neiva Centeio).

IV

■ DISCUSSÃO

IV.1. Adultos

A família Calliphoridae é constituída por 17 géneros (Rognes, 1991). Neste trabalho foram identificados cinco géneros (*Calliphora*, *Lucilia*, *Chrysomya*, *Pollenia* e *Melinda*) sendo o género *Pollenia* o que apresentou maior dificuldade de identificação até à espécie. Muitas vezes as chaves dicotómicas são pouco precisas ou claras, além de nem sempre estarem disponíveis para os taxonomistas em acervos de fácil acesso (Amorim, 2009). Em relação aos restantes géneros mencionados pode-se observar que têm características específicas (cor do abdómen, ausência/presença de cerdas na veia tronco, a disposição de cerdas na parte inferior da costa, ausência/presença de coxopleuro entre outras características) que simplificaram o processo de identificação.

No domínio da espécie, a grande dificuldade foi na diferenciação entre as espécies *Lucilia illustris* e *Lucilia caesar*, uma vez que só a análise da genitália masculina permite a diferenciação específica.

No total foram observadas 12 espécies: *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758); *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794); *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Lucilia illustris* (Meigen, 1826); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda gentilis* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda veridicyanea* (Robineau-Desvoidy 1830); *Calliphora loewi* (Enderlein, 1903); *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922) e *Pollenia angustigena* (Wainwright, 1940).

Nos cadáveres de aves foram encontradas exclusivamente as espécies *Calliphora loewi* (Enderlein, 1903) e *Lucilia ampullacea* (Villeneuve, 1922) enquanto os mamíferos apresentaram espécies exclusivas de *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794); *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Pollenia angustigena* (Wainwright, 1940).

Relativamente ao ciclo de vida *C. vicina* quando comparado com outros estudos (Donovan *et al* 2006; Niederegger, *et al* 2010) pode-se observar que a duração do ciclo de vida foi relativamente maior (16 dias). Este resultado pode ter sido influenciado por flutuação de temperatura, visto o estudo ter sido feito sem controlo térmico. Segundo Donovan e colaboradores, para atingir um comprimento igual as larvas do presente estudo (15,5 mm), a uma temperatura controlada de 10°C, foram precisos 8 dias, enquanto neste estudo isso se verificou após 9 dias. De acordo com Niederegger *et al.*, 2010 as larvas demoraram 7 dias as atingir 15mm e o ciclo de vida teve uma duração de 14 dias numa temperatura controlada (13°C).

Os espécimes de *L. sericata* obtidos a uma temperatura de 18 °C demorara 5 dias a atingir 15,1mm e 15 dias para completar o ciclo de vida. Estes resultados são semelhantes quando comparados com outros estudos (Grassberger & Reiter 2001). Grassberger & Reiter 2001 fizeram estudos do efeito da temperatura no desenvolvimento de *L. sericata* e os resultados para 17°C e 19°C (temperaturas controladas), mostraram que ao quinto (19 °C) e sexto dia (17°C) foram observadas larvas de 15 mm de comprimento, e ao fim de 11 (19°C) e 15 dias (17 °C) o ciclo de vida se completava.

IV.2-Estádios imaturos – Ovo

Os ovos observados (de *Calliphora vicina* e *Lucillia sericata*) enquadram-se no padrão morfológico, típico da espécie, descritos por alguns autores (Pascal *et al.*, 2010,).

A análise comparada da morfologia dos ovos em MEV revelou diferenças importantes que podem ser usadas como ferramenta para identificar espécies encontradas em contexto forense. Os ovos apresentaram diferenças perceptíveis como a terminação do *plastron* (em forma de y em *Lucillia sericata* e arredondada em *Calliphora vicina*) e as *ilhas* dentro da área média que apresentavam anastomoses com características distintas: muitos orifícios em *C. vicina*, o que não se verificou em *L. sericata*. Contudo, os critérios quantitativos, comprimento médio do ovo da área média e anastomoses, não apresentaram diferenças significativas, revelando assim uma ineficácia como critérios para diferenciar os ovos de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*.

