



**UniCEUB**

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

# **ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE ESPÉCIES DE DIPTERA DE INTERESSE FORENSE.**

**VICTOR BRUZZI MORAIS CÂNDIDO**

Relatório Final do Programa de Iniciação  
Científica PIC/UniCEUB.

Orientador: Prof. Paulo Roberto Queiroz da  
Silva (UniCEUB)

Brasília – 2º/2008

## RESUMO

A entomologia (entomo = insetos, logos = estudo) compreende o estudo dos insetos, suas fases de desenvolvimento e sua ecologia. Dentro dessa área destaca-se a entomologia forense que consiste na aplicação dos conhecimentos de entomologia como ferramenta auxiliar a solução de crimes. Este estudo não se caracteriza por ser apenas uma coleta de dados e análises morfológicas, pois tem um interesse acadêmico visto que na disciplina de criminalística essas características são de particular interesse principalmente, em casos onde todas as técnicas de perícia são insuficientes para se chegar a convicções finais a respeito da seqüência de eventos que acompanham um fato delituoso. Os dados gerados nesse estudo servirão como um facilitador no processo de identificação e triagem dos animais envolvidos nesse contexto, Este projeto contribui também para suprir a falta de material didático qualificado, escrito em nossa língua, para estudantes de graduação e áreas associadas, visando auxiliar todos aqueles que tenham interesse sobre práticas em ciências forenses. Para a coleta dos insetos de interesse forense foi utilizada uma armadilha montada utilizando-se duas garrafas transparentes do tipo PET de 2,0 L. Com o término das coletas foram escolhidos os indivíduos em melhor estado de conservação para realizar a extração do DNA, para estabelecer uma coleção de ácidos nucléicos obtidos a partir de insetos de interesse forense para servir de base para estudos moleculares. Após o processamento e o armazenamento de todas as informações geradas no projeto, foi elaborada uma cartilha didática ilustrada de nível acadêmico para auxiliar no ensino da entomologia forense e na identificação morfológica das espécies para utilização no ensino superior.

Palavras-chave: Entomologia forense; Diptera; Cartilha didática.

## 1. INTRODUÇÃO

A entomologia (entomo = insetos, logos = estudo) compreende o estudo dos insetos, suas fases de desenvolvimento e sua ecologia. Dentro dessa área destaca-se a entomologia forense que consiste na aplicação dos conhecimentos de entomologia como ferramenta auxiliar a solução de crimes, colaborando significativamente na estimativa do intervalo *post mortem* (IPM), ou seja, na determinação da estimativa do tempo transcorrido após a morte (Miranda *et al.*, 2006). Ela pode também indicar se o corpo foi deslocado de um local para outro após a morte, como eram as condições de higiene em casos de crimes associados a maus tratos a idosos, crianças ou inválidos, se há presença de drogas ou veneno no cadáver, ou ainda, em crimes contra a economia de um país (por exemplo, na área agrícola), se uma praga exótica (espécie até então inexistente no país ou região) foi introduzida através de portos/fronteiras.

A divulgação dessa ciência é quase inexistente e em razão disso, dados entomológicos importantíssimos são completamente ignorados e, conseqüentemente, informações valiosas se perdem. Na realidade, até agora pode se dizer que a perícia médico-legal baseia-se, ainda quase exclusivamente, na observação atenta das alterações macroscópicas que se sucedem na decomposição dos corpos, sujeitas a inúmeras causas de variação, umas acelerando sua sucessão e outras retardando. O presente trabalho teve como finalidade divulgar essa ciência, a fim de alterar esse quadro (Oliveira Costa, 2004).

## 2. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

Os conhecimentos entomológicos podem ser aplicados, por exemplo, no campo da medicina-legal. Após a morte, o corpo passa por diferentes estágios de decomposição (entre eles, queda de temperatura, rigidez, fase gasosa e putrefação) e cada um deles atrai diferentes espécies de insetos que visitam, alimentam-se e/ou utilizam os cadáveres para depositar seus ovos ou larvas. Associando-se o conhecimento sobre a sucessão das espécies (principalmente, das moscas) ao tempo de desenvolvimento de cada espécie podem-se fazer inferências a respeito do IPM. As espécies de insetos necrófagos (que se alimentam de cadáveres) variam de região para região e

fatores como temperatura e umidade influenciam no tempo de desenvolvimento. Portanto, é necessário um detalhado levantamento das espécies locais e um conhecimento adequado sobre a biologia de cada uma delas para se estimar o IPM. A fauna cadavérica é descrita a partir de experimentos com carcaças de animais (porcos, coelhos, ratos, entre outros animais), a influência das condições climáticas sobre o desenvolvimento dos insetos é examinada criando-os em laboratório em diferentes temperaturas e umidades. Nas primeiras horas ou primeiros dias após a morte a necropsia pode estimar com certa precisão o IPM. Mas com o passar do tempo, estágios mais avançados de decomposição reduzem significativamente a precisão do IPM estimado pelo exame cadavérico feito pelo Instituto Médico-Legal. Por outro lado, de modo geral, quanto mais tempo tiver transcorrido desde a morte, mais precisa é a estimativa do IPM feita pela entomologia forense. A estimativa do IPM e a sua acurácia são extremamente relevantes na investigação criminal. Ela pode, por exemplo, restringir a busca por informações sobre as circunstâncias do crime a um período de tempo de algumas horas ou dias e pode também ser utilizada para a verificação de depoimentos tomados e de álibis oferecidos.

