

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

INSTITUTO DE BIOLOGIA



DORA AMPARO ESTRADA SOTO

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE DESENVOLVIMENTO DE TRÊS ESPÉCIES DE CALIFORÍDEOS
(DIPTERA) DE IMPORTÂNCIA FORENSE SOB O EFEITO DE DOIS BARBITÚRICOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Dora Amparo Estrada Soto
AxLp
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para a obtenção do título
de Doutor em Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Arício Xavier Linhares

Campinas - SP.

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

So78a

Soto, Dora Amparo Estrada
Avaliação da taxa de desenvolvimento de três espécies
de califórídeos (Díptera) de importância forense sob o efeito
de dois barbitúricos / Dora Amparo Estrada Soto. –
Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Arício Xavier Linhares.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fenobarbital. 2. Tiopental. 3. Intervalo pós-morte.
4. Entomotoxicologia. 5. Entomologia forense. I.
Linhares, Arício Xavier. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: The effect of two barbiturates on the development of three calliphoridae species (Diptera) of forensic importance .

Palavras-chave em inglês: Phenobarbital; Thiopental; Post-mortem interval; Entomotoxicology; Forensic entomology.

Área de concentração: Parasitologia.

Titulação: Doutor em Parasitologia.

Banca examinadora: Arício Xavier Linhares, Patrícia Jacqueline Thyssen, Lucila Maria Lopez de Carvalho, Wesley Augusto Conde Godoy, Janyra Oliveira Costa.

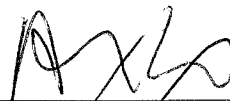
Data da defesa: 29/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Parasitologia.

Campinas, 29 de fevereiro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

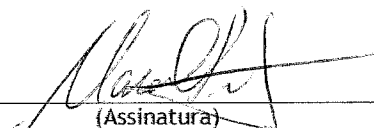
Prof. Dr. Arício Xavier Linhares (Orientador)


(Assinatura)

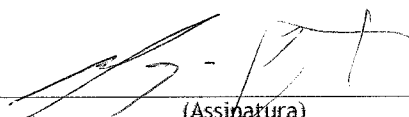
Profa. Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen


(Assinatura)

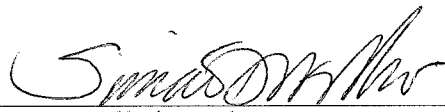
Profa. Dra. Mara Cristina Pinto


(Assinatura)

Prof. Dr. Wesley Augusto Conde Godoy


(Assinatura)

Prof. Dr. Simão Dias Vasconcelos Filho


(Assinatura)

Prof. Dr. Cláudio José Barros de Carvalho

(Assinatura)

Profa. Dra. Marlene Tiduko Ueta

(Assinatura)

Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti

(Assinatura)

DEDICATÓRIA

Aos meus amigos do peito:

Gloria Cecilia Estrada e Alfredo Olmos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares quem me acolheu em sua equipe de pesquisa e depositou sua confiança em mim para a realização deste trabalho;

Aos Profs. Drs. Lucila Maria Lopes de Carvalho, Mara Cristina Pinto, Marlene Tiduko Ueta, Patrícia Jacqueline Thyssen, Silmara Marques Allegretti, Simão Dias Vasconcelos Filho e Wesley Augusto Conde Godoy pela leitura crítica, sugestões e discussões do trabalho durante o Exame Prévio e/ou Banca, possibilitando o aprimoramento do mesmo;

A meu pai Ignácio Estrada que com seu jeito especial de ser e de viver me mostrou como o respeito, a amizade, a autenticidade, a alegria e o amor são ingredientes essenciais para sermos seres humanos felizes e comprometidos com a vida, e que talvez sem saber, me incentivou a continuar e avançar rumo a uma realidade muito diferente da dele.

A minha irmã Gloria Cecília, fazendo minhas suas palavras: com esse amor distante, possível, tardio e crescente; com ela mantive uma comunicação constante desde a fraternidade de quem entende cada palavra, escuta cada silêncio, ama cada sentido, põe cada sentido. Sempre presente com um interesse especial por me acompanhar, que é o mesmo que eu tento;

À meu companheiro e amigo Alfredo Olmos a quem sou imensamente grata, ele me ofereceu todo seu amor, paciência, cumplicidade, confiança, atenção e apoio incondicional nos momentos mais difíceis, sempre me animando quando a angústia me conduzia à vontade de desistir.

À “família” de amigos estrangeiros pelas buscas e descobertas que fizeram a vida mais agradável na ausência da família de sangue. Principalmente a Maria Ines e Alexis, Olga, Johana, Elizabeth e Juan Carlos.

A Maicon Diego Grella um agradecimento especial pela ajuda na criação das moscas em laboratório e colaboração na co-autoria de vários trabalhos;

A todos os colegas e alunos de iniciação científica que passaram pelo L2B, Marcos Alves Jr., Evandro de Faria, Thiago Moretti, Juliana Neves, Tatiana Rodrigueiro, assim como também a todos os docentes e funcionários do Departamento de Parasitologia que de forma direta ou indireta contribuíram para o amadurecimento deste trabalho;

À energia do grupo Semente de Esperança que me impulsou a subir a ladeira três vezes por semana com o calor do meio dia, para jogar capoeira, sentir todo o axê do grupo e principalmente experimentar a auto-superação dia a dia. Agradecimentos especiais e de coração ao Mestre Jahça, Chico, Alex, Marina, Highlaider, Evandro e minha amiga Kati.

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com auxílio financeiro vinculado a Projeto Temático (processo nº 04/08544-0). E o apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob forma de concessão de bolsa concedida durante quatro anos.

Ofereço este trabalho à memória da minha mãe, Rocio Soto, com uma saudade enorme, indescritível e refletida, muitas vezes, no futuro do meu irmão, Camilo.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
OBJETIVOS GERAIS	17
CAPÍTULO I - Efeito do fenobarbital no desenvolvimento de três espécies do gênero <i>Chrysomya</i> (Diptera: Caliphoridae) e sua importância para a estimativa do intervalo pós-morte	18
Introdução	18
Material e Métodos	19
Resultados	20
Discussão	30
CAPÍTULO II - Efeito do tiopental no desenvolvimento de três espécies do gênero <i>Chrysomya</i> (Diptera: Caliphoridae) e sua importância para a estimativa do intervalo pós-morte	33
Introdução	33
Material e Métodos	34
Resultados	34
Discussão	41
CAPÍTULO III - Avaliação da taxa de desenvolvimento de <i>Chrysomya albiceps</i> e <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae) criadas em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense.....	44
Introdução	44
Material e Métodos	47
Resultados e Discussão	48
CONCLUSÕES GERAIS	56
BIBLIOGRAFIA GERAL	58
ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABELAS

1.1	Tempo de desenvolvimento de ovo a pupa e intervalo de emergência (h), taxa de sobrevivência e de emergência de adultos (%), das três espécies de <i>Chrysomya</i> em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle	23
1.2	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$)	24
1.3	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$)	25
1.4	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$)	26
2.1	Tempo de desenvolvimento de ovo a pupa e intervalo de emergência (h), taxa de sobrevivência e de emergência de adultos (%), das três espécies de <i>Chrysomya</i> em diferentes dosagens de tiopental (mg/kg) em relação ao grupo controle (n = 150).....	36
2.2	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> em diferentes dosagens de tiopental em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$)	37
2.3	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> em diferentes dosagens de tiopental em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$)	38
2.4	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> em diferentes dosagens de tiopental em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$)	39
3.1	Composição para o preparo de 1 kg das dietas artificiais usadas para o desenvolvimento de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> e <i>Chrysomya megacephala</i>	51
3.2	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> ($\bar{x} \pm dp$) em diferentes meios de criação	52

3.3	Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> ($\bar{x} \pm dp$) em diferentes meios de criação.....	53
3.4	Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> em diferentes meios de criação (n = 150)	54
3.5	Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> em diferentes meios de criação (n = 150)	54

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1	Vista frontal e lateral de adultos de <i>Chrysomya albiceps</i> (A), <i>Chrysomya megacephala</i> (B) e <i>Chrysomya putoria</i> (C)	27
1.2	Frascos plásticos utilizados para criação de imaturos de dípteros	27
1.3	Gaiola plástica transparente para criação e manutenção de indivíduos adultos de dípteros	28
1.4	Câmara climática de germinação modelo Fanen 387 utilizada para o desenvolvimento de imaturos de dípteros	28
1.5	Curvas de desenvolvimento (h) de larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> (A), <i>Chrysomya putoria</i> (B) e <i>Chrysomya albiceps</i> (C) submetidas a diferentes dosagens de fenobarbital	29
2.1	Curvas desenvolvimento (h) de larvas de <i>Chrysomya megacephala</i> (A), <i>Chrysomya putoria</i> (B) e <i>Chrysomya albiceps</i> (C) submetidas a diferentes dosagens de tiopental	40
3.1	Curvas de desenvolvimento (h) versus massa corporal (mg) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> (A) e <i>Chrysomya megacephala</i> (B) alimentados em diferentes dietas artificiais e em carne, desde as primeiras 12 h pós-eclosão até a o fim do terceiro estágio larval	55

RESUMO

A Entomologia Forense utiliza dados de desenvolvimento e aspectos ecológicos de insetos necrófagos com o objetivo de auxiliar as investigações criminais, entre outros, no cálculo da estimativa do intervalo pós-morte (IPM). Igualmente, pode-se caracterizar a causa da morte quando essas drogas são detectadas em insetos imaturos que se alimentam dos corpos em decomposição. Além disso, os insetos podem servir como uma ferramenta alternativa para análises toxicológicas na ausência de tecidos e fluídos coletados habitualmente para este fim. Trabalhos recentes têm demonstrado que a presença de drogas ou toxinas em tecidos em decomposição pode alterar a taxa de desenvolvimento de insetos que usam este recurso como fonte alimentar. A ausência de conhecimentos dos possíveis interferentes no ciclo biológico pode gerar dados imprecisos sobre a idade do inseto, o que prejudicaria a estimativa do IPM. O ramo da Entomologia Forense que estuda os aspectos acima mencionados é denominado Entomotoxicologia. Rotineiramente, é necessário fazer testes preliminares em laboratório com dieta artificial e com certas substâncias para criar um banco de dados que possa ser útil como um padrão para investigar e quantificar as modificações que podem ocorrer com insetos coletados numa cena criminal. O objetivo principal deste estudo foi observar o efeito dos barbitúricos, fenobarbital (Gardenal[®]) e tiopental (Thiopentax[®]) em diferentes dosagens no desenvolvimento de imaturos de três espécies de califorídeos - *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera). Foi observado que os dois barbitúricos afetaram significativamente o desenvolvimento larval das três espécies, sendo que na maior dosagem a taxa de mortalidade foi elevada e na menor, o desenvolvimento retardou em até duas vezes, quando comparado ao grupo controle (sem adição de substância química). O conhecimento da ação destes barbitúricos no desenvolvimento dos imaturos dessas espécies de interesse forense pode contribuir para

evitar erros no cálculo da estimativa do IPM. Também foi avaliada a taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera) criadas em diferentes dietas artificiais contendo tecidos de origem animal e comparadas a uma dieta já descrita em literatura, a qual não contém tecido animal, e a um grupo controle, onde foi usada somente a carne moída. A eficiência de cada dieta foi observada levando em conta o ganho de massa dos imaturos, o tempo de desenvolvimento larval, a taxa de sobrevivência de pupas e adultos, o intervalo de emergência e o tamanho dos adultos. Assim, foi proposta uma nova dieta artificial proporcionando uma melhor uniformidade para a adição de drogas e sobrevivência das espécies estudadas, tornando mais eficiente a criação e os testes biológicos com os dípteros necrófagos em laboratório.

Palavras chave: Fenobarbital; Tiopental; Intervalo pós-morte; Fonte nutricional; Entomotoxicologia; Entomologia Forense.

ABSTRACT

The Forensic entomology utilizes developmental data and ecological aspects of necrophagic insects with the aim of helping criminal investigations, being able to, for instance, estimate the post mortem interval (PMI). Likewise, the death cause may be detected when these drugs are detected in immature insects from the same substrate. Besides, the insects can work as an alternative tool for toxicological analyses in the absence of tissues and fluids usually collected for this purpose. Recent investigations have been demonstrating that the presence of drugs or toxins in decomposing tissues may alter the development rate of insects that use such resource as a food substrate. The non-observance of this knowledge may lead to imprecise conclusions on the insect age, producing mistakes on the PMI estimative. This field of forensic entomology is named entomotoxicology. On routine basis, laboratory preliminary tests using artificial diet and certain substances are necessary to create a data bank that could be useful as a pattern to investigate and quantify the modifications that may occur with insects collected from death scenes. The present study aimed to verify the effect of the barbiturics phenobarbital (Gardenal[®]) and thiopental (Thiopentax[®]) in three concentrations, in the development of immatures of three Calliphoridae species - *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera). The barbiturics significantly affected the larval development of the three species, when the highest mortality rate occurred with the highest concentrations, and in the other concentrations the development retarded twice as much compared to the control group (without chemic substance). The knowledge on the action of these barbiturics in the immature development of these species of forensic interest can contribute to minimize the errors in the estimative of the PMI. A comparison of the developmental rate of the blowflies *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera) reared on: a) artificial diets containing

animal tissues; b) artificial diet without animal tissue; and c) a control group (which contained only meat) was thus carried out. The efficiency of each diet was evaluated by observing the gain of immatures' weight, larvae developmental time, viability percentage obtained from pupae and adults, emergence interval and adult size. To make the rearing and biological tests with the necrophagic dipterans in laboratory more efficient, a new artificial diet was proposed, leading to a better uniformity and increased survivorship of the species studied.