IV.3-Estádios imaturos - Larvas

Quando se trabalha com estádios imaturos (larvas), a tarefa de identificar espécimes torna-se ainda mais complexa, devido à escassez de trabalhos científicos e os caracteres apresentarem diferenças menos conspícuas, observadas quer na estrutura do esqueleto cefálico, quer na disposição e morfologia dos espiráculos, tubérculos e espinhos associados ao tegumento (Lopes, 1943; Amorim & Ribeiro.2001; Thyssen & Linhares 2007). As características morfológicas observadas nas larvas do presente estudo correspondem à descrição para a família Calliphoridae apresentadas por outros autores, nomeadamente: Stehr (1991); Costa &

Simonka (2006) e Florez & Wolff (2009). As larvas só apresentaram diferenças possíveis de especificar no 3º estágio de desenvolvimento. Em relação aos espiráculos anteriores e às bandas de espinhos não foram observadas diferenças evidentes que pudessem ser utilizadas na diferenciação específica. Contudo, os esqueletos cefalo-faríngeos apresentaram características distintas possibilitando uma identificação mais viável. As larvas de *Calliphora vicina* ao contrário de *L. sericata* apresentam o esqueleto cefalo-faríngeo com esclerito oral que pode ser observado em parte directamente à lupa (22.B). A presença de esclerito oral e a forma do esqueleto cefalo-faríngeo em larvas do género *Calliphora* já foi referenciado por outros autores (Florez & Wolff 2009, Delhaes *et al.*, 2001) como um meio de diferenciar *Calliphora vicina* de *Lucilia sericata*. Os espiráculos posteriores apresentam botão visível conforme alguns autores já tinham descrito (Delhaes *et al.*, 2001).

As diferenças no arranjo e volume dos tubérculos na região posterior da larva fazem com que este carácter seja muito conspícuo na distinção entre as duas espécies. Esta abordagem oferece um meio rápido de identificação das espécies (Velásquez *et al.*, 2010) A distância entre os tubérculos também serviu para diferenciar as duas espécies. As larvas de *Calliphora vicina* apresentaram maior distância entre os tubérculos dorsais internos enquanto as de *Lucilia sericata* apresentaram distância semelhante entre os tubérculos.

Em relação comparação às dimensões das larvas podemos observar que *Calliphora vicina* (15,568 mm) é ligeiramente maior que *Lucilia sericata* (15,135mm), não apresentando diferenças quando tratadas estatisticamente. Contudo, esse resultado pode ser erróneo visto o crescimento da larva variar em função da temperatura, do substrato

alimentar e outros factores (Grassberger & Reiter 2001; Clark *et al.*, 2006), não se tendo efectuado neste trabalho um estudo com temperaturas e substrato alimentar controlados.

Com base na análise estatística pode-se afirmar que a razão entre a distância e o diâmetro do espiráculo (1,5 para *C. vicina* e 1 para *L. sericata*) foi a variável que apresentou melhor resultado diagnosticante visto que apresentou diferenças para um nível de significância de 95%, podendo ser utilizada na diferenciação entre as duas espécies.

A microscopia electrónica de varrimento e óptica forneceram informações detalhadas sobre as características morfológicas ajudando a identificar os ovos e larvas destas duas espécies e, conseqüentemente, servem como uma ferramenta muito útil nas investigações criminais, pois na maioria dos casos apenas os estádios imaturos dos insectos são encontrados nos cadáveres.

Este estudo permitiu ainda recolher informação valiosa para o banco de dados nacional de espécies entomológicas com interesse forense. Servirá também de ferramenta (para por ex. determinar o tempo de morte e situação de negligência de animais em cativeiro) para as instituições envolvidas na protecção dos animais selvagem ou de espécies protegidas.

V

■ CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos no presente estudo podemos observar que a terminação do *plastron* e a presença/ausência de anastomoses são as características que melhor permitem diferenciar os ovos de *Calliphora vicina* e *Lucilia sericata*.

As imagens de microscopia óptica revelaram-se como um instrumento fiável para diferenciar espécies de Calliphoridae a partir de larvas, nomeadamente as diferenças ao nível do esqueleto cefalo-faríngeo (em *C. vicina* possui um esclerito oral característico) e dos espiráculos posteriores, estatisticamente diferenciados. O arranjo dos tubérculos também se revelou importante na diferenciação entre as duas espécies.

Com base no registo fotográfico obtido neste trabalho, foi possível a construção de uma chave dicotómica e uma base de imagens apresentando as espécies e as suas características mais evidentes que servirá de auxílio na identificação dos adultos das espécies estudadas.