De acordo com Oliveira Costa (2004) o local do crime está baseado na distribuição geográfica, habitat natural e biologia das espécies coletadas na cena da morte, é possível verificar o local onde a morte ocorreu. Por exemplo, certas espécies de dípteros da família Calliphoridae são encontradas em centros urbanos. E, em vista disso, a associação dessas espécies a corpos encontrados em meio rural sugere que a vítima tenha sido morta no centro e levada para o ponto onde foi encontrada. Da mesma forma que, algumas moscas apresentam habitat específico, além de distinta preferência em realizar posturas em ambientes internos ou externos e, até mesmo, em diferentes condições de sombra e luz.

Este conhecimento pode auxiliar no estabelecimento do perfil genético e na identificação de marcadores que apontem para populações específicas de insetos. Seguindo-se essas novas demandas para a área de entomologia forense já foram descritas a identificação molecular de dípteros e coleópteros pela técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso – RAPD (Benecke, 1998). A técnica de RAPD (Williams *et al.*, 1990) tem sido muito utilizada por apresentar características que permitem a obtenção de um grande número de

informações para a análise de genomas onde pouco se conhece a respeito de sua composição, uma vez que, emprega a utilização de um único oligonucleotídeo de seqüência arbitrária com potencial de reconhecer regiões desconhecidas do genoma alvo. Os marcadores RAPD se baseiam na amplificação do DNA, gerando informações com simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo, na forma de segmentos de DNA, podem ser obtidos em curto espaço de tempo. Para que haja a amplificação de um fragmento RAPD duas seqüências de DNA complementares ao iniciador devem estar adjacentes (a menos de 4 kb) e em orientação oposta, para permitir a amplificação pela enzima *Taq* DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Uma característica deste tipo de marcador é o seu comportamento como marcador genético dominante. Lembrando que a dominância, neste caso, não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo loco e sim a interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (Ciampi & Magalhães, 2001). A importância dessa técnica reside no fato de poder fornecer informações básicas para o emprego e seleção de novas estratégias de análise de DNA a partir das famílias de insetos de importância forense, por exemplo, o uso do PCR-RFLP (Polimorfismo nos fragmentos de restrição amplificados pela reação em cadeia de polimerase) para a distinção de *Lucilia* e *Calliphora vicina* (Malgorn e Coquoz, 1999), o uso do rDNA 18S (DNA ribossomal unidade 18S) para estudos filogenéticos entre espécies de califorídeos de importância forense na Europa e Grã-Bretanha (Stevens and Wall, 2001), o uso do mtDNA (DNA mitocondrial) para a identificação de espécies pertencentes aos gêneros *Cochliomyia* e *Chrysomyia* presentes na entomofauna dos Estados Unidos e Canadá (Wells e Sperling, 2001), a distinção entre *Calliphora dubia*, *Chrysomya rufifaciens* e *Lucilia sericata* na Austrália usando o gene de mtDNA citocromo oxidase I (Harvey *et al.*, 2003) e o sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) para estudos moleculares e evolutivos de califorídeos de importância médica e forense, tais como, *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae) (Junqueira *et al.*, 2004). No Brasil, em função da sua extremamente elevada biodiversidade com espécies entomológicas específicas, faz-se necessária a caracterização molecular para a identificação e a tipagem dessas principais espécies de insetos de interesse forense, uma vez que, a proposta de estudos da biodiversidade de Diptera no Cerrado é um passo inicial em direção ao

conhecimento mais amplo desse grupo de insetos de interesse na área forense. O entendimento mais aprofundado da ecologia dos grupos a serem enfocados permitirá gerar ferramentas tais como: bioindicadores de qualidade ambiental, utilização de técnicas moleculares para a solução de problemas taxonômicos e de ciências forenses.

### 3. OBJETIVOS:

#### **3.1 Objetivo Geral**

Estudar as populações de Diptera de ocorrência no Distrito Federal com base em aspectos taxonômicos, moleculares e ecológicos visando gerar ferramentas que auxiliem na investigação criminal.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Realizar a identificação taxonômica e o monitoramento de entomofauna de interesse forense no Distrito Federal.

Estabelecer uma coleção de ácidos nucléicos obtidos a partir de insetos de interesse forense para servir de base para estudos moleculares.

Desenvolver uma cartilha didática para auxiliar no ensino acadêmico do conteúdo relacionado a entomologia forense.