Key words: Phenobarbital; Thiopental; Post-mortem Interval; Nutritional food; Entomotoxicology; Forensic Entomology.

INTRODUÇÃO GERAL

Após a morte, os tecidos de animais são atrativos para uma variedade de organismos e, com isso, a decomposição de vertebrados terrestres é dominada não só pela ação de fungos e bactérias, mas também pelos artrópodes, especialmente por insetos sarcossaprófagos (Nuorteva 1977).

Desse modo, o estudo dos insetos tem contribuído em investigações legais, sendo esta área conhecida como Entomologia Forense, a qual pode ser definida como a aplicação do estudo de insetos e outros artrópodes que, em associação com procedimentos criminalísticos, tem o propósito de descobrir informações úteis para uma investigação (Nuorteva 1977; Erzinçlioglú 1983; Keh 1985; Smith 1986; Catts e Goff 1992; Hall 2001).

Aplicações nesta área já foram enumeradas por Nuorteva (1977), Keh (1985), Smith (1986), Catts e Haskell (1990), Catts e Goff (1992), Oliva *et al.* (1995) e Byrd e Castner (2001), tais como: determinação do tempo ou intervalo pós-morte ou (IPM); movimentação do cadáver; local, modo ou causa da morte; associação dos suspeitos com a cena criminal; investigação de substâncias tóxicas; casos envolvendo possível morte súbita e acidentes de trânsito com causa desconhecida.

Os insetos — tanto espécimes imaturos, como pupários e adultos — têm sido utilizados para detecção de substâncias tóxicas como procedimento alternativo quando os métodos convencionais não a permitem (Beyer *et al.* 1980; Kintz *et al.* 1990a,c; Goff e Lord 1994; Hédouin *et al.* 1999a; Introna *et al.* 2001). Tal importância reside no fato de que estes organismos nem sempre metabolizam as drogas ou eventuais contaminantes presentes no corpo e assim os mantêm em seus tecidos, podendo ser identificadas posteriormente, por meio de análises toxicológicas, dias e até anos após a morte (Goff *et al.* 1989).

Assim, a entomotoxicologia, um ramo da entomologia forense, estuda a aplicação dos insetos necrófagos na análise toxicológica a fim de identificar drogas e toxinas presentes em um tecido, além de investigar o efeito causado por estas substâncias no desenvolvimento dos artrópodes (Introna *et al.* 2001).

Drogas e substâncias tóxicas podem afetar a taxa de desenvolvimento e o metabolismo de insetos necrófagos, quando estes se alimentam de tecidos de indivíduos que tenham morrido em decorrência do uso e abuso destas (Introna *et al.* 2001). Em estudos que investigam os efeitos de substâncias na biologia de dípteros de importância forense, as dietas artificiais ou meios de criação são úteis por permitir o acréscimo de substâncias de forma homogênea, dispensando assim o uso de cobaias, as quais são de manipulação trabalhosa e de custo elevado, encarecendo os ensaios.

Apesar de existir estudos observando o efeito de substâncias tóxicas no desenvolvimento de imaturos de insetos de importância forense (Goff *et al.* 1989, 1992, 1993, 1994 e 1997; Bourel *et al.* 2001a,b,c; Carvalho *et al.* 2001; Pien *et al.* 2004), ainda restam compostos químicos sobre os quais há pouco conhecimento, como é o caso dos barbitúricos, substâncias que possuem ação sedativa, hipnótica e anestésica, tais como o fenobarbital e tiopental. No Brasil, a pesquisa toxicológica com insetos é pioneira com Carvalho *et al.* (2001) e ainda estão se aprimorando os conhecimentos e técnicas a serem utilizadas especialmente no que diz respeito à detecção.

A investigação dos efeitos causados por substâncias no desenvolvimento dos insetos deve ser levada em conta já que pode gerar dados imprecisos sobre a sua idade, prejudicando assim a estimativa do IPM, quando esta é baseada no ciclo de vida do inseto (Goff e Lord 1994). Este estudo espera contribuir para aquisição de conhecimentos relacionados à prática de Entomologia Forense e ao âmbito Médico-Legal, já que ainda não existe informação abordando a influência das substâncias acima mencionadas em nosso país.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Breve histórico

A Entomologia Forense é uma área na qual interagem a ciência que estuda os artrópodes e o sistema judicial (Hall 2001). Pode ser subdividida em três áreas, segundo Lord e Stevenson (1986): *Urbana* (abrange os insetos que afetam o homem e seu ambiente); *de produtos armazenados* (de grande importância econômica relacionada com insetos ou parte deles comumente encontrados contaminando alimentos); e *Médico-Legal* (que tem seu foco nos componentes criminais do sistema legal lidando, principalmente, com artrópodes necrófagos).

O uso de insetos relacionados a eventos criminais foi citado pela primeira vez no século 13, na China (Tz'u e McKnight 1981). Numa investigação de um fazendeiro assassinado por golpes de foice, todos os suspeitos da aldeia depositaram suas foices no solo. A do assassino foi denunciada pela presença das moscas atraídas pelos resíduos de sangue, obrigando o proprietário a confessar o crime.

Durante a época medieval, não foi reconhecida a correlação entre larvas em um cadáver e a oviposição de moscas adultas. No início do século 19, verificou-se que as moscas eram atraídas rapidamente pelos corpos (Anônimo 1814). Mende (1829) compilou uma lista de insetos necrófagos, incluindo moscas e besouros. Krahmer (1857) descreveu as vantagens e desvantagens da associação do uso de insetos na estimativa do IPM, muitas das quais ainda são válidas.

A primeira aplicação de Entomologia Forense foi em 1855, quando Bergeret relatou suas conclusões sobre a data de morte de um bebê baseadas no encontro de insetos no cadáver. Observando a fase de desenvolvimento das larvas, ele concluiu que o bebê era de uma família que morara na casa há vários anos, o que levou à absolvição da família que tinha se mudado recentemente para essa residência.

Contudo, foi Mégnin (1894) o primeiro pesquisador que avaliou a sucessão de insetos em cadáveres, destacando o papel dos insetos na estimativa do tempo de morte e difundindo a entomologia forense como ciência.

No Brasil, os primeiros trabalhos com insetos ligados à medicina legal começaram com Freire (1914, 1923). Estudos vêm sendo realizados utilizando carcaças animais como iscas e focalizando aspectos como os processos de decomposição e sucessão ecológica em diferentes ambientes e altitudes (Monteiro-Filho e Penereiro 1987; Souza e Linhares 1997; Carvalho *et al.* 2000; Carvalho e Linhares 2001; Ribeiro 2003; Tavares 2003; Carvalho *et al.* 2004); em tamanhos diferentes de carcaça (Thyssen 2000), sobre biologia, ecologia e identificação de espécies necrófagas (Von Zuben *et al.* 1996; Moura *et al.* 1997; Souza 1998; Amorim e Ribeiro 2001; Thyssen e Linhares 2007) e com detecção e efeito de substâncias tóxicas em insetos (Carvalho *et al.* 2001).

Alterações após a morte

Depois da morte, tanto humanos quanto animais sofrem transformações causadas por autólise dos tecidos, a qual é promovida por alterações químicas internas das células e enzimas, como também pela atividade de bactérias e fungos intestinais e ambientais (Knight 1991; Clark *et al.* 1997; Introna e Campobasso 2000).

Os sinais de decomposição ocorrem dentro das primeiras 72 ou 96 h após a morte (HenBge *et al.* 2000), sendo afetados por uma gama de variáveis associadas com o próprio corpo ou com o meio ambiente. Além disso, depois da temperatura do corpo equilibrar-se com a do ambiente e a putrefação ser iniciada, não é mais possível se estimar o IPM usando as técnicas necroscópicas convencionais tais como temperatura do corpo, rigidez cadavérica, mancha verde abdominal e análise de livores. Porém, com o auxílio de conhecimentos entomológicos, quanto maior o IPM mais segura é a estimativa, sobretudo com um tempo de morte superior a três dias. (Catts e Haskell 1991; Kashyap e Pillay 1989).

Os insetos e a morte

Os insetos são atraídos ao corpo geralmente poucos minutos logo após a morte (Anderson 2001), e este comportamento é o que os torna tão apropriados para o uso em Medicina Legal. Porém, nem sempre a oviposição pode ocorrer rapidamente, pois insetos que aparecem cedo no local da morte são colonizadores tardios ou não são espécies necrófagas (Amendt *et al.* 2004).

Segundo Smith (1986), quatro categorias podem ser identificadas dentro de uma comunidade que explora carcaças: a) espécies necrófagas; b) predadores, parasitos e parasitóides, que se alimentam de ovos, larvas ou mesmo pupas das espécies necrófagas; c) espécies onívoras tais como vespas, formigas e alguns besouros, que se alimentam tanto da carcaça como de seus colonizadores; d) eventuais ou acidentais, como aranhas, que usam a carcaça como extensão do seu ambiente. Para a entomologia forense, as primeiras duas categorias são as mais importantes e incluem principalmente espécies das ordens Diptera e Coleoptera, as quais chegam às carcaças e se substituem sequencialmente de forma previsível em uma sucessão ecológica. Estudos de sucessão são citados por Nuorteva (1977), Keh (1985) e Smith (1986).

As moscas da família Calliphoridae (Diptera) estão entre as primeiras colonizadoras de cadáveres e podem servir como relógios biológicos na mensuração do tempo de morte de duas a várias semanas (Goff e Lord 1994; Anderson 2001). São atraídas pelo odor característico da carcaça produzido durante a decomposição e que pode ser detectado à distância (Erzinçlioglu 1996). Também podem ser atraídas por estímulos visuais, cor e presença de outros insetos co-específicos na carcaça (Wall e Fisher 2001). Compostos ricos em amônia e sulfetos, assim como também a umidade e estímulos tácteis estimulam a oviposição (Anderson 2001), ocorrendo primeiramente nos orifícios naturais e nas partes moles do corpo, como feridas abertas, onde começa a colonização.

O tamanho da carcaça pode afetar sua atratividade, pelo menos para espécies de moscas das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae (Erzinçlioglu 1996). No entanto, nem todos os insetos preferem grandes carcaças, algumas espécies ovipositam preferencialmente

em pequenos animais, como roedores. Fatores como por exemplo, o enterro restringem a colonização de um corpo, pois a maioria dos dípteros não consegue colonizar corpos enterrados a mais de 30 cm da superfície (Mann *et al.* 1990; Introna e Campobasso 2000; Campobasso *et al.* 2001), exceto algumas espécies de forídeos (Anderson 2001). O enterro do corpo pode ainda influenciar o tempo requerido para os insetos encontrarem a carcaça assim como também o restante da fauna necrófaga (Campobasso *et al.* 2001; Bourel *et al.* 2004).

Estimativa do intervalo pós-morte

Kashyap e Pillay (1989) apontam que decorridas 72 h da morte o método da fauna cadavérica é usualmente o instrumento de maior acurácia utilizado para a estimativa do IPM, que pode ser estimado por dois métodos. O primeiro proposto por Mégnin em 1894, também chamado de Limite Máximo, é baseado na presença e frequência dos insetos presentes no corpo em um tempo definido sabendo-se que as espécies de insetos estão associadas a determinado estágio de decomposição do corpo. O segundo método, o Limite Mínimo, é mais amplamente utilizado e leva em conta o conhecimento sobre os ciclos de vida dos insetos, cujas larvas se criam nos corpos (Nuorteva 1977; Erzinçlioglu 1983).

A identificação taxonômica exata dos insetos é essencial na utilização de qualquer um dos procedimentos e a influência ambiental sobre a população de insetos não pode ser desconsiderada, visto que fatores tais como temperatura, umidade relativa, latitude e altitude podem alterar o desenvolvimento de uma dada espécie (Amendt *et al.* 2004).

Estudos em carcaças animais demonstram que a composição de espécies e a sucessão de insetos num cadáver podem variar dependendo da região geográfica, condições climáticas, tipo e tamanho da carcaça, microclima, grau de insolação, tipo de substrato e complexidade e abundância da fauna local (Greenberg 1991; Anderson 2001; Arnaldos *et al.* 2001; Carvalho e Linhares 2001; Grassberger e Frank 2003a; Watson e Carlton 2003). Dados coletados numa região ou área em particular devem ser usados com cautela na determinação do IPM em outra região. Características ecológicas, espécies envolvidas, condições inerentes ao substrato onde se encontram e principalmente as condições climáticas registradas no

local da morte, como o grau de exposição ao sol, podem afetar o padrão de insetos colonizadores (Erzinçlioglu 1996) e a idade dos insetos, onde o estágio larval é o mais prejudicado (Amoundi *et al.* 1994). Assim, a não observação de todos estes parâmetros envolvidos com a cena do crime implica um erro de estimativa do IPM (Greenberg e Kunich 2002).