Esta chave contém doze espécies que estão representadas por cinco subfamílias (Calliphorinae, Chrysomyinae, Luciliinae, Melanomyinae e Polleniinae): *Calliphora vomitoria* (Linnaeus, 1758); *Lucilia caesar* (Linnaeus, 1758); *Pollenia rudis* (Fabricius, 1794); *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819); *Lucilia illustris* (Meigen, 1826); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826); *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda gentilis* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Melinda viridicyanea* (Robineau-Desvoidy, 1830); *Calliphora loewi* (Enderlein, 1903); *Lucilia ampullacea*

(Villeneuve, 1922) e *Pollenia angustigena* (Wainwright, 1940). Foram ainda identificadas fotograficamente as características de ovos e larvas que melhor permitem a distinção entre *C. vicina* e *L. sericata*. Estes registos irão contribuir para a base de dados do projecto em que o trabalho se inseriu.

Em relação a perspectivas futuras, é importante que sejam realizados mais estudos sobre as espécies de artrópodes associados a cadáveres para que Portugal tenha uma base de dados completa. É também necessária mais investigação sobre diferenciação específica de estádios imaturos, visto serem as formas que mais frequentemente ocorrem nos cadáveres. Nesta área, é também crucial que sejam feitos ensaios sobre o desenvolvimento larvar dos principais insectos necrófagos, usando o clima de Portugal como referência.

Uma das principais aplicações da entomologia forense da vida selvagem está voltada para a caça. Um dos problemas quando se investiga a caça ilegal de espécies selvagens é a descoberta de carcaças em estágios avançados de decomposição com pouca informação sobre a hora da morte. A estimativa do tempo de morte pode ser utilizada em tribunal como provas em situações de caça ilegal para determinar se o animal foi abatido por um caçador no período legal. Para o cálculo desta estimativa é importante o estudo de insectos necrófagos associados a cadáveres de animais silvestres. Portanto, inventariar as espécies que colonizam carcaças, e estimar possíveis IPMs a partir do estado de decomposição do animal, fornece suporte aos órgãos fiscalizadores responsáveis pela manutenção do bem-estar da fauna silvestre.

VI

■ REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, Z. J. O & Hall, M. J.R (2003). Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on post-mortem larval length. Department of Entomology, The Natural History Museum. United Kingdom. *Forensic Science International* 138: 50–61

Álvares, F. (2003). O envenenamento ilegal e a agonia da fauna selvagem portuguesa *Tribuna da Natureza nº14*. [em linha, consultado 14 de Abril de 2011]. Disponível em:

<http://www.antidotoportugal.org/portal/PT/64/DID/3/default.aspx#>

Amendt, J.; Campobasso, C. P. ; Gaudry, E; Reiter, C.; Le Blanc, H. N. & Hall M. J. R (2007). Best practice in forensic entomology—: Standards and guidelines: *International Journal of Legal Medicine* .121:90-104

Amendt, J.; Krettek, R.; Niess, C.; Zehner, R. & Bratzke, H. (2000). Forensic entomology in Germany. *Forensic Science International*. 113: 309-314

Amendt, J.; Krettek, R. & Zehner, R (2004). "Forensic entomology". *Naturwissenschaften*. 91:51-65

Amorim, J. A. (2009). Levantamento de sarcófagídeos (Diptera) do Brasil incluindo a caracterização molecular e *Peckia (Pattonella) intermutans* (walker). *Dissertação de mestrado*. Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP 89pp

Amorim, J. A. & Ribeiro O.B. (2001). Distinction among the Puparia of Three Blowfly Species (*Diptera: Calliphoridae*) Frequently Found on Unburied Corpses. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 96: 781-784

Anderson, G.S. (2000). Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). *Journal of Forensic Sciences* 45: 824-832

Anderson, G.S. (2004). Determining time of death using blow fly eggs in the early postmortem interval. *International Journal of Legal Medicine*.118 : 240–241

Ashworth, J.R. & Wall, R. (1994). Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits. *Med Vet Entomol* 8:303–309 In: Gruner, S. V. (2004). The forensically important Calliphoridae (insecta: Diptera) of pig carrion in rural north-central Florida. *A thesis University of Florida*.98pp