### 4. JUSTIFICATIVA

A identificação de espécies de artrópodos encontrados no local de crime ou em corpos é essencial, mas difícil de ser realizada em termos de morfologia. Soma-se a tudo isso, o número elevado de espécies, a escassez de profissionais habilitados no assunto, a presença de sutis diferenças morfológicas entre as espécies e as características das formas imaturas. O presente estudo não se caracteriza por ser apenas uma coleta de dados e análises morfológicas, pois tem um interesse acadêmico visto que na disciplina de criminalística essas características são de particular interesse principalmente, em casos onde todas as técnicas de perícia são insuficientes para se chegar a convicções finais a respeito da seqüência de eventos que acompanham um fato delituoso. Os dados gerados nesse estudo servirão como um facilitador no processo de identificação e triagem dos animais

envolvidos nesse contexto. Dessa forma, torna-se imperioso o desenvolvimento de estratégias moleculares baseadas em DNA para a identificação das principais espécies de interesse forense. Este projeto poderá contribuir para suprir a falta de material didático qualificado, escrito em nossa língua, para estudantes de graduação e áreas associadas, visando auxiliar todos aqueles que tenham interesse sobre práticas em ciências forenses.

## 5. METODOLOGIA

O universo de espécies de dípteros necrófagos do Distrito Federal serão amostrados por técnicas distintas e complementares.

### 5.1 Amostragem de adultos

A coleta para insetos adultos foi realizada a partir da instalação de armadilhas (Figura 1) para a coleta de insetos adultos em área de vegetação que compõe o ecossistema encontrado no Distrito Federal (latitude 15°46'8.94" S e longitude 47°53'48.65" O), onde aqueles foram atraídos por dieta rica em proteína animal em diferentes estágios de decomposição. As armadilhas foram monitoradas a intervalos de tempo definidos de 24 h no período de 27 de fevereiro de 2008 a 5 de maio de 2008 e os insetos capturados foram levados até o laboratório para identificação taxonômica e molecular. O vasilhame contendo os insetos foi levado para o congelador, a uma temperatura de 4 °C e, depois, os mesmos foram contados e transferidos para potes herméticos contendo álcool 70 % e uma etiqueta manuscrita com a data e o número de indivíduos coletados. Nesse período, também foram observados alguns aspectos meteorológicos, tais como, temperatura, umidade relativa e índice pluviométrico que foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia de Brasília (INMET).

Ao final do período de coleta, as amostras em álcool foram levadas ao laboratório e os indivíduos foram identificados, separados e contados por família com o uso da lupa estereoscópica e da chave dicotômica para a identificação de famílias de Diptera (Borror e DeLong, 1969). Os dados foram então organizados em uma tabela com o número de indivíduos separados por família, dia da coleta e as condições climáticas.

### 5.2 Montagem de armadilha utilizando material reciclável do tipo PET

Para a coleta dos insetos de interesse forense foi utilizada uma armadilha montada utilizando-se duas garrafas transparentes do tipo PET de 2,0 L conforme as orientações da figura 1.



Figura 1 – Montagem de armadilha de material reciclável utilizando garrafas do tipo PET para a coleta de insetos de interesse forense.

### 5.3 Extração de DNA

O DNA das amostras foi extraído submetendo-se um espécime inteiro à maceração e, a seguir, adicionando-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3 % e Proteinase K 120  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), incubando-se por 30 min a 65  $^{\circ}\text{C}$  (Lima *et al.*, 2000). O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e, o sobrenadante, transferido para um tubo plástico. Procedeu-se a uma purificação com 500  $\mu\text{L}$  de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 5 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e a 10  $^{\circ}\text{C}$  e a fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se o procedimento. O DNA foi precipitado pela adição de 30  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 2 h a - 20  $^{\circ}\text{C}$ . Após centrifugação a 10.000xg por 10 min a 10  $^{\circ}\text{C}$ , o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70 %, seco à temperatura ambiente e ressuspensão em TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8 e EDTA 0,1 mM) e armazenado a - 20  $^{\circ}\text{C}$ . Para as



análises de RAPD, utilizou-se o DNA diluído 10 X em TE 0,1 X (Queiroz *et al.*, 2004).

#### Reação de PCR utilizando DNA mitocondrial

As reações de amplificação foram realizadas em 25  $\mu\text{L}$  de uma mistura contendo 13,6  $\mu\text{L}$  de água milliQ autoclavada, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão 10 X (Amersham), 1,5  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (IDT, Inc., Coralville, IA) na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{L}$  dNTP's 10 mM, 0,4  $\mu\text{L}$  *Taq* DNA polimerase (Amersham) 1  $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e 5,0  $\mu\text{L}$  de DNA (100 ng).

A seqüência dos *primers* direto e reverso que foram usados nas reações de amplificação do gene COI do DNAmT das espécies de dípteros da família Calliphoridae seguiram as descrições propostas por Harvey *et al.* (2003a).

#### Condição de PCR para a amplificação do DNA mitocondrial

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research) contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C, programado para 35 ciclos de desnaturação de 1 min a 94 °C, anelamento por 1 min a 48 °C e extensão por 1 min a 72 °C e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C conforme metodologia descrita por Harvey *et al.* (2003a).