Utilizado na área forense para se estimar a idade de larvas de insetos (Greenberg e Kunich 2002) surge o modelo de graus-dias, graus-horas ou horas-acumuladas (ADH da sigla em inglês) baseado na taxa de desenvolvimento dependente da temperatura na qual ele ocorreu. De modo geral, as necessidades térmicas dos insetos podem ser avaliadas por meio de uma constante térmica. Esta constante inicialmente proposta por Réaumur em 1735 (Silveira Neto *et al.* 1976) supõe que a relação entre a taxa de desenvolvimento e temperatura é linear no médio-alcance de uma curva, com um limite letal superior e um limiar mais baixo, chamado de temperatura basal, abaixo da qual o desenvolvimento cessa, já que os insetos passam a crescer ou acumular energia apenas a partir da sua temperatura basal (Haddad *et al.* 1999).

Quando somente os ovos de moscas são encontrados no cadáver as dessecações das amostras de ovos e análise do estágio embrionário de desenvolvimento podem ajudar na estimativa do IPM (Smith 1986; Lord 1990; Anderson 1999; 2004; Byrd e Castner 2001). Porém, para colocar em prática esta ferramenta é necessário identificar as espécies de moscas às quais correspondem os ovos.

Em geral, os estágios imaturos de espécies de dípteros são totalmente desconhecidas na literatura. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é usada como ferramenta indireta para identificar espécies através dos ovos. Os estudos comparativos da morfologia externa de ovos de moscas descrevem caracteres de potencial valor diagnóstico (Kitching 1976; Greenberg e Szyska 1984; Erzinçlioglu 1989; Liu e Greenberg 1989; Meskin 1991; Spradbery 1991; Greenberg e Singh 1995; Greenberg e Kunich 2002).

A MEV leva em conta caracteres morfológicos para serem usados na identificação de ovos de moscas, tais como: largura e comprimento do ovo, do plastrão, da linha de eclosão,

morfologia do plastrão ao redor da micrópila, observação das características morfológicas do colar da micrópila, da micrópila e das células coriônicas (Margaritis 1985). A identificação de ovos de moscas mediante o uso de MEV tem sido documentada na Austrália (Kitching 1976), Peru (Greenberg e Szyska 1984), Estados Unidos (Liu e Greenberg 1989; Greenberg e Singh 1995) e Inglaterra (Erzinçlioglú 1989), mas não para o Brasil.

A MEV apresenta desvantagens, especialmente para seu uso em campo ou quando há urgência na identificação. Uma alternativa para isso é o uso da microscopia óptica comum (MOC), fácil e de baixo custo, que poderia servir como um método de triagem inicial dos espécimes, antes de serem seguidos para o exame por MEV.

Análise de DNA em entomologia forense

A identificação genética de espécies tem sido uma ferramenta muito útil nos últimos tempos. Embora os métodos de identificação morfológica sejam usados, eles precisam de conhecimento especializado, sobretudo na fase imatura onde ainda há maior dificuldade para se fazer identificações até o menor nível taxonômico.

O desenvolvimento de marcadores moleculares, a partir de adaptações da técnica da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase, da sigla em inglês), foi um dos grandes avanços na área de biologia molecular. Trata-se de uma técnica relativamente simples, que pode ser utilizada na identificação até espécie de insetos de importância forense, e relevante quando a diferenciação não é possível ou é duvidosa usando-se os critérios morfológicos. Os dípteros têm sido os mais estudados tanto para a obtenção de marcadores como no seqüenciamento do DNA (Sperling *et al.* 1994; Malgorn e Coquoz 1999; Stevens e Wall 2001; Wallman e Donellan 2001; Wells e Sperling 2001; Wells *et al.* 2001a; Harvey *et al.* 2003; Thyssen *et al.* 2005).

A análise de DNA humano extraído de larvas é outra aplicação das ferramentas moleculares (Clery 2001; Wells *et al.* 2001b). Esta análise pode ser útil em casos onde somente as larvas, mas não o corpo, são encontradas na possível cena do crime ou quando uma fonte alternativa de alimento está presente no local. Ao comparar o DNA humano no

trato digestivo de larvas, pode-se demonstrar que elas se alimentaram no cadáver humano, associando-as a um corpo específico (Amendt *et al.* 2004). Esta técnica pode ser útil para identificar suspeitos de estupro e/ou assassinato com amostras de sangue coletadas do intestino de insetos presentes na cena criminal (Repogle *et al.* 1994).

Entomotoxicologia

A Entomotoxicologia estuda a aplicação dos insetos necrófagos na análise toxicológica para identificar drogas e toxinas presentes em um tecido, além de investigar o efeito causado por estas substâncias no desenvolvimento dos artrópodes (Introna *et al.* 2001).

O tempo de desenvolvimento de espécies de importância forense pode ser afetado pela ação de drogas, de uso freqüente ou contínuo, ou de seus metabólitos eventualmente presentes no corpo, gerando conclusões imprecisas na estimativa do IPM (Goff e Lord 1994). Assim, o conhecimento do efeito de substâncias no desenvolvimento dos imaturos das espécies de interesse forense pode contribuir para melhorar o entendimento dos fatores que podem interferir e/ou gerar erros quanto à estimativa do IPM. Com relação à detecção de venenos, por exemplo, Utsumi observou em 1958 que moscas foram atraídas por carcaças de ratos, em diferentes momentos, dependendo do veneno que causou a morte.

A análise de larvas de insetos coletadas de um corpo em decomposição para uma identificação qualitativa de droga foi primeiramente proposta por Beyer e colaboradores (1980), detectando fenobarbital em larvas de moscas. Desde então, pesquisadores vêm desenvolvendo trabalhos com larvas, utilizando drogas e técnicas diferentes, solucionando casos envolvendo homicídios, suicídios e seqüestros (Leclercq e Brahy 1985; Gunatilake e Goff 1989; Goff *et al.* 1991,1992; Sadler *et al.* 1997a,b; Bourel *et al.* 1999).

Desse modo, pesquisas têm sido realizadas observando o efeito de substâncias, tanto lícitas quanto drogas de abuso, no desenvolvimento larval de espécies de importância forense: babilúricos como fenobarbital (Beyer *et al.* 1980), secobarbital (Levine *et al.* 2000), amilobarbital e barbital (Sadler *et al.* 1997b); benzodiazepinas como diazepam (Carvalho *et al.* 2001), temazepam (Sadler *et al.* 1995), brazotam e oxazepam (Kintz 1990a);

antidepressivos tricíclicos como amitriptilina (Kintz *et al.* 1990a; Goff *et al.* 1993; Wilson *et al.* 1993; Miller *et al.* 1994; Sadler *et al.* 1995; 1997a), nortriptilina (Wilson *et al.* 1993; Miller *et al.* 1994) e trimipramina (Sadler *et al.* 1995); opiáceos/ opióides como morfina e codeína (Introna *et al.* 1990; Goff *et al.* 1991; Kintz *et al.* 1994; Hédouin *et al.* 1999a,b; Bourel *et al.* 2001a,b,c) e propoxifeno (Wilson *et al.* 1993); derivados de anfetaminas MDMA (*ecstasy*) + MDA (Goff *et al.* 1992,1997) e anfetaminas (Sadler *et al.* 1995); cocaína (Goff *et al.* 1989; Manhoff *et al.* 1991; Nolte *et al.* 1992; Carvalho 2004); inseticidas como malation (Gunatilake e Goff 1989) e palation (Wolff *et al.* 2004); carbamatos (Wolff *et al.* 2006) e salicilatos (Kintz *et al.* 1990a; Sadler *et al.* 1997b, c).

As técnicas mais amplamente usadas para analisar amostras de insetos incluem radioimunoensaio (RIA), imunohistoquímica, cromatografia gasosa (GC), de placa (TLC), líquida de alta resolução (HPLC) ou gasosa com espectroscopia de massas (GC-MS).

A cromatografia juntamente com o auxílio da espectroscopia de massas se destaca devido à sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das substâncias químicas (Collins *et al.* 1997). Permite ainda a caracterização do nível de impurezas nas drogas ilícitas (Moore e Casale 1994). Kintz e colaboradores (1990a,c) mostraram que as larvas são uma ótima ferramenta para a detecção de morfina por cromatografia gasosa, sem apresentar interferência por produtos da decomposição, tal como ocorre com os tecidos. Além disso, apresenta um alto poder de resolução e sensibilidade, o que torna possível analisar substâncias de uma mesma amostra. Isso faz com que não haja a necessidade de grandes quantidades de amostra o que pode ser um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas. Apesar dessas vantagens, a cromatografia gasosa apresenta o inconveniente da necessidade da preparação prévia da amostra, gerando um custo adicional na análise e um tempo maior para a obtenção dos resultados (Collins *et al.* 1997).

Alves e colaboradores (2007) foram chamados para coletar larvas de dípteros provenientes de um cadáver humano no Instituto Médico Legal (IML) de Campinas, SP, e estimar o IPM baseado na idade dos insetos. O comportamento de desagregação e o tamanho desproporcional de alguns espécimes coletados em várias regiões do corpo os fizeram

considerar a possibilidade de intoxicação por alguma substância que pudesse ter ocasionado a morte da vítima. Deste modo, a presença de cocaína foi detectada por imunohistoquímica em cortes de larvas de segundo e terceiro estádios usando o método do complexo-peroxidase. Os espécimes positivos mostraram uma imunoreação mais intensa na área localizada entre a exo e a endo-cutícula. Estes resultados constituem uma evidência do acúmulo de cocaína na cutícula das larvas durante seu desenvolvimento e evidenciam a potencialidade da geração de erros na estimativa do IPM de até 12 horas se o efeito da droga não for levado em conta (Alves *et al.* 2007).

Campobasso e colaboradores (2004) mostraram que as concentrações de opiáceos e cocaína achadas em larvas pós-alimentadas foram inferiores a aquelas observadas em espécimes alimentados, provavelmente devido às larvas armazenarem materiais alimentícios no extremo anterior do sistema digestivo, o qual expande grandemente durante o período de alimentação na fase larval (Greenberg 1991), digerindo rapidamente o conteúdo intestinal. Durante a fase de pós-alimentação a taxa de eliminação da droga excede a taxa de absorção, causando então uma diminuição na concentração da droga nas larvas (Introna *et al.* 2001).

Contrário a isso, em dois casos do mesmo estudo (Campobasso *et al.* 2004) envolvendo intoxicação por fenobarbital foram detectadas concentrações mais altas em larvas pós-alimentadas do que em larvas jovens com alimentação ativa, sugerindo uma bioacumulação. Em contraste, as concentrações de fenobarbital tanto em larvas alimentadas como em pós-alimentação, foram significativamente mais baixas do que aquelas associadas ao sangue e amostras de fígado (Campobasso *et al.* 2004). Sendo assim, deve ser levado em conta que as propriedades químicas das drogas podem afetar significativamente sua detecção nas larvas.

Wilson e colaboradores (1993) detectaram amitriptilina, nortriptilina e propoxifeno em larvas de terceiro ínstar de *Calliphora vicina* em dosagens menores do que aquelas achadas na fonte alimentar. Porém, análises de pupários e adultos foram totalmente negativas. Estes resultados demonstram que as drogas não foram bioacumuladas durante todo o ciclo de vida larval, sugerindo uma eficiente eliminação através dos túbulos de

Malpighi ou acumulação nos nefrócitos das larvas. Por isto a ausência de droga em larvas, pupários e adultos não necessariamente implica sua ausência na fonte alimentar (Sadler *et al.* 1997c). Sadler e colaboradores (1995) em um estudo similar focado na acumulação e eliminação de drogas, detectaram que a concentração de droga diminuiu em larvas não alimentadas e pupários sugerindo também que somente as larvas alimentadas ativamente e desenvolvidas completamente poderiam ser amostradas para análise toxicológica pois elas representam a melhor fonte residual da droga avaliada. Porém, o mesmo grupo de pesquisa achou alta variabilidade nas concentrações larvais de drogas não sendo confiável a extrapolação quantitativa. Além disso, as larvas apresentaram acúmulos imprevisíveis quando submetidas a mais do que uma droga ou dosagens diferentes de uma única substância (Sadler *et al.* 1997b,c).

A bioacumulação, durante o desenvolvimento, larval é uma limitação na utilização de larvas para quantificação das drogas e para correlacionar a concentração em larvas e na fonte alimentar. Além disso, a transferência de substâncias tóxicas não é acompanhada apenas no primeiro nível da cadeia alimentar com os dípteros, mas continua também nos coleópteros predadores. Assim, eles podem também ser submetidos à análise toxicológica, visto que uma segunda bioacumulação pode ocorrer (Introna *et al.* 2001).