Azevedo Filho, W. S. ; Castro, L. A.S; Botton, M & Nava, D. E.(2008). Técnicas de preparação de amostras para estudos de insectos com microscópio eletrônico de varredura. Pelotas, RS *Documentos* 230:43pp

Benecke, M. (1998). Six forensic entomology cases: Description and commentary. *Journal of Forensic Science*, 43 (4): 797-805

Brandão, R. M. L. (2005). Antídoto Portugal. Uso Ilegal de Venenos. Nº1 do boletim Santo Huberto – CNCP. [em linha, consultado 14 de Abril de 20011]. Disponível em:

<http://www.antidoto-portugal.org/portal/PT/64/DID/3/default.aspx#>

Byrd, J.H. & Castner J.L. (editors) (2001). *Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigation*. New York: CRC Press.418pp

Campobasso, C.P. & Introna, F.(2001).The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. *Forensic Science International*. 120: 132-139

Carreira, G. A.; Arantes, L. C.; Lima, L. H. C. & Queiroz, P. R. (2008). Levantamento e caracterização da dipterofauna necrófaga em uma localidade de Brasília. *Universitas: Ciências da Saúde*., Brasília, v. 6: 87-102

Carvalho, C.J.B. & Mello-Patiu, C.A. (2008). Key to the adults of the most common forensic species of Diptera In: South America. *Revista Brasileira de Entomologia*. 52(3): 390-406

Castro, C. P; Arnaldos, M. I. & García, M.D. (2009). Additions to the Calliphoridae (Diptera) fauna from Portugal, with description of new records. *Boln. Asoc. esp. Ent.*, 33 (3-4): 425-437

Castro, L. A. S. (2001). Técnicas de Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. *Documentos*. 93:11-17

Catts, E. P & Haskell, N.H. (1997). *Entomology and Death: A Procedural Guide*. Joyce's Print Shop. Clemson, South Carolina, 183 pp. In Vanegas, S. Z. Y. (2006). *Revista Luna Azul* .23:42-49

Clark, K.; Evans, L. & Wall, R. (2006). Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Science International* 156: 145–149

Costa, C. S. & Simonka, C. E. (2006). *Insetos imaturos: metamorfose e identificação*. Hollos Editora, 249p. In: Florez, E.; Wolff, M (2009) Description and Key to the Main Species of Calliphoridae (Diptera) Larvae of Forensic Importance from Colombia. *Neotropical Entomology* 38(3):418-429

Cragg, J. B. & Cole, P. (1956.) Laboratory studies on the chemosensory reactions of blowflies. *Annals Applied Biology*. 44: 478-491. In: Gruner, S.V. (2004) The forensically important Calliphoridae (insecta: diptera) of pig carrion in rural north-central Florida. *A thesis. University of Florida* .98pp

Cranston, W. A. (2008). Survey of forensically-important Calliphoridae in Kingston and St. Andrew, Jamaica, West Indies. *A Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College*.102pp

Delhaes, L.; Bourel, B; Scala, L; Muanza, B; Dutoit, E; Wattel, F; Gosset, D; Camus, D. & Dei-cas, E. (2001). Case report: recovery of *Calliphora vicina* first-instar larvae from a human traumatic wound associated with a progressive necrotizing bacterial infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 64(3, 4): 159–161

Donovan, S. E.; Hall, M. J. R.; Turner, B. D. & Moncrieff, C. B. (2006). Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Medical and Veterinary Entomology*. 20: 106–114

Florez, E. & Wolff, M. (2009) .Description and Key to the Main Species of Calliphoridae (Diptera) Larvae of Forensic Importance from Colombia. *Neotropical Entomology* 38(3):418-429

Gennard, D.E. (2007). *Forensic Entomology: An introduction*. John Wiley & Sons. Lincoln. 254pp

Goff, M.L. (2001). *A fly for the prosecution. How insect evidence helps solve crimes*. Harvard University Press. London. 225pp

Gonder, F. C. (2008). *Wildlife decomposition in west central montana: a preliminary study conducted to provide field investigation material and training for wildlife officers*. The University of Montana.1006pp

Grassberger, M. & Reiter, C. (2001). "Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram". *Forensic Science International*. 120: 32-36