#### Visualização dos fragmentos resultantes de PCR

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5 % submerso em tampão TBE 1 X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM), fotografados e arquivados no sistema Eagleeye. Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp - GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados. A visualização das bandas foi feita por imersão em solução corante contendo 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  por 30 min, seguindo-se a retirada do excesso de corante em água destilada por 30 min.

## 6. RESULTADOS

Ao longo dos três meses de coleta utilizando-se armadilhas montadas a partir de garrafas plásticas recicláveis foram coletados 5682 indivíduos, que com a ajuda da chave dicotômica de Borrer & Delog (1969) foram identificados para as Famílias Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae e outras (Figura 2).

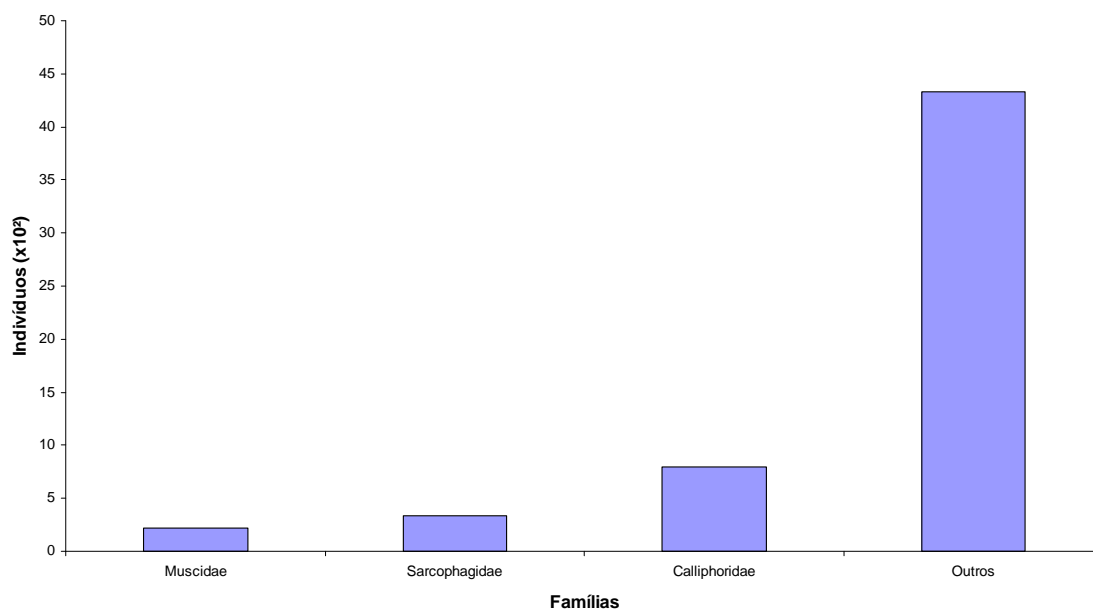


Figura 2: Distribuição das três principais famílias de Diptera de interesse forense coletadas em armadilhas de material reciclável ao longo de três meses de coleta em uma área de cerrado em ambiente urbano.

Observou-se que as famílias Muscidae e Sarcophagidae apresentaram as menores distribuições relativas enquanto que a família Calliphoridae apresentou a maior distribuição. Além disso, houve grande coleta de insetos pertencentes a outras famílias, provavelmente, por coleta acidental. Contudo, maiores estudos poderão ser realizados para o maior entendimento dessas outras espécies.

Em seguida, foi feita a análise da distribuição dessas espécies ao longo do período de monitoramento considerando-se as influências exercidas pelas variáveis ambientais (Figura 3).