Embora alguns estudos descreveram a correlação quantitativa entre concentrações de drogas em larvas e em tecidos humanos dos quais elas se alimentaram (Introna *et al.* 1990; Kintz *et al.* 1990b,c; Goff *et al.* 1993; Miller *et al.* 1994), outros estudos não observaram nenhuma correlação ou acharam as dosagens em larvas significativamente mais baixas que aquelas detectadas nos tecidos (Goff *et al.* 1989, 1991; Nolte *et al.* 1992; Kintz *et al.* 1994; Williams e Pounder 1997; Hédouin *et al.* 1999a; Levine *et al.* 2000; Carvalho *et al.* 2001; Campobasso *et al.* 2004; Tracqui *et al.* 2004).

Deste modo, ainda que o uso dos artrópodes como ferramenta nas análises toxicológicas em investigações criminais esteja se tornando mais comum, existe a limitação da necessidade de determinar se a quantidade do composto em particular é compatível com o envenenamento fatal, ou está mais de acordo com concentrações terapêuticas, dando

suporte ao diagnóstico final de intoxicação narcótica (Skopp 2004). Sugerindo que as larvas apresentam importância somente qualitativa, uma vez que não permitem uma quantificação acurada (Tracqui *et al.* 2004).

Futuros rumos em entomologia forense

Apesar de a Entomologia Forense contar com mais de 150 anos de existência, ainda é considerada uma disciplina jovem. Uma das mudanças mais importantes para o futuro é ajustar os dados experimentais a casos práticos. Visto as amplas variações nos fatores bióticos e abióticos que ocorrem no local da morte, o incremento nos detalhes e observações quantificáveis enriqueceria o conhecimento existente, criando um modelo para o cálculo e manipulação de dados, assim como também a presença de entomologistas forenses o mais perto possível da reconstrução da cena criminal (Amendt *et al.* 2004).

A estimativa correta do IPM é talvez o parâmetro mais importante da entomologia forense, na qual devem ser levados em conta dados de desenvolvimento e de sucessão entomológica, a região geográfica e a variedade de características do cenário do crime. Existem ainda outros parâmetros aos quais se deve prestar uma atenção especial como os mencionados nos parágrafos seguintes.

Fatores que possam alterar o tempo de oviposição, tais como corpos cobertos com mantas, carpetes, sacolas plásticas ou localizados em ambientes fechados, pois estes fatores podem atrasar a oviposição inicial (Higley e Haskell 2001), assim como também aspectos meteorológicos, frio ou chuva, que podem inibir ou evitar a atividade dos insetos (Erzinçlioglu 1996).

A diapausa, o período durante o qual o crescimento e o desenvolvimento dos insetos fica suspenso. Dependendo da espécie, os parâmetros que mais influenciam larvas e pupas são o fotoperíodo e a temperatura. A diminuição da duração do dia ou da temperatura indicando a aproximação do inverno pode induzir à diapausa sob condições ambientais desfavoráveis (Ames e Turner 2003). O método graus dias/horas acumuladas (ADH) considera a temperatura mínima na qual o desenvolvimento larval cessa, podendo ser somente

aplicado quando a temperatura é diretamente proporcional ao desenvolvimento (Wagner *et al.* 1984). Além disso, é aceito que o desenvolvimento cesse a baixas temperaturas (Lamb *et al.* 1984) sendo, porém, muito difícil determinar a temperatura mínima, pois os insetos sobrevivem durante longos períodos com desenvolvimento quase nulo ou em diapausa (Ames e Turner 2003). Este fato tem implicações importantes e deve ser levado em conta no cálculo do IPM quando baseado no ADH de larvas de dípteros, assim como também a duração da diapausa.

Os parasitóides alimentam-se exclusivamente de outros artrópodes, principalmente insetos, resultando na morte do hospedeiro (Godfray 1994). A maioria de parasitóides pertence às ordens Hymenoptera e Diptera, representando um grupo extremamente diverso e constituído por aproximadamente 8,5% de todos os insetos descritos (LaSalle e Gauld 1991; Godfray 1994). Eles também atacam espécies necrófagas e conseqüentemente podem aparecer na carcaça (Smith 1986; Haskell *et al.* 1997; Amendt *et al.* 2000; Anderson e Cervenka 2002; Grassberg e Frank 2003b). O ciclo de vida das espécies mais comuns de parasitóides é conhecido (Geden 1997) e quando os adultos emergem e abandonam o hospedeiro as exúvias das pupas das vespas parasitóides podem ser identificadas (Geden *et al.* 1998; Carlson *et al.* 1999). O tempo de desenvolvimento dos parasitóides pode ser calculado e adicionado ao tempo de desenvolvimento dos califorídeos hospedeiros. Assim, pupas de parasitóides de moscas podem ter um papel importante na estimativa do IPM pelo fato de o tempo de parasitismo geralmente ser restrito a uma pequena e bem definida janela de tempo no começo da fase pupal do inseto hospedeiro (Anderson e Cervenka 2002). Este grupo de parasitóides pode criar outros problemas para a entomologia forense e a estimativa do IPM, por exemplo, Holdaway e Evans (1930) descreveram pupariação prematura em *Lucilia sericata* quando parasitada por *Alysia manducator* (Hymenoptera: Braconidae).

O papel da fauna marinha e de água doce em investigações forenses tem recebido pouca atenção (Payne e King 1972; Nuorteva *et al.* 1974; Goff e Odom 1987; Haskell *et al.* 1989; Catts e Goff 1992; Vance *et al.* 1995; Sorg *et al.* 1997; Davis e Goff 2000). Ainda é

escasso o conhecimento do papel dos artrópodes aquáticos durante a decomposição em corpos submersos (Keiper *et al.* 1997; Tomberlin e Adler 1998; Hobischak e Anderson 1999, 2002; Anderson 2001; Merrit e Wallace 2001; Anderson e Hobischak 2004). Os insetos aquáticos mais importantes pertencem às ordens Ephemeroptera, Trichoptera e Diptera, e secundariamente às famílias Chironomidae e Simuliidae (Diptera). Contudo, estes insetos não são obrigatoriamente saprófagos. O uso destes insetos para se estimar o tempo de morte é mais difícil e depende da estação do ano e das condições do sistema aquático (Amendt *et al.* 2004).

Uma droga ou toxina pode ser detectada na larva quando a taxa de absorção excede a taxa de excreção (Introna *et al.* 2001), mas não é bem conhecido exatamente como as larvas bioacumulam ou eliminam as drogas e como isso afeta o desenvolvimento larval. O efeito das drogas e toxinas na taxa de desenvolvimento dos Diptera é também um outro fator que deve ser levado em conta para estimar o tempo de morte.

Hoje a Entomologia Forense não está limitada somente à estimativa do IPM. Um entomologista forense tem adquirido um papel importante nas investigações de mortes, sendo requerido em outros países para todo tipo de trabalhos como determinar a estação climática da morte, região geográfica da morte, movimento ou armazenamento dos restos após a morte, tempo de decapitação e/ou desmembramento, intervalo de submersão, locais específicos de injúria no corpo, artefatos *post-mortem* no corpo e no local do crime, negligência de crianças e idosos, acoso sexual, identificação ou associação de suspeitos, etc. (Campobasso e Introna 2001).

No Brasil a aplicação da entomologia forense não é usual, contrário ao que ocorre em instituições científicas internacionais as quais contam com laboratórios específicos para assistir a oficiais da lei na cena do crime. Em ação pioneira o Departamento Técnico e a Polícia Científica do Rio de Janeiro estão tentando fazer da associação de oficiais com entomologistas do Museu Nacional - UFRJ uma prática convencional (Oliveira-Costa e Mello-Patiu 2004).

Embora a integração entre a entomologia forense e as investigações criminais ainda esteja em fase inicial no Brasil e a Entomotoxicologia ainda não seja uma ciência desenvolvida ao nível de poder ser usada na rotina prática (Gupta e Setia 2004), são de grande importância os estudos que focalizem na obtenção de dados sobre a entomofauna necrófaga e o efeito de diversas drogas no desenvolvimento larval, para a formação de um banco de dados que auxilie em investigações médico-criminais.

OBJETIVOS GERAIS

1. Avaliar o desenvolvimento de três espécies de califorídeos de importância forense: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya putoria* (Wiedemann), e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) submetidos a diferentes dosagens de fenobarbital: 150, 500 e 1000 mg/kg.
2. Avaliar o desenvolvimento de três espécies de califorídeos de importância forense: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya putoria* (Wiedemann), e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) submetidos a diferentes dosagens de tiopental: 0,5 x DL₅₀, DL₅₀ e 2 x DL₅₀.
3. Desenvolver e aperfeiçoar uma nova dieta artificial para criação de dípteros necrófagos de importância forense em laboratório, visando obter uma melhor uniformidade para adição de substâncias tóxicas e tornar mais eficiente a criação e os testes biológicos.

CAPÍTULO I

EFEITO DO FENOBARBITAL NO DESENVOLVIMENTO DE TRÊS ESPÉCIES DO GÊNERO *Chrysomya* (DIPTERA: CALIPHORIDAE) E SUA IMPORTÂNCIA PARA A ESTIMATIVA DO INTERVALO PÓS-MORTE

INTRODUÇÃO

A Entomotoxicologia estuda a aplicação dos insetos necrófagos na análise toxicológica para a identificação de drogas e toxinas presentes em um tecido, assim como também investiga o efeito causado por estas substâncias no desenvolvimento dos artrópodes com o objetivo de aumentar a precisão na estimativa do intervalo pós-morte (IPM). O aumento de mortes relacionadas a drogas ou ainda mortes ligadas ao consumo acidental ou proposital de venenos ou substâncias tóxicas justifica o grande interesse por esse novo ramo da medicina forense (Introna *et al.* 2001).

O fenobarbital é utilizado principalmente no tratamento de convulsões tais como epilepsia, status epiléptico, eclampsia, tétanos e espasmofilia. O fenobarbital é classificado, em função da duração do seu efeito, como uma droga de ação prolongada e está disponível em farmácias com os nomes comerciais de Gardenal® e Luminal®. O espectro terapêutico ótimo vai de 15 a 40 µg/ml, com níveis de toxicidade acima de 40 µg/ml, podendo ocorrer um envenenamento grave em adultos com uma dose oral de 1,0 g. O efeito nocivo mais comum é a sedação e após o uso prolongado de altas doses pode ocorrer tolerância e dependência física e psíquica. A dose letal (DL₅₀) em humanos oscila de 2 a 10 g/kg de massa corporal, mas o álcool ou outros agentes depressores do sistema nervoso central (SNC), quando associados ao fenobarbital, podem potencializar sua ação (Smith 1993).

Este trabalho estudou a ação do fenobarbital na taxa de desenvolvimento e mortalidade de três espécies de califorídeos de interesse forense: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann)

(Diptera), utilizando três dosagens diferentes, além de um grupo controle, sem a presença da droga.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies estudadas e obtenção dos exemplares

A coleta dos espécimes adultos foi feita em ambiente urbano, *C. albiceps* e *C. megacephala* no município de Campinas, SP, e *C. putoria* no município de Botucatu, SP.

Para a coleta dos adultos foram utilizadas iscas como fígado bovino, peixe e vísceras de frango em armadilhas adequadas e modificadas (Moretti *et al.* 2008) a partir da proposta por Ferreira (1978). Logo após as coletas, os insetos foram depositados em frascos cobertos com organza e levados para o Laboratório de Entomologia do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, onde foram anestesiados a -20°C durante 90 seg para serem identificados (Fig. 1.1).

Após a identificação por meio de chave dicotômica (Dear 1985), os exemplares de cada espécie foram depositados separadamente em gaiolas plásticas transparentes (30 x 30 x 50 cm), com aberturas laterais revestidas com telas de náilon (Fig. 1.2). Foram alimentados com dietas à base de açúcar e proteína animal, compostas por solução açucarada e fígado bovino cru. As gaiolas permaneceram em sala climatizada no Laboratório de Criação de Larvas na UNICAMP, sob temperatura controlada de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de $70\pm 10\%$. Foi oferecida carne bovina moída crua como substrato de oviposição (Fig. 1.3).

Para o desenvolvimento dos imaturos foi oferecida a dieta artificial avaliada no capítulo III deste trabalho acrescida da droga e para o grupo controle dieta sem adição de droga, numa proporção de aproximadamente 1,0 g/ovo. Todos os imaturos foram mantidos em câmara de germinação modelo Fanem 387 (Fig. 1.4) sob temperatura controlada de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 h e umidade relativa de $70\pm 10\%$, onde todas as etapas de desenvolvimento foram acompanhadas.

Para cada dosagem da droga foram feitas três réplicas, sendo que somente duas foram manipuladas para obter a massa corpórea dos imaturos por meio de pesagens individuais sem reposição da amostra.

As amostras de dez larvas foram coletadas e pesadas, a partir de 12 h após a eclosão até a pupariação, em intervalos de 12 h. As larvas foram pesadas individualmente a partir das 24 h ou quando a balança registrasse o peso individual, sempre foram selecionadas as larvas de maior tamanho para garantir uniformidade na mensuração.

Fenobarbital

As dosagens 150, 500 e 1000 mg/kg de fenobarbital foram acrescidas para os imaturos junto à dieta artificial. Tais dosagens foram selecionadas a partir de testes preliminares, por tentativa, nos quais foi observado que a DL_{50} para humanos via oral (aproximadamente 5 mg/kg) causou a mortalidade de 100% das larvas já no segundo estágio larval.