Gruner, S.V., Slone, D.H. & Capinera, J.L. (2007). Forensically important Calliphoridae (Diptera) associated with pig carrion in north-central Florida. *Journal of Medical Entomology* 44(3): 509-515

Gusmão, J B (2008). Estudo preliminar da sucessão entomológica (com ênfase na ordem Diptera) em diferentes cadáveres de animais selvagens na Serra da Estrela. *Tese de mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa*. Lisboa.55pp

Hall, D.G. (1948). *The Blow Flies of North America*. Baltimore: Monumental Printing Company In: Cranston, W. A. (2008). Survey of forensically-important Calliphoridae in Kingston and St. Andrew. *A thesis. Louisiana State University*.102pp

Hall, M. J.R; Farkas, R. ; Kelemen, F ; Hosier, M. & El-Khoga J. M. (1995). Orientation of agents of wound myiasis to hosts and artificial stimuli in Hungary. *Medical and Veterinary Entomology*. 9: 77-84Jamaica, West Indies. *A Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College*.102pp

Introna, F.; Campobasso, C P & Goff, M L (2001). "Entomotoxicology". *Forensic Science International*. 120: 42–47

Jaques, G S (2005). Identificação de espécies de animais usando sequências de genes mitocondriais no combate aos crimes contra a fauna. *Dissertação de mestrado. Universidade Católica de Brasília*. Brasil

Keh, B. (1985). Scope and applications of forensic entomology. *Annual Review of Entomology*. 30:137-54. In: Watson, E.J. G. (2004). Faunal succession of necrophilous insects associated with high-profile wildlife carcasses in Louisiana. *A Dissertation. B.A. Western Washington University*. 212pp

Leite, A.C.R. & Lopes, H.S. (1989). Scanning electron microscopy of the first instar larvae of *Sarcodexia lambens* and *Peckia chrysostoma* (Diptera: Sarcophagidae). *Memória do Instituto. Oswaldo Cruz* 84 (4): 307-309

Lopes, H. S. (1943). Contribuição ao conhecimento das larvas dos Sarcophagidae com especial referência ao esqueleto cefálico (Díptera). *Memória do Instituto. Oswaldo Cruz* 38 (2): 127-163

Mendonca, P.M; Santos-mallet, J.R; Mello, R.P; Gomes L. & Queiroz M.M.C. (2008). Identification of fly eggs using scanning electron microscopy for forensic investigations *Micron* 39 : 802–807

Meyer, John R. (2007). Forensic Entomology. Department of North Carolina University In: Cranston, W. A. (2008). Survey of forensically-important Calliphoridae in Kingston and St. Andrew, Jamaica, West Indies. *A Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College*. 102pp

Niederegger, S. ; Pastuschek, J. & Mall, G. (2010). Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Science International*. 7pp

Oliveira, C. J. (2007). Entomologia Forense. Quando os insetos são vestígios. Editora Millennium. Campinas, São Paulo In: Amorim, J. A. (2009) Levantamento de sarcófagos (diptera) do Brasil incluindo a caracterização molecular de *Peckia (pattonella) intermutans* (Walker) *Dissertação. Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP* 89pp

Osterbroek, P. (2006). *The European Families of the Diptera. Identification, diagnosis biology*. KNNV Publishing, Utrecht. 205 pp

Pascal, N. U.; Arnaldos, I.; López, E. R.; & García M.D. (2010). Microscopy and forensic entomology. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*.1548-1556

Putman, R. J (1978). The role of carrion frequenting arthropods in the decay process. *Ecological Entomology*, 3: 133-139. In: Cranston, W. A. (2008). *Survey of forensically-important Calliphoridae in Kingston and St. Andrew, Jamaica, West Indies. A Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College*.102pp

REED, H. B. JR. (1958). A study of dog carcass communities' in Tennessee, with special reference to the insects. *The American Midland Naturalist Journal*, 59: 213-245 In: Silva, A Z; Anjos, V A; Ribeiro, P.B; Krüger, R. F (2010). Ocorrência de muscóideos necrófagos em carcaça de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Didelphimorphia, Didelphidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biotemas*, 23 (2): 211-214

Rognes, K. (1991) *Blowflies (díptera, Calliphoridae) of fennoscandia and denmark* .*Fauna Entomologica Scandinavica*. E.J..Brill/Scandinavian science Press Ltd.Leiden.New York. 24:272pp