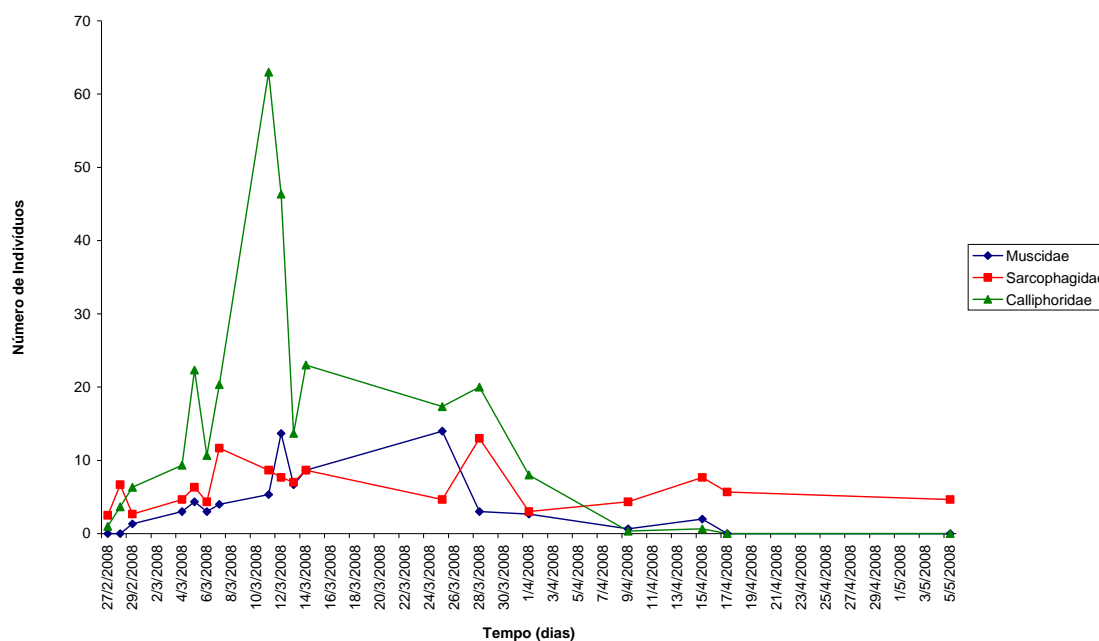


Figura 3: Distribuição das três famílias de Diptera de interesse forense em uma área de cerrado ao longo de três meses de monitoramento.

Observou-se que a Família Calliphoridae apresentou pico de coleta no período de 06 de março de 2008 a 14 de março de 2008 e com redução no número total desses indivíduos no dia 17 de abril de 2008. Para os Muscidae houve uma menor distribuição em relação aos indivíduos da família Calliphoridae no mês de março, mantendo-se esse padrão durante todo o período de coleta com queda no número total de indivíduos no dia 17 de abril de 2008. Contudo, para os Sarcophagidae não houve nenhum pico relativamente significativo ao longo do período das coletas, porém foi a única Família que apresentou distribuição ao longo de todo o período de monitoramento, obtendo-se coletas até no último dia, ou seja, em cinco de maio de 2008.

Em seguida, analisou-se a influência dos fatores ambientais na distribuição das famílias de Diptera de interesse forense (figura 4).

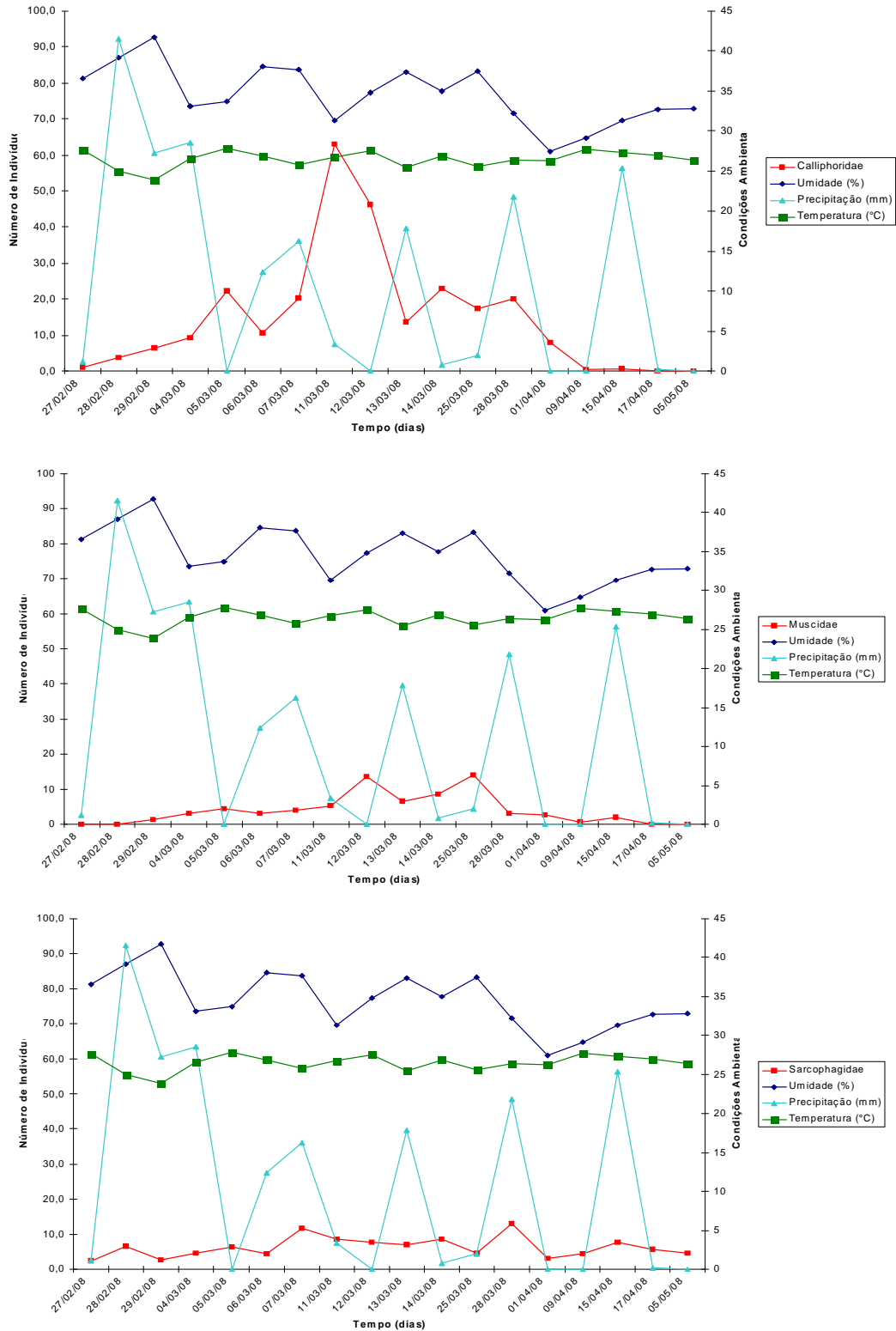


Figura 4: Distribuição dos indivíduos de três famílias de Diptera de interesse forense atuando em isca em decomposição, associando-se com três variáveis ambientais presentes durante todo o período de coleta. Os dados referentes às condições ambientais foram obtidos no INMET.