Parâmetros biológicos

Foram observados os seguintes parâmetros biológicos: ganho de massa corpórea dos imaturos (mg), duração do período ovo-pupa (h), taxa de emergência (%) (viabilidade), intervalo de emergência (h) e razão sexual dos adultos emergidos.

Análise estatística

Para testar o efeito da droga, foram feitas três ANOVAs de um fator, sendo os fatores: espécie, dosagem (mg/kg) e tempo de desenvolvimento (h). Também foram feitas três ANOVA de dois fatores: espécie e dosagem para cada tempo de desenvolvimento, espécie e tempo para cada dosagem, e dosagem e tempo para cada espécie. A variável resposta foi o logaritmo da massa corporal das larvas ($\log_{10} (\text{Massa}+1)$). As médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, com taxa global de erro (α) de 5%. Todos os testes estatísticos foram feitos utilizando-se o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS® (SAS Inc 2006). Para a elaboração das tabelas foram utilizados os dados da massa corporal das larvas obtidos em mg (Anexos 1 a 12).

RESULTADOS

O fenobarbital afetou significativamente o ganho de massa corporal nas três dosagens testadas de *Chrysomya megacephala* ($F = 240,52$; $p < 0,0001$), *Chrysomya putoria* ($F = 2480,82$; $p < 0,0001$) e *Chrysomya albiceps* ($F = 1730,02$; $p < 0,0001$). As curvas de desenvolvimento larval das três espécies submetidas a diferentes dosagens de fenobarbital podem ser observadas na Fig. 1.5.

Chrysomya megacephala foi a espécie menos afetada no seu desenvolvimento pelas três dosagens de fenobarbital (Fig. 1.4). As larvas expostas à maior dosagem, atingiram o estágio de pupa 60 h após o mesmo ter ocorrido nos outros grupos, que completaram o desenvolvimento larval em 120 h (Tabela 1.1). A sobrevivência no grupo de maior dosagem da droga foi bastante baixa, somente 7,3% para as pupas diminuindo ainda mais ao emergir os adultos (machos 3,3% e fêmeas 2,0%). Este grupo também foi afetado no intervalo de emergência, aumentando-o em 34 h quando comparado ao grupo controle (Tabelas 1.1 e 1.2). As larvas que se desenvolveram na dosagem 500 mg/kg de fenobarbital não conseguiram ganhar tanta massa corporal quanto aquelas do grupo controle. Entretanto, apesar disso a sobrevivência foi de 88%. O ganho de massa corporal na dosagem de 150 mg/kg não foi diferente pelo teste de Duncan daquele ganho no grupo controle, com tempo de desenvolvimento larval igual, o qual ocorreu em 120 h; estes dois grupos se diferenciaram com os grupos das dosagens 500 e 1000 mg/kg, os quais foram diferentes entre si com relação ao ganho de massa corporal durante todo o desenvolvimento larval, exceto às 24 h (Tabelas 1.1 e 1.2).

O desenvolvimento de *C. putoria* foi bastante afetado nas duas dosagens maiores de fenobarbital (Fig. 1.4). Na dosagem de 1000 mg/kg houve 100% de mortalidade no terceiro estágio larval às 132 h, com um ganho de massa corporal muito inferior ao do grupo controle (Tabela 1.3). As larvas submetidas à dosagem de 500 mg/kg atingiram o estágio de pupa às 192 h, 72 h depois do mesmo ter acontecido no grupo controle, comprometendo o ganho de massa corpórea e a sobrevivência (3,3%) (Tabelas 1.1 e 1.3).

Das três espécies estudadas, *C. albiceps* foi a mais afetada pelo fenobarbital, com diferença significativa no ganho de massa corporal nos quatro grupos (Fig 1.4). O grupo 500 mg/kg foi significativamente diferente dos outros grupos, exceto às 24 e 132 h onde a diferença no ganho de massa não foi diferente do grupo 150 mg/kg pelo teste de Duncan. Nas duas dosagens maiores houve 100% de mortalidade: às 96 h de desenvolvimento ainda no segundo estágio larval para aquelas com 1000 mg/kg de droga acrescida à dieta artificial e às 156 h no terceiro estágio larval para o grupo na dosagem de 500 mg/kg. Em ambos os grupos a massa corporal média foi muito mais baixa que as larvas da mesma idade no grupo controle (Tabela 1.4). As larvas do grupo 150 mg/kg ganharam, em média, mais massa das 48 às 84 h e atingiram o estágio de pupa 12 h antes, quando comparadas às do grupo controle. A dosagem mais baixa de fenobarbital (150 mg/kg) teve um efeito paradoxal no ganho de massa corporal durante as primeiras 84 h quando comparado ao grupo controle, mas a partir de 96 h o efeito se inverteu, o que poderia justificar a sobrevivência (91%) e a diminuição em 12h do intervalo de emergência com relação ao grupo controle (Tabelas 1.1 e 1.4).

A maior dosagem (1000 mg/kg) causou mortalidade em duas espécies, *C. putoria* e *C. albiceps* no segundo estágio larval (Tabelas 1.3 e 1.4).

O tempo de desenvolvimento de ovo a pupa quando comparado ao grupo controle de *C. putoria* foi superior em 72 h no grupo 500 mg/kg e em 24 h no grupo 150mg/kg. Para *C. megacephala* o tempo de ovo a pupa foi igual nas duas dosagens menores e o grupo controle, mas os imaturos submetidos à dosagem 1000 mg/kg de fenobarbital retardaram seu desenvolvimento em 60 h para completar o estágio de pupa. Para *C. albiceps* o tempo de desenvolvimento de ovo a pupa foi menor em 12 h no grupo 150 mg/kg quando comparado ao grupo controle (Tabela 1.1).

O intervalo de emergência, isto é, o tempo de desenvolvimento de pupa a adulto foi menor para a dosagem de 150 mg/kg de fenobarbital nas três espécies estudadas. Quando comparado ao grupo controle de cada espécie este intervalo foi inferior em 14 h para *C. megacephala*, 12 h para *C. albiceps* e 2 h para *C. putoria*. Contrário a isso, para as dosagens maiores de fenobarbital o tempo para atingir o estágio adulto foi superior ou igual daquele

observado no grupo controle, para *C. putoria* na dosagem de 500 mg/kg o aumento foi de 40 h e para *C. megacephala* no grupo de 1000mg/kg de 34 h (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Tempo de desenvolvimento de ovo a pupa e intervalo de emergência (h), taxa de sobrevivência e de emergência de adultos (%), das três espécies de *Chrysomya* em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle.

Espécie	Grupo	Tempo de ovo a pupa (h)	Intervalo de emergência (h)	Taxa de sobrevivência das pupas (%)	Emergência de adultos (%)	
					Machos	Fêmeas
<i>C. megacephala</i> (n=270)	Controle	120	92	86,7	40,0	42,7
	150	120	78	70,0	33,3	32,7
	500	120	92	88,0	42,0	44,7
	1000	180	126	7,3	3,3	2,0
<i>C. putoria</i> (n=150)	Controle	120	92	59,3	33,3	35,3
	150	144	90	52,7	20,7	30,0
	500	192	132	3,3	0,7	1,3
	1000	-- ¹	--	--	--	--
<i>C. albiceps</i> (n=200)	Controle	156	90	53,0	37,5	9,5
	150	144	78	91,0	64,0	17,0
	500	-- ¹	--	--	--	--
	1000	-- ²	--	--	--	--

¹ 100% de mortalidade no terceiro estágio larval; ² 100% de mortalidade no segundo estágio larval

Tabela 1.2 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya megacephala* em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$).

Tempo	Controle	150	500	1000
12	0,1 ± 0,01 (A) ¹	0,1 ± 0,01 (A)	0,1 ± 0,01 (B)	0,2 ± 0,01 (C)
24	0,6 ± 0,14 (AB)	0,7 ± 0,12 (A)	0,5 ± 0,11 (BC)	0,5 ± 0,18 (C)
36	2,4 ± 0,46 (A)	2,8 ± 0,36 (A)	1,5 ± 0,38 (B)	0,9 ± 0,13 (C)
48	7,2 ± 0,35 (A)	6,6 ± 0,54 (A)	5,0 ± 1,04 (B)	1,6 ± 0,63 (C)
60	20,6 ± 3,62 ² (A)	18,6 ± 3,08 ² (A)	9,8 ± 3,22 (B)	3,4 ± 1,07 (C)
72	40,0 ± 6,56 (A)	37,5 ± 8,79 (A)	19,7 ± 6,90 ² (B)	3,5 ± 0,98 (C)
84	62,8 ± 6,40 (A)	57,2 ± 6,70 (A)	41,1 ± 8,23 (B)	6,9 ± 0,61 (C)
96	63,8 ± 6,01 (A)	57,0 ± 6,18 (A)	37,5 ± 7,70 (B)	9,5 ± 3,46 (C)
108	53,3 ± 6,03 ³ (A)	51,4 ± 4,26 ³ (A)	36,5 ± 5,65 ³ (B)	15,2 ± 5,83 ² (C)
120	44,6 ± 7,02 ⁴ (A)	45,5 ± 3,71 ⁴ (A)	23,6 ± 2,35 ⁴ (B)	19,8 ± 6,31 (C)
132				34,4 ± 8,48
144				43,4 ± 8,10
156				37,6 ± 6,54 ³
168				34,1 ± 7,51
180				31,4 ± 4,60 ⁴

¹ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha=5\%$); ² Terceiro estágio larval; ³ Pré-pupa; ⁴ Estádio de pupa

Tabela 1.3 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya putoria* em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$).

Tempo	Controle	150	500	1000
12	0,3 $\pm$ 0,01 (A) ¹	0,1 $\pm$ 0,01 (C)	0,2 $\pm$ 0,01 (B)	0,2 $\pm$ 0,01 (B)
24	0,8 $\pm$ 0,17 (A)	0,7 $\pm$ 0,13 (AB)	0,6 $\pm$ 0,18 (B)	0,4 $\pm$ 0,13 (C)
36	4,4 $\pm$ 0,60 (A)	2,5 $\pm$ 0,59 (B)	0,9 $\pm$ 0,13 (C)	0,6 $\pm$ 0,27 (D)
48	9,3 $\pm$ 1,96 ² (A)	5,5 $\pm$ 1,07 (B)	3,1 $\pm$ 0,68 (C)	1,0 $\pm$ 0,27 (D)
60	25,8 $\pm$ 3,78 (A)	13,2 $\pm$ 2,17 ² (B)	4,9 $\pm$ 0,65 (C)	1,6 $\pm$ 0,62 (D)
72	38,1 $\pm$ 6,51 (A)	21,3 $\pm$ 3,42 (B)	7,6 $\pm$ 1,31 ² (C)	1,7 $\pm$ 0,40 (D)
84	50,6 $\pm$ 6,15 (A)	39,3 $\pm$ 6,33 (B)	13,7 $\pm$ 2,58 (C)	3,8 $\pm$ 0,90 (D)
96	49,6 $\pm$ 4,78 ³ (A)	43,4 $\pm$ 4,98 (A)	15,0 $\pm$ 3,52 (B)	2,9 $\pm$ 0,89 (C)
108	47,0 $\pm$ 5,75 (A)	36,9 $\pm$ 12,56 (A)	14,5 $\pm$ 8,55 (B)	3,8 $\pm$ 0,01 (C)
120	41,2 $\pm$ 5,21 ⁴ (AB)	44,9 $\pm$ 3,45 (A)	36,9 $\pm$ 3,51 (B)	2,3 $\pm$ 0,82 (C)
132		36,5 $\pm$ 9,52 ³ (A)	23,1 $\pm$ 5,18 (B)	1,1 $\pm$ 0,43 ⁵ (C)
144		37,2 $\pm$ 4,32 ⁴ (A)	37,2 $\pm$ 6,50 (A)	
156			36,1 $\pm$ 5,19	
168			29,6 $\pm$ 4,43 ³	
180			23,3 $\pm$ 3,83	
192			24,2 $\pm$ 4,33 ⁴	

¹ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha=5\%$); ² Terceiro estágio larval; ³ Pré-pupa; ⁴ Estádio de pupa; ⁵ 100% de mortalidade no segundo estágio larval

Tabela 1.4 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya albiceps* em diferentes dosagens de fenobarbital (mg/kg) em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$).