Scudder, G.G.E. & Cannings R.A. (2006) -*The Diptera Families of British Columbia*.157pp [em linha, consultado 14 de Maio de 20011]. Disponível em: http://www.for.gov.bc.ca/hfd/library/fia/2006/fsp_y062001b.pdf

Silva, A. Z.; Anjos, V. A.; Ribeiro, P. B. & Krüger, R. F. (2010). Ocorrência de muscóideos necrófagos em carcaça de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Didelphimorphia, Didelphidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Biotemas*, 23 (2): 211-214

Silveira, M. (1989). Preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura. São Paulo: USP, V. 1, 71-79 p. In: Castro, L. A. S. (2001). Processamento de amostras para microscopia eletrônica de varredura. *Documentos*, 93:17

Smith, K.G.V. (1986). *A Manual of Forensic Entomology*, London: Trustees of the British Museum (Natural History) and Cornell University Press. Ithaca, USA, 205pp *In*: Andrio, Z. (2010) Ocorrência de muscóideos necrófagos em carcaça de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Didelphimorphia, Didelphidae) no Rio Grande do Sul. Brasil *Biotemas*. 23 (2): 211-214.

Smith, K.G.V. (1986). *A Manual of Forensic Entomology*, London: Trustees of the British Museum (Natural History) and Cornell University Press *In*: Cranston W A (2008). Survey of forensically-important Calliphoridae in Kingston and St. Andrew, Jamaica, West Indies. *A Thesis. Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College*. 102pp

Stehr, F (1991) *Immature insects*. Vol 2, Kendall/Aunt Publishing Company, Iowa, 975p. *in*: Florez, E.; Wolff, M (2009) Description and Key to the Main Species of Calliphoridae (Diptera) Larvae of Forensic Importance from Colombia. *Neotropical Entomology* 38(3):418-429

Stevens, J.& Wall, R. (2001) Genetic relationships between blowflies (*Calliphoridae*) offorensic importance. *Forensic Science International*, [S.l], . 120: . 116-123

Sukontason, K.L. & Pingjai, S. (2003.) Scanning electron micorscopy of the third instar sarcophagid (Diptera: Sarcophagidae) recovered from a mummified human corpse in Thailand. Differentiation of the third Instar of forensically important fly species in Thailand. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 45(2):95-98

Taylor, V. J. & Dustone, N. (1996). The exploitation of mammal populations. Chapman e Hall. Londres, Reino Unido, 415pp

Velásquez, Y; Magaña, A.C; Martínez -sánchez, A. &. Rojo, S. (2010). Diptera of forensic importance in the Iberian Peninsula: larval identification key. *Medical and Veterinary Entomology* 24, 293–308

Szpila, K. (2010). *Key for identification of European and Mediterranean blowflies (Diptera Calliphoridae) of forensic importance adult flies*. Nicolau Copernicus University. Institute of Ecology and environmental Protection. 12pp

Szpila, K. (2010). *Key to families of the european Diptera of forensic importance*. Nicolau Copernicus University. Institute of Ecology and environmental Protection. 8pp.

Thyssen, P.J. & Linhares A.X. (2007). First description of the immature stages of *Hemiluciliasegmentaria* (Diptera: Calliphoridae). *Biol. Res.* 40: 271-280

Vanegas, S. Z. Y. (2007), Entomología forense: los insectos en la escena del crimen. *Manizales* .42-49

Wall, R., C. H. Green, N. French, & K. L. Morgan. (1992). Development of an attractive target for the sheep blowfly *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*. 6: 67-74. In: Gruner, S. V. (2004) The forensically important Calliphoridae (insecta: Diptera) of pig carrion in rural north-central Florida. *A thesis University of Florida*.98pp

Watson, C. (2003). Spring succession of necrophilous insects on wildlife carcasses in Louisiana. *Journal of Medical Entomology*. 40 (3) 338-347.

Watson, E. J. & Carlton, C. E. (2005). Insect succession and decomposition of wildlife carcasses during fall and winter in Louisiana. *Journal of Medical Entomology*, 42 (2): 193-203

Watson, E.J. G. (2004). Faunal succession of necrophilous insects associated with high-profile wildlife carcasses in Louisiana. *A Dissertation. B.A. Western Washington University*.212pp