Considerando-se as variáveis ambientais observou-se que a temperatura oscilou na faixa dos 27 °C durante todo o experimento e não houve interferência marcante dos extremos de temperatura em relação ao número de indivíduos que freqüentaram a isca feita com material em decomposição. Contudo, para as temperaturas anotadas observou-se que os indivíduos da família Calliphoridae apresentaram os maiores valores relativos de coleta, indicando maior adaptação a esses valores de temperatura. O mesmo princípio aplicado para a variável temperatura foi observado para a ação da umidade relativa do ar, onde não se observou influência determinante no comportamento dos insetos das três famílias de Diptera que foram analisadas. A análise dos dados sugere que o índice pluviométrico possa exercer algum nível de influência em relação ao comportamento de coleta. Contudo, isso é mais provável nos estágios intermediários de decomposição da isca. Nos estágios inicial e final do experimento não foi possível fazer tal correlação.

Com esse modelo de simulação foi possível observar as etapas de sucessão de Diptera sobre a matéria em decomposição. O ápice de coleta para Calliphoridae foi no dia 11 de abril de 2008, com intervalo de ação entre os dias cinco de março de 2008 a nove de abril de 2008. Para Muscidae, o ápice foi no dia 13 de março de 2008, com intervalo de ação de 12 de março de 2008 a primeiro de abril de 2008. Já Sarcophagidae apresentou intervalo contante de coleta entre os dias seis de março de 2008 a primeiro de abril de 2008.

Dessa forma, a atratividade da isca deve exercer maior impacto no comportamento desses insetos. Provavelmente, há que se desenvolver maiores estudos para se determinar o quanto dos fatores ambientais em associação com o estágio de decomposição podem influenciar na ação dos insetos nesse modelo de simulação.

Com o término das coletas, foram escolhidos vários indivíduos da família Calliphoridae para extração de DNA visando o estabelecimento de uma coleção de ácidos nucléicos de interesse forense para servir de base para estudos moleculares futuros. Testando-se os iniciadores de PCR para o gene da citocromo oxidase I mitocondrial obteve-se o perfil eletroforético para as espécies de Diptera da família Calliphoridae que foram coletadas ao longo do período de monitoramento.

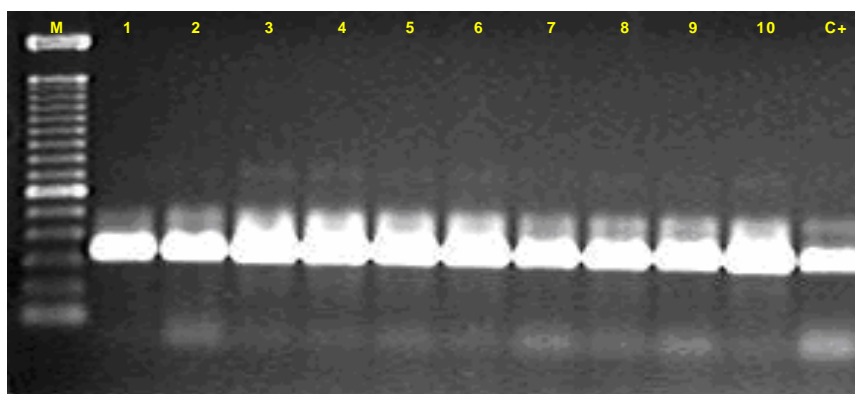


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio indicando a amplificação de uma região parcial do gene COI do DNAMt de algumas espécies de diptera da família Calliphoridae. Em 1, marcador de massa molecular (100 bp DNA Ladder, INVITROGEN); de 2 a 10, indivíduos de Calliphoridae; C+, controle positivo correspondente a seqüência de DNA do fragmento do gene da citocromo oxidase I clonado no plasmídio pGEM-T.

A visualização do gel em agarose mostrou que todos os indivíduos que tiveram o seu DNA extraído amplificaram um fragmento de 350 bp, o que permitiu a identificação de um marcador molecular do tipo família-específico. Além disso, a coincidência das bandas indica que todos os indivíduos pertencem a família Calliphoridae, sugerindo que possuem a mesma linhagem mitocondrial dos espécimes analisados na Austrália que geraram os iniciadores de PCR usados nesse estudo. Com a identificação taxonômica observou-se a presença de indivíduos da espécie *Chrisomya albiceps*. Sendo essa uma espécie introduzida, pode-se sugerir que os espécimes de ambas as populações possam compartilhar um ponto de dispersão comum.