Tempo	Controle	150	500	1000
12	0,1 ± 0,01 (A) ¹	0,1 ± 0,01 (A)	0,1 ± 0,01 (B)	0,2 ± 0,01 (C)
24	0,4 ± 0,01 (A)	0,4 ± 0,01 (A)	0,2 ± 0,01 (A)	0,2 ± 0,01 (A)
36	0,8 ± 0,20 (B)	1,0 ± 0,23 (B)	0,6 ± 0,01 (A)	0,3 ± 0,01 (C)
48	2,2 ± 0,54 (A)	2,8 ± 0,58 (A)	0,9 ± 0,16 (B)	0,3 ± 0,01 (C)
60	4,5 ± 0,55 (B)	5,5 ± 0,80 (A)	1,7 ± 0,34 (C)	0,4 ± 0,16 (D)
72	8,2 ± 2,68 ² (B)	10,7 ± 3,05 ² (A)	2,0 ± 0,59 (C)	0,5 ± 0,31 (D)
84	13,7 ± 4,23 (B)	18,9 ± 4,02 (A)	2,9 ± 0,76 (C)	0,9 ± 0,30 (D)
96	32,0 ± 5,48 (A)	25,7 ± 3,95 (B)	3,8 ± 0,71 ² (C)	0,9 ± 0,18 ³ (D)
108	52,0 ± 12,49 (A)	35,2 ± 7,79 (B)	2,9 ± 0,86 (C)	
120	53,7 ± 6,65 (A)	36,0 ± 6,06 (B)	4,3 ± 1,22 (C)	
132	48,5 ± 8,51 (A)	22,7 ± 3,51 ⁴ (B)	18,7 ± 6,30 (B)	
144	43,9 ± 6,77 ⁴ (A)	25,3 ± 7,33 ⁵ (B)	12,1 ± 3,20 (C)	
156	41,0 ± 6,80 ⁵ (A)		8,2 ± 3,93 ⁶ (B)	

¹ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha=5\%$); ² Terceiro estágio larval; ³ 100% de mortalidade no segundo estágio larval; ⁴ Pré-pupa; ⁵ Estádio de pupa; ⁶ 100% de mortalidade no terceiro estágio larval

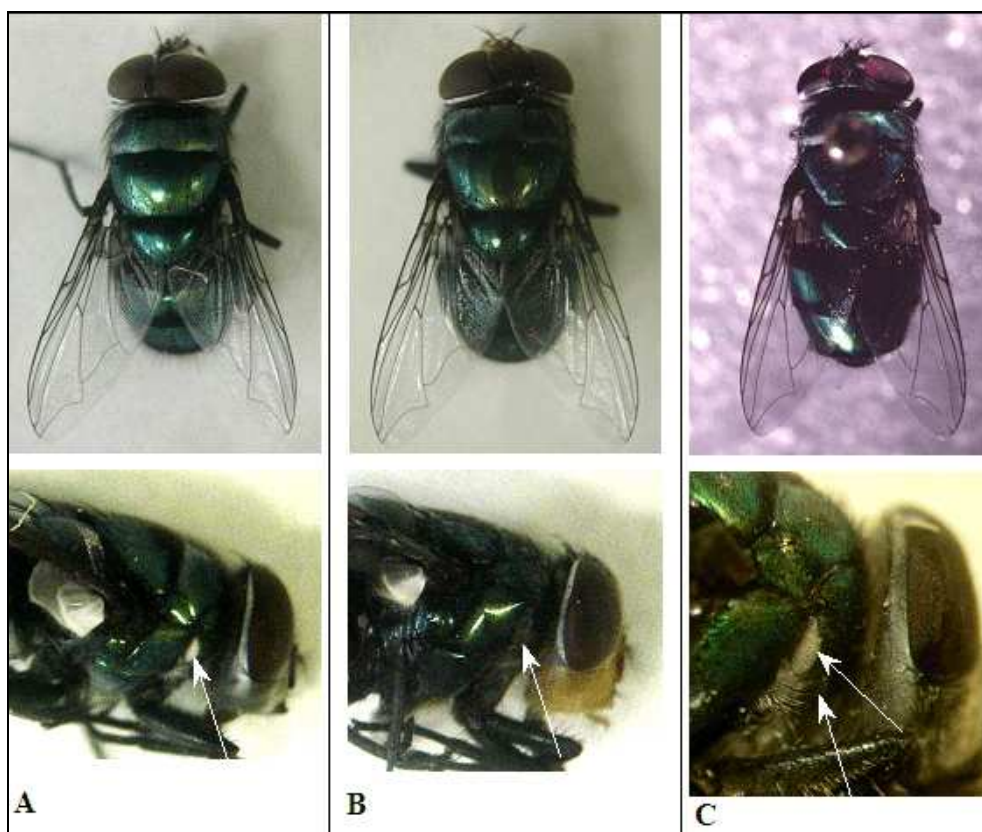


Fig. 1.1. Vista frontal e lateral de adultos de *Chrysomya albiceps* (A), *Chrysomya megacephala* (B) e *Chrysomya putoria* (C).

Setas: espiráculo anterior em forma de “gota”, branco (A); espiráculo anterior escuro (B) e espiráculo anterior branco e cerda localizada logo abaixo (C).
(Fonte: Linhares e Thyssen 2007).



Fig. 1.2 Frascos plásticos utilizados para criação de imaturos de dípteros.



Fig. 1.3 Gaiola plástica transparente para criação e manutenção de indivíduos adultos de dípteros em sala climatizada.



Fig. 1.4 Câmara climática de germinação modelo Fanen 387 utilizada para o desenvolvimento de imaturos de dípteros.

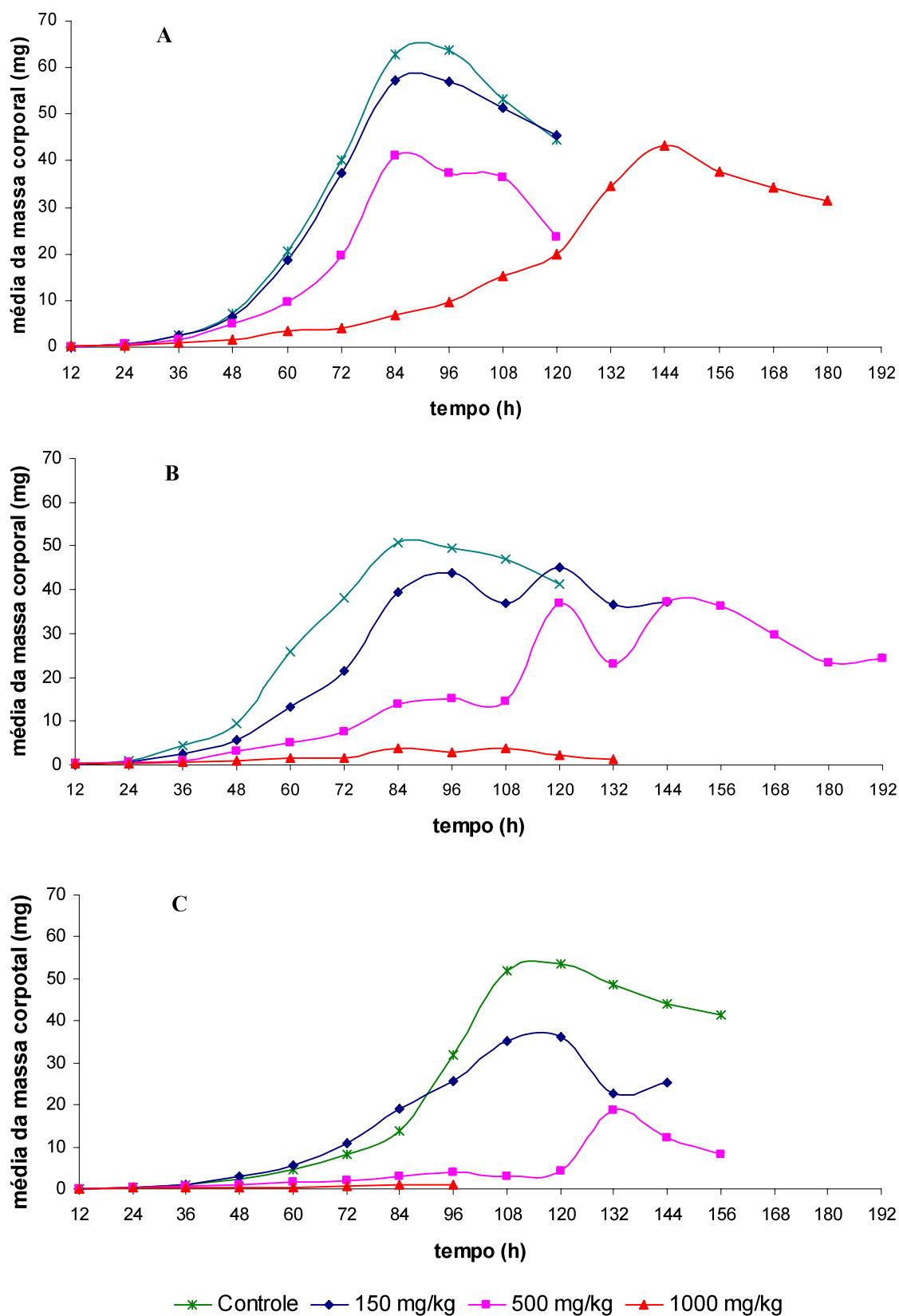


Fig. 1.5 Curvas de desenvolvimento (h) de larvas de *Chrysomya megacephala* (A), *Chrysomya putoria* (B) e *Chrysomya albiceps* (C) submetidas a diferentes dosagens de fenobarbital.

DISCUSSÃO

O efeito do fenobarbital depende do estágio do ciclo de vida em que a mosca se encontra: larval, pupal ou adulta, sendo que cada fase de desenvolvimento foi influenciada de forma diferente na presença da droga, sugerindo que não é possível estabelecer um padrão geral de crescimento da mosca, e sim para cada fase de desenvolvimento. Provavelmente, estas diferenças estejam ligadas ao tempo de contato de cada fase com a droga e ao próprio metabolismo, excreção e/ou bioacumulação da substância.

As larvas criadas no controle e as larvas criadas na dosagem mais baixa de fenobarbital tiveram um desenvolvimento similar, enquanto que as larvas criadas na concentração mais alta apresentaram um padrão de desenvolvimento mais lento que o controle. Isto sugere que a presença do barbitúrico na fonte alimentar retarda o crescimento normal das moscas durante os estágios larvais e o tempo de desenvolvimento pós-embrionário.

No que diz respeito ao tempo de desenvolvimento, o ganho de massa corpórea dos imaturos e a sobrevivência das pupas foi observado que os espécimes de *C. megacephala* foram os menos afetados, tendo sido observado o contrário para imaturos de *C. albiceps*, os quais foram mais afetados. Estes resultados sugerem que as larvas de *C. megacephala* demoram mais para incorporar a droga ou que são mais resistentes aos efeitos do fenobarbital do que *C. albiceps* que apresentou uma maior susceptibilidade.

A menor concentração de fenobarbital parece exercer um efeito paradoxal no maior ganho de massa corporal dos imaturos de *C. albiceps* durante as primeiras 84 h quando comparado ao grupo controle, o que poderia justificar a maior sobrevivência observada no primeiro grupo. O mesmo aconteceu em experimentos realizados com *Boettcherisca peregrina* Robineau-Desvoidy (Diptera: Sarcophagidae) nos quais a sobrevivência de pupas que se alimentaram em tecido contendo cocaína ou heroína foi igual ou superior à do grupo controle, sem ser afetada pela presença ou pela concentração da droga (Goff *et al.* 1989, 1991). Este fato pode ser explicado devido as larvas serem capazes de eliminar eficientemente várias substâncias tóxicas através dos túbulos de Malpighi durante seu

desenvolvimento e, se isto ocorre antes da pupariação, as pupas podem não ser afetadas pela presença da droga na fonte alimentar das larvas (Nourteva e Nuorteva 1982; Wilson *et al.* 1993).

Nas dosagens maiores da droga houve alteração no controle motor do inseto, com uma marcada diminuição na atividade larval, havendo um comportamento não usual de desagregação no meio de cultura, observação que poderia ser usada preliminarmente para considerar a intoxicação como causa de morte (Alves *et al.* 2007).

A mortalidade e a dosagem de fenobarbital apresentaram uma relação diretamente proporcional, isto é, conforme o aumento na dosagem da droga ministrada às larvas ocorreu um aumento na mortalidade tanto larval como pupal. Entre a dosagem da droga e o ganho de massa corporal dos imaturos houve uma relação inversamente proporcional, o que comprometeu o desenvolvimento pós-embrionário das três espécies estudadas nas maiores concentrações.

Estudos anteriores também verificaram uma relação entre o desenvolvimento larval e a dosagem de droga a qual os imaturos foram expostos (Goff *et al.* 1997; Bourel *et al.* 1999), embora nem todos apontem para esse caminho (Goff *et al.* 1989, 1991; Wilson *et al.* 1993; Carvalho *et al.* 2001; O'Brien e Turner 2004; Pien *et al.* 2004), sugerindo que as diferentes respostas à presença de drogas no desenvolvimento pós-embrionário de espécies de califorídeos devam estar ligadas às características inerentes a sua sistemática, por isso não apresentam um padrão estável de comportamento frente a substâncias tóxicas e tornando imprevisível o resultado da ação da droga sem experimentos prévios em laboratório.

Em suma, os resultados obtidos mostraram que houve diferença de horas e até de dias no tempo de desenvolvimento de ovo a pupa nos imaturos submetidos ao fenobarbital, indicando que a presença de uma substância exógena como a analisada faz com que haja uma alteração importante no padrão de desenvolvimento dos insetos que podem ser usados em investigações forenses para calcular o IPM. Desta forma, este estudo contribui para o conhecimento do grau de tal interferência, visando minimizar erros na estimativa do IPM quando baseado no padrão de desenvolvimento normal de *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C.*

putoria, a qual pode ser expresivamente diferente do tempo real de morte quando as espécies são expostas a este barbitúrico.