Após o processamento e o armazenamento de todas as informações geradas no projeto, foi elaborada uma cartilha didática ilustrada de nível acadêmico para auxiliar no ensino da entomologia forense e na identificação morfológica das espécies ao nível superior (anexo 1). A cartilha foi montada a partir de fotos tiradas dos insetos que foram coletados ao longo do experimento. Tomou-se como base para a construção da cartilha os princípios das chaves dicotômicas, ilustrando-se as partes anatômicas mais básicas e de fácil visualização que pudessem ser aplicadas para a rápida identificação de

uma determinada família (Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae). O teste feito com essa cartilha mostrou de forma satisfatória a identificação das três famílias de interesse forense.

## 7.DISSCUSSÃO

Verificou-se a grande quantidade de indivíduos da família Calliphoridae, representando 14 % do total dos espécimes coletados. Os indivíduos da família Muscidae representaram 3,8 % dos indivíduos coletados. E, também, foi possível a verificação que a família Sarcophagidae representou 6 % dos indivíduos coletados. Observou-se nessa área de coleta o predomínio de Calliphoridae e Sarcophagidae. Normalmente em áreas urbanas identifica-se predomínio de Muscidae pelo fato destes dípteros apresentarem uma adaptação aos mais variados tipos de substratos que poderão ser utilizados tanto para alimentação como para oviposição que vão desde fezes até matéria orgânica em decomposição, visto que originalmente aqueles eram coprófagos (d'Almeida & Almeida, 1998). Já a categoria "outros" o percentual na coleta foi maior do a de esperado totalizando mais de 76 % dos indivíduos coletados, já que esta categoria inclui todos os indivíduos que não pertenciam a nenhuma das três famílias de interesse forense. Foi possível observar um possível padrão de coleta que variou de acordo com a precipitação, quando a coleta começava ou terminava com chuva intensa, o número de indivíduos capturados era baixo ou igual a zero, mas, quando o dia de coleta apresentava dias de sol, o numero de indivíduos tendia a ser altíssimo, concordando com a idéia de Gomes e Von Zuben (2006) que afirmam que em dias frios ou chuvosos os dípteros diminuem a sua atividade ou simplesmente eles se tornam ausentes.

A utilização do DNAm para a identificação de dípteros no lugar do DNA nuclear de acordo com Harvey *et al.* (2003b) se deve ao fato do DNAm apresentar uma elevada taxa de mutações e também por apresentar regiões conservadas, o que permitiu o desenvolvimento de iniciadores para a identificação de indivíduos da Família Calliphoridae encontrados nas regiões de Queensland e no leste do continente australiano. Harvey *et al.* (2003a) verificaram que os indivíduos de *Lucilia sericata* da região do leste australiano apresentaram a mesma seqüência de nucleotídeos, enquanto o indivíduo da

espécie de *L. sericata* da região de Queensland apresentava diferença de nucleotídeos, outras descobertas realizadas neste trabalho foram que os indivíduos da espécie de *Chrysomya rufifacies* da região de Queensland divergiram na seqüência de nucleotídeos, o mesmo ocorreu com os indivíduos da espécie de *Calliphora dubia* do leste australiano. Outra região do gene COI do DNAm foi utilizada por Harvey *et al.* (2003b) para a identificação de dípteros da família Calliphoridae na África e na Austrália a partir de um fragmento de 1167 bp do gene COI. Este fragmento se mostrou eficiente na identificação das espécies de dípteros da família Calliphoridae e foram estudadas dentre outras espécies, tais como, *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* e *Lucilia cuprina* (*Phaenicia cuprina*), demonstrando a eficiência do gene COI do DNAm para a identificação de dípteros de Calliphoridae. Assim, a identificação molecular baseada no DNAm está relacionada com a similaridade ou com a diferença na seqüência de nucleotídeos a partir do DNAm quando comparada com a mesma seqüência de outro indivíduo. Logo, Harvey *et al.* (2003b) demonstraram que os indivíduos de *Chrysomya megacephala* e *Lucilia sericata* das diferentes regiões, África e Austrália, apresentaram pouca variação de nucleotídeos entre as suas populações.

## 8. Conclusão

A armadilha de garrafa PET mostrou-se eficiente na captura de dípteros durante o experimento, e que a isca feita de carne em decomposição mostrou-se atrativa para a captura de dípteros de interesse forense, entre eles, os indivíduos das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae.

Durante o período de coleta os fatores climáticos temperatura e umidade relativa não exerceram efeito pronunciado no comportamento dos insetos coletados. Já o índice pluviométrico associado com os estágios intermediários de decomposição da isca, influenciaram o processo de coleta dos indivíduos.

A estratégia estabelecida com a armadilha de garrafa PET e o modelo de isca mostraram potencial para o estabelecimento de um modelo de simulação de sucessão de Diptera em matéria orgânica em decomposição.