A informação toxicológica combinada com dados entomológicos, do local da cena criminal e da necropsia são essenciais para determinar a causa da morte e auxiliar na estimativa do IPM. Assim, sugerimos que a análise toxicológica deva ser feita indispensavelmente tanto no material cadavérico, como nas amostras de larvas e pupários de insetos coletados junto ao corpo e não apenas em um tipo de substrato, para que possíveis erros no cálculo do IPM sejam minimizados.

CAPÍTULO II

EFEITO DO TIOPENTAL NO DESENVOLVIMENTO DE TRES ESPÉCIES DO GÊNERO *Chrysomya* (DIPTERA: CALIPHORIDAE) E SUA IMPORTÂNCIA PARA A ESTIMATIVA DO INTERVALO PÓS-MORTE

INTRODUÇÃO

Drogas e substâncias tóxicas podem afetar a taxa de desenvolvimento e o metabolismo de insetos necrófagos, quando estes se alimentam de tecidos de cadáveres que tenham morrido em decorrência do seu uso e abuso (Introna *et al.* 2001). A investigação desses efeitos deve ser levada em conta, já que pode gerar dados imprecisos sobre a sua idade, prejudicando assim a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), quando esta é baseada no ciclo de vida do inseto.

O tiopental é utilizado principalmente como anestésico em clínica veterinária. Classificada como uma droga de curta ação, pode ser usada para procedimentos mais simples tais como observação de fraturas e radiografias, entre outros. O tiopental, comercialmente conhecido como Thiopentax[®] é administrado sob forma injetável intravenosa entre 10 e 30 mg/kg de massa corporal, dependendo da espécie animal. Deprime a atividade do córtex do cérebro, tanto na área motora como sensorial. Dosagens relativamente baixas deprimem o centro respiratório, podendo induzir a ataques cardíacos. Estima-se que a dose letal - DL₅₀ via oral é de 500 mg/kg de massa para camundongos (EMEA 2001).

Este trabalho estudou a ação do tiopental no desenvolvimento de três espécies de califorídeos de interesse forense: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann), utilizando três dosagens diferentes.

MATERIAL E MÉTODOS

Considerando a DL_{50} para camundongos via oral como 500 mg/kg (EMEA 2001), o tiopental foi fornecido para os imaturos junto à dieta artificial nas seguintes dosagens: 0,5 x DL_{50} , DL_{50} e 2 x DL_{50} .

As espécies estudadas, formas de obtenção dos exemplares, parâmetros biológicos, análises toxicológica e estatística estão descritas em Material e Métodos do Capítulo I.

Para a elaboração das tabelas foram utilizados os dados da massa corporal das larvas obtidos em mg (Anexos 13 a 24).

RESULTADOS

O tiopental afetou significativamente o ganho de massa larval nas três dosagens testadas de *Chrysomya megacephala* ($F = 1154,20$; $p < 0,0001$), *C. putoria* ($F = 80,71$; $p < 0,0001$) e *C. albiceps* ($F = 925,14$; $p < 0,0001$). As curvas do tempo de desenvolvimento larval das três espécies testadas com três dosagens diferentes de tiopental podem ser observadas na Fig. 2.1.

O desenvolvimento das larvas de *C. megacephala* foi comprometido na dose supraletal de tiopental, apresentando um ganho de massa corporal significativamente inferior ao restante dos grupos ($\alpha=5\%$), o que levou a 100% de mortalidade no terceiro estágio larval às 96 h do tempo de desenvolvimento. O grupo de imaturos submetidos à dose letal também não completou seu desenvolvimento até o estágio de pupa, ocorrendo 100% de mortalidade no terceiro estágio larval (Fig. 2.1). O grupo submetido à dose subletal de tiopental teve um ganho de massa próximo ao grupo DL_{50} atingindo o estágio de pupa, não entanto a sobrevivência das pupas foi de somente 34%. O grupo controle sempre foi significativamente diferente dos outros grupos, exceto às 120 h onde a média da massa corporal não foi diferente do grupo submetido à dosagem subletal (Tabelas 2.1 e 2.2).

Chrysomya putoria atingiu o estágio de pupa quando submetida a todas as dosagens de tiopental avaliadas (Fig. 2.1). Nas larvas submetidas às dosagens maiores da droga o tempo de desenvolvimento foi mais lento, quando comparado ao grupo controle, atingindo o

estádio de pupa somente às 192 h de desenvolvimento, 48 h após o mesmo ter ocorrido no grupo controle e no grupo com a dose subletal (Tabela 2.3).

A taxa de sobrevivência dos grupos de *C. putoria* submetidos às doses supraletal e letal foi baixa, 12 e 40% respectivamente. O grupo com a dose subletal da droga apresentou o mesmo tempo de desenvolvimento do grupo controle, porém viram-se afetadas a taxa de sobrevivência (65,3%) e o intervalo de emergência, ocorrendo 36 h após o grupo controle ter atingido o estágio adulto (Tabelas 2.1 e 2.3).

Somente as larvas submetidas à dose supraletal de tiopental de *C. albiceps* tiveram 100% de mortalidade ainda no terceiro estágio larval em 144 h, com ganho de massa corporal significativamente mais baixo ($\alpha=5\%$). *C. albiceps* foi a espécie menos comprometida quando tratada com diferentes dosagens da droga (Fig. 2.1), visto que os grupos das doses letal e subletal atingiram o estágio de pupa e conseguiram uma sobrevivência bastante alta na fase adulta, de 86,7 e 65,3% respectivamente. O grupo desenvolvido na dose subletal teve uma sobrevivência maior e o intervalo de emergência foi idêntico ao do grupo controle (Tabelas 2.1 e 2.4).

O tempo de desenvolvimento de ovo a pupa sob o efeito do tiopental foi maior ou igual àquele do grupo controle para as três espécies estudadas. Para *C. putoria* e *C. albiceps* na dosagem subletal esse tempo foi igual ao grupo controle, mas não para *C. megacephala*, que retardou o tempo para atingir o estágio de pupa em 12 h. Para *C. putoria* houve um aumento de 48 h na dosagens letal e supraletal da droga e para *C. albiceps* o grupo submetido à DL_{50} completou o tempo de desenvolvimento até pupa somente 36 h após o mesmo ter acontecido no grupo controle (Tabela 2.1).

O intervalo de emergência foi superior em 36 h para os grupos subletal e supraletal de *C. putoria* quando comparado ao grupo controle, nesta mesma espécie o grupo submetido à dosagem letal teve um aumento de 12 h com o grupo controle para atingir o estágio adulto. Nos imaturos de *C. albiceps* a dose letal de tiopental teve o efeito de aumentar em 24 h o intervalo de emergência, enquanto que na menor dosagem não houve diferença com o grupo controle no intervalo de emergência. O único grupo que atingiu o estágio adulto em *C.*

megacephala foi aquela com a dosagem menor de tiopental com um atraso de 8 h quando comparado ao grupo controle (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 Tempo de desenvolvimento de ovo a pupa e intervalo de emergência (h), taxa de sobrevivência e de emergência de adultos (%), das três espécies de *Chrysomya* em diferentes dosagens de tiopental (mg/kg) em relação ao grupo controle (n = 150).

Espécie	Grupo	Tempo de ovo a pupa (h)	Intervalo de emergência (h)	Taxa de sobrevivência de pupas (%)	Emergência de adultos (%)	
					Machos	Fêmeas
<i>C. megacephala</i>	Controle	120	120	70,7	34,4	28,0
	0,5 x DL ₅₀	132	128	34,0	16,7	14,0
	DL ₅₀	-- ¹	--	--	--	--
	2 x DL ₅₀	-- ¹	--	--	--	--
<i>C. putoria</i>	Controle	144	84	70,0	28,7	34,7
	0,5 x DL ₅₀	144	120	65,3	24,0	22,7
	DL ₅₀	192	96	40,0	11,3	14,0
	2 x DL ₅₀	192	120	12,0	3,3	4,7
<i>C. albiceps</i>	Controle	144	96	77,3	26,7	38,7
	0,5 x DL ₅₀	144	96	97,3	22,0	64,7
	DL ₅₀	180	120	44,0	3,30	16,7
	2 x DL ₅₀	-- ¹	--	--	--	--

¹ 100% de mortalidade no terceiro estágio larval

Tabela 2.2 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya megacephala* em diferentes dosagens de tiopental em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$).

Tempo	Controle	0,5 x DL ₅₀	DL ₅₀	2 x DL ₅₀
12	0,3 ± 0,01 (B) ¹	0,3 ± 0,01 (C)	0,3 ± 0,01 (A)	0,2 ± 0,01 (D)
24	0,9 ± 0,15 (A)	0,7 ± 0,12 (BC)	0,8 ± 0,20 (B)	0,6 ± 0,11 (C)
36	4,4 ± 0,85 (A)	2,4 ± 0,24 (B)	2,5 ± 0,41 (B)	1,8 ± 0,31 (C)
48	8,4 ± 0,60 (A)	4,8 ± 0,62 (B)	4,5 ± 0,94 (B)	3,8 ± 0,96 (C)
60	19,9 ± 3,73 ² (A)	9,7 ± 1,31 ² (B)	7,7 ± 0,98 (C)	6,2 ± 0,51 (D)
72	32,6 ± 5,25 (A)	14,3 ± 4,64 (B)	5,4 ± 1,06 (C)	7,1 ± 1,59 ² (D)
84	54,7 ± 7,22 (A)	35,3 ± 5,11 (B)	30,7 ± 5,92 ² (B)	12,1 ± 1,09 (C)
96	49,0 ± 2,45 ⁴ (A)	42,4 ± 6,54 (B)	32,1 ± 2,19 ³ (C)	14,5 ± 3,70 ³ (D)
108	49,4 ± 5,45 (B)	56,6 ± 7,49 (A)		
120	41,6 ± 4,86 ⁵ (A)	42,7 ± 6,94 ⁴ (A)		
132		39,9 ± 4,64 ⁵		

¹ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha=5\%$); ² Terceiro estágio larval; ³ 100% de mortalidade no terceiro estágio larval; ⁴ Pré-pupa; ⁵ Estádio de pupa

Tabela 2.3 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya putoria* em diferentes dosagens de tiopental em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$).

Tempo	Controle	0,5 x DL ₅₀	DL ₅₀	2 x DL ₅₀
12	0,2 ± 0,01 (A) ¹	0,2 ± 0,01 (A)	0,2 ± 0,01 (A)	0,2 ± 0,01 (A)
24	0,4 ± 0,10 (B)	0,6 ± 0,01 (AB)	0,7 ± 0,12 (A)	0,4 ± 0,01 (B)
36	1,4 ± 0,21 (A)	1,4 ± 0,42 (A)	1,4 ± 0,23 (A)	0,8 ± 0,01 (B)
48	4,5 ± 0,39 (A)	3,8 ± 0,64 (B)	4,2 ± 0,42 (AB)	2,1 ± 0,55 (C)
60	8,8 ± 2,47 ² (A)	7,3 ± 1,87 ² (A)	5,2 ± 0,65 ² (B)	4,3 ± 0,70 (B)
72	15,4 ± 1,51 (A)	9,7 ± 2,12 (B)	16,6 ± 1,52 (A)	5,8 ± 1,56 ² (C)
84	28,8 ± 2,81 (A)	20,5 ± 5,01 (B)	25,5 ± 2,98 (A)	9,1 ± 1,83 (C)
96	31,5 ± 5,48 BA	38,3 ± 7,36 (A)	28,5 ± 3,40 (B)	10,3 ± 4,31 (C)
108	42,3 ± 3,79 (A)	44,9 ± 3,13 (A)	39,2 ± 4,19 (A)	17,3 ± 6,50 (B)
120	27,9 ± 9,78 ³ (BC)	33,6 ± 2,50 ³ (AB)	42,7 ± 5,18 (A)	21,2 ± 6,65 (C)
132	36,7 ± 8,85 (B)	44,4 ± 2,35 (A)	39,9 ± 6,77 (AB)	23,6 ± 6,47 (C)
144	41,9 ± 5,76 ⁴ (A)	40,7 ± 3,06 ⁴ (A)	41,4 ± 5,83 (A)	21,7 ± 4,81 (B)
156			40,6 ± 4,67 (A)	28,8 ± 4,71 (B)
168			37,2 ± 3,78 ³ (A)	25,9 ± 6,06 ³ (B)
180			35,4 ± 1,92 (A)	23,6 ± 4,68 (B)
192			24,8 ± 3,02 ⁴ (A)	14,3 ± 4,27 ⁴ (B)

¹ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha=5\%$); ² Terceiro estágio larval; ³ Pré-pupa; ⁴ Estádio de pupa

Tabela 2.4 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya albiceps* em diferentes dosagens de tiopental em relação ao grupo controle ($\bar{x} \pm dp$).

Tempo	Controle	0,5 x DL ₅₀	DL ₅₀	2 x DL ₅₀
12	0,2 ± 0,01 (A) ¹	0,2 ± 0,01 (B)	0,1 ± 0,01 (BC)	0,1 ± 0,01 (C)
24	0,6 ± 0,01 (A)	0,5 ± 0,01 (B)	0,4 ± 0,01 (C)	0,3 ± 0,01 (D)
36	1,8 ± 0,29 (A)	1,3 ± 0,38 (A)	1,0 ± 0,01 (B)	0,4 ± 0,01 (B)
48	4,7 ± 0,39 (A)	3,9 ± 0,59 (B)	2,0 ± 0,33 (C)	1,6 ± 0,8 (D)
60	11,5 ± 1,93 ² (A)	7,6 ± 0,85 ² (B)	4,3 ± 1,04 (C)	2,3 ± 0,63 (D)
72	17,5 ± 2,45 (A)	15,5 ± 1,02 (A)	6,9 ± 1,58 ² (B)	3,6 ± 0,75 (C)
84	30,9 ± 2,08 (A)	26,5 ± 2,16 (B)	14,6 ± 3,10 (C)	3,9 ± 1,19 ² (D)
96	42,8 ± 4,03 (A)	33,1 ± 5,30 (B)	18,5 ± 3,56 (C)	3,0 ± 0,68 (D)
108	38,4 ± 12,66 (A)	42,3 ± 4,31 (A)	24,4 ± 4,56 (B)	3,2 ± 0,65 (C)
120	38,1 ± 6,40 (B)	47,7 ± 4,93 (A)	28,9 ± 3,26 (C)	3,8 ± 0,9 (D)
132	63,8 ± 11,30 ³ (A)	57,7 ± 10,59 ³ (A)	30,3 ± 4,06 (B)	14,4 ± 5,46 (C)
144	52,7 ± 8,71 ⁴ (A)	57,5 ± 11,20 ⁴ (A)	37,7 ± 5,37 (B)	15,4 ± 6,52 ⁵ (C)
156			35,8 ± 4,52 ³	
168			25,2 ± 1,78	
180			22,9 ± 6,14 ⁴	

¹ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha=5\%$); ² Terceiro estágio larval; ³ Pré-pupa; ⁴ Estádio de pupa; ⁵ 100% de mortalidade no terceiro estágio larval

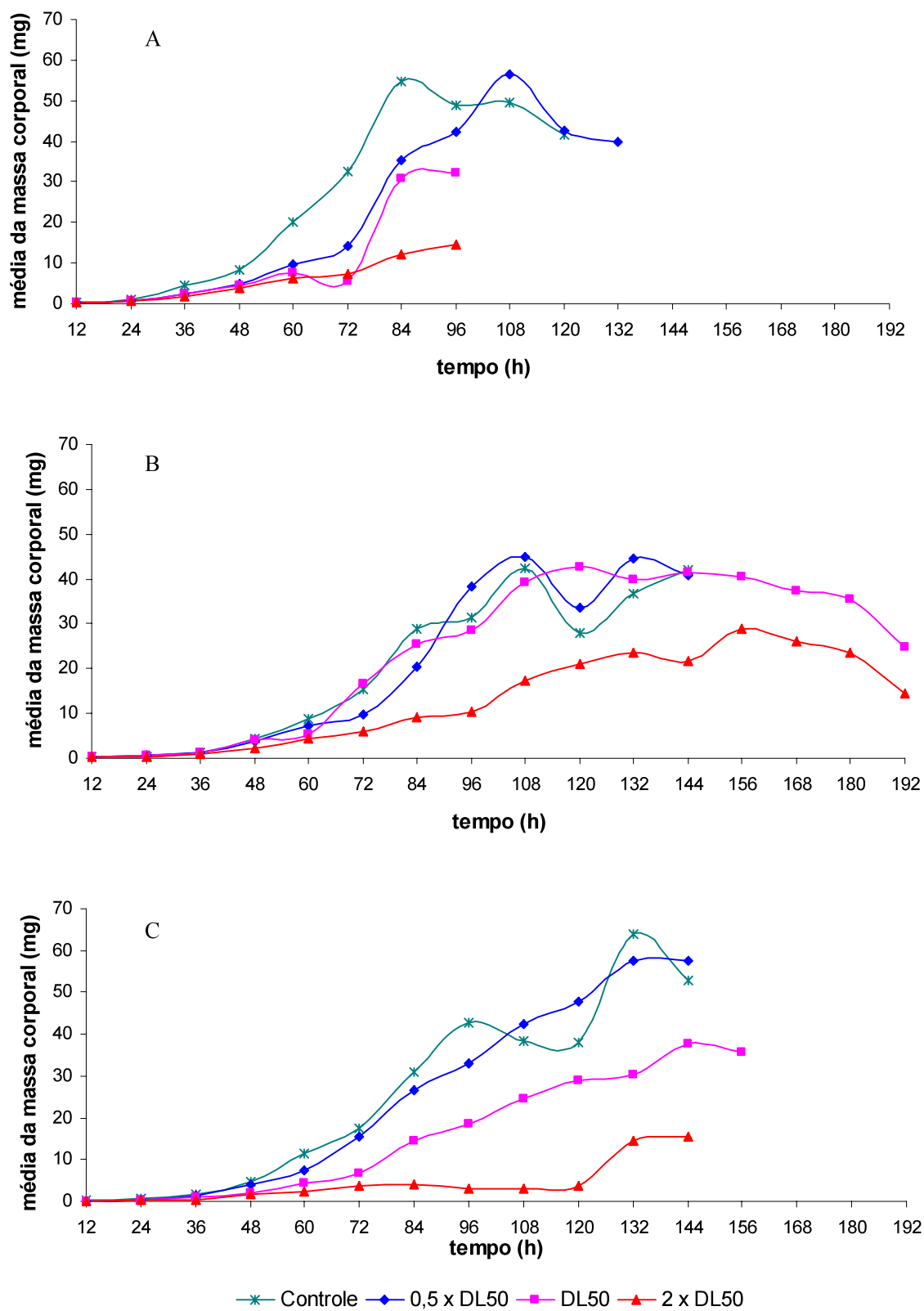


Fig. 2.1 Curvas de desenvolvimento (h) de larvas de *Chrysomya megacephala* (A), *Chrysomya putoria* (B) e *Chrysomya albiceps* (C) submetidas a diferentes dosagens de tiopental.

DISCUSSÃO

Conforme os resultados obtidos da pesagem de larvas em diferentes intervalos de tempo, pode-se afirmar, de modo geral, que o tiopental influenciou o ganho de massa corporal e o crescimento das larvas independentemente da espécie. A diminuição no ganho de massa corporal provavelmente deveu-se ao fato da droga reduzir a atividade larval e, conseqüentemente os imaturos se alimentaram menos limitando assim seu crescimento. Tal comportamento provavelmente está relacionado com a resposta metabólica dos insetos na bioacumulação da droga que ocorreu durante todo o ciclo de vida dos espécimes estudados, visto seu efeito no crescimento larval, pupariação, sobrevivência e emergência dos adultos.

As larvas expostas ao tiopental se desenvolveram e cresceram mais lentamente e, por isso, também empuparam e emergiram depois daquelas do grupo controle, afetando assim o tempo de pupariação e emergência dos adultos. A droga é o principal fator na influência da taxa de mortalidade, embora a resposta à alteração dos parâmetros biológicos avaliados tenha variado conforme a espécie.

No que diz respeito ao tempo de desenvolvimento, o ganho de massa corpórea dos imaturos e a sobrevivência das pupas foi observado que os espécimes de *C. putoria* foram os menos afetados, tendo sido observado o contrário para imaturos de *C. megacephala*, os quais foram mais afetados. Estes resultados sugerem que as larvas de *C. putoria* demoram mais para incorporar a droga ou que são mais resistentes aos efeitos do tiopental do que *C. megacephala* que apresentou uma maior susceptibilidade.

Chrysomya albiceps apresentou maior sobrevivência na menor dosagem de tiopental, com tempo de desenvolvimento e intervalo de emergência iguais ao grupo controle. O mesmo aconteceu em experimentos realizados com *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) nos quais a sobrevivência de pupas que se alimentaram em tecido contendo cocaína ou heroína foi igual ou superior à do grupo controle, sem ser afetada pela presença ou pela concentração da droga (Goff *et al.* 1989, 1991). Este fato pode ser explicado devido as larvas serem capazes de eliminar eficientemente várias substâncias tóxicas através dos túbulos de Malpighi durante seu desenvolvimento e se isto ocorre antes da pupariação, as

pupas podem não ser afetadas pela presença da droga na fonte alimentar das larvas (Nourteva e Nuorteva 1982; Wilson *et al.* 1993).

Nas dosagens maiores da droga houve alteração no controle motor do inseto, com uma marcada diminuição na atividade larval, havendo um comportamento não usual de desagregação no meio de cultura, observação que poderia ser usada preliminarmente para considerar a intoxicação como causa de morte (Alves *et al.* 2007).

A mortalidade e a dosagem de tiopental apresentaram uma relação diretamente proporcional, isto é, conforme o aumento na dosagem da droga ministrada às larvas ocorreu um aumento na mortalidade tanto larval como pupal. Entre a dosagem da droga e o ganho de massa corporal dos imaturos houve uma relação inversamente proporcional, o que comprometeu o desenvolvimento pós-embrionário das três espécies estudadas nas maiores concentrações.

Estudos anteriores também verificaram uma relação entre o desenvolvimento larval e a dosagem de droga a qual os imaturos foram expostos (Goff *et al.* 1997; Bourel *et al.* 1999), embora nem todos apontem para esse caminho (Goff *et al.* 1989, 1991; Wilson *et al.* 1993; Carvalho *et al.* 2001; O'Brien e Turner 2004; Pien *et al.* 2004), sugerindo que as diferentes respostas à presença de drogas no desenvolvimento pós-embrionário de espécies de califorídeos devam estar ligadas às características inerentes a sua sistemática, por isso não apresentam um padrão estável de comportamento frente a substâncias tóxicas e tornando imprevisível o resultado da ação da droga sem experimentos prévios em laboratório.

Em suma, os resultados obtidos mostraram que houve diferença de horas e até de dias no tempo de desenvolvimento de ovo a pupa nos imaturos submetidos ao tiopental, indicando que a presença de uma substância exógena como a analisada faz com que haja uma alteração importante no padrão de desenvolvimento dos insetos que podem ser usados em investigações forenses para calcular o IPM. Por exemplo, nas dosagens maiores em *C. putoria* ocorreu um retardamento de dois dias e na dosagem letal para *C. albiceps* de um dia e meio no desenvolvimento total dos imaturos. Desta forma, este estudo contribui para o conhecimento do grau de tal interferência, visando minimizar erros na estimativa do IPM

quando baseado no padrão de desenvolvimento normal de *C. albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*, a qual pode ser expresivamente diferente do tempo real de morte quando as espécies são expostas a substâncias tóxicas.

Estes resultados têm uma importante implicação para a estimativa do IPM feita através de técnicas entomológicas nos casos envolvendo tiopental. Em primeiro lugar porque se uma pessoa fez uso da droga antes de sua morte, acidental ou intencional, a substância ou seus metabólitos estará presente no organismo e a probabilidade de ingestão pelas larvas é alta. Em segundo lugar, para a estimativa do IPM muitas vezes até os minutos são importantes e o que se verifica aqui é uma diferença de dias para os imaturos atingirem o estágio de pupa, como também foi observado por Carvalho (2001).

Embora estudos de entomotoxicologia tenham sido feitos com poucas espécies de moscas, é possível assumir que variações similares também ocorram para as demais espécies de Diptera que se alimentem em tecidos contendo barbitúricos. Fica evidente a necessidade de estudos com outras espécies de interesse forense e outras drogas lícitas ou não, de uso freqüente ou contínuo e de seus metabólitos, em diferentes dosagens com a finalidade de construir um banco de dados que possa auxiliar investigações criminais.

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA TAXA DE DESENVOLVIMENTO DE *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya megacephala* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) CRIADAS EM DIETA ARTIFICIAL ACRESCIDA DE TECIDO ANIMAL PARA USO FORENSE

INTRODUÇÃO

As dietas artificiais para a criação e a manutenção de insetos em laboratório têm aplicações tanto na pesquisa básica como aplicada. Na literatura são encontrados diferentes tipos de dietas artificiais para mais de 1300 espécies de insetos, sendo que mais de 200 referem-se somente à criação de dípteros de importância agrícola (Singh e Moore 1985).

As principais vantagens do uso de dietas artificiais são a uniformidade nutricional no meio de cultura, a uniformidade biológica no desenvolvimento do inseto, a possibilidade de manutenção de várias gerações e a diminuição do risco de contaminação por organismos entomopatogênicos (Parra 1990). Apesar disso, o número de trabalhos destacando o desenvolvimento e aperfeiçoamento delas é pequeno, principalmente para alguns grupos de insetos que apresentam uma dificuldade natural para serem mantidos em criação no laboratório (D'Almeida e Oliveira 2002).

As espécies *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), conhecidas popularmente como varejeiras, foram introduzidas no Brasil a partir da década de 70 (Guimarães *et al.* 1978), espalhando-se rapidamente por