Para os indivíduos da família Calliphoridae foi testado com sucesso o oligonucleotídeo para amplificação de uma região do gene COI do DNAm que



foi desenvolvido na Austrália para a identificação da família Calliphoridae mostrando assim, o potencial do gene COI do DNAmT como marcador para a identificação da família Calliphoridae. Assim, esta região do DNAmT fornece uma base forte para estudos posteriores que venham na tentativa de identificar marcadores moleculares para espécies de Calliphoridae.

Com as informações geradas no projeto foi possível estabelecer uma chave ilustrada de identificação rápida para Diptera das famílias Muscidae, Calliphoridae e Sarcophagidae para uso no ensino de alunos do nível superior.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRIGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2003. 212p.

BENECKE, M. A brief history of forensic entomology. *Forensic Science International*, 120, 2-14. 2001.

BENECKE, R.D. Arthropods and corpses. *Forensic Pathology Reviews, Vol. 2*, Humana Press Inc. Totowa. NJ. 2004.

BORROR, D.J. & DELONG, D.M. *Introdução ao Estudo dos Insetos*. São Paulo: Edgar Bücher Ltda, 1969. 653p.

CARRERA, M. Entomologia para você. 6ª ed. São Paulo: Nobel, 1980. 306 p.

CIAMPI, A.Y. & MAGALHÃES, M.T.Q. Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD, Comunicado Técnico, 60, 8p. 2001.

D'ALMEIDA, J. M. & ALMEIDA, J. R. Nichos tróficos em dípteros caliptrados, no Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Biologia*, 58(4): 563-570. 1998

DIAS, D. X. Identificação de Marcadores Moleculares em Dípteros de Interesse Forense. Monografia, Licenciatura ou Bacharel em Biologia, Centro Universitário de Brasília, Brasília – DF, 2006.

DOREA, L. E. C.; STUMVOLL, V. P. & QUINTELA, V. Criminalística. 3 ed. Millennium Editora, Campinas, SP, 2005, 342p.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 pp. 1998.

GOMES, L. & C. J. VON ZUBEN. Forensic Entomology and Main Challenges in Brazil. *Neotropical Entomology*, 35(1): 01 – 11. 2006.

GRASSBERGER, M. & REITER, C. Effect of temperature on development of *Liopygia* (= *Sarcophaga*) *argyrostoma* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Sarcophagidae) and its forensic implications. *Journal of Forensic Science*, 47(6): 1-5. 2002.

GRASSBERGER, M. & REITER, C. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia Terranova* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120, 177-182. 2002.

HARVEY, M.L.; DADOUR, I.R. & GAUDIERI, S. Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potencial for distinction between stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. *Forensic Science International*, 131, 134-139. 2003.

JUNQUEIRA, A.C.M.; LESSINGER, A.C.; TORRES, T.T.; SILVA, F.R.; VETTORE, A.L.; ARRUDA, P. & ESPIN, A.M.L.A. The mitochondrial genome of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Diptera: Calliphoridae). *Gene*, 339, 7-15. 2004.

LIMA, L. H.C.; CAMPOS, L.; MORETZSOHN, M. C.; NÁVIA, D.; RIBEIRO E SILVA, O. L. & OLIVEIRA, M. R. V. II. Populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) raça B no Brasil: análise da diversidade genética por RAPD. *Pesquisa em Andamento*, 99, 1-6. 1999.

LIMA, L. H. C.; NÁVIA, D.; INGLIS, P .W. & OLIVEIRA, M. R. V. Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 4 (23): 1-5. 2000

MALGORN, Y. & COQUOZ, R. DNA typing for identification of some species of Calliphoridae an interest in forensic entomology. *Forensic Science International*, 102, 111-119. 1999.

MELLO, R. P. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da Família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomología y Vectores*, 10(2): 255 – 268. 2003.

MIRANDA, G. H. B.; JACQUES, G. S.; ALMEIDA, M. P.; SILVA, M. S. B. Coleta de amostras de insetos para fins forenses. Instituto Nacional de Criminalística, Brasília/DF, 2006.

OLIVEIRA-COSTA, J. Entomologia Forense: Quando os insetos são os vestígios. 1ª ed, Editora Millennium, Campinas, SP, 2003. 257p.

QUEIROZ, P.R.; MARTINS, E.S.; MONNERATT, R.G. & LIMA, L.H.C. Análise da variabilidade de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*, 75, 18 p. 2004.

STEVENS, J. & WALL, R. Genetic relationship between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Science International*, 120, 116-123. 2001.

TURNER, B. & WILTSHIRE, P. Experimental validation of forensic evidence: a study of the decomposition of buried pigs in a heavy clay soil. *Forensic Science International* 101 (1999) 113-122.

VIANA, E. E. S.; COSTA, P. R. P.; FERNANDES, A. L. & RIBEIRO, P. B. Abundancia e flutuação populacional das espécies de *Cryomya* (Diptera: Calliphoridae) em pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringiu, Ser. Zool*, Porto Alegre, 94(3): 231-234. 2004

WELLS, J.D. & SPERLING, F.A.H. (2001). DNA-based identification of forensically important *Chrysomyinae* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Science International*, 120, 110-115. 2001.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A. & TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531-6535. 1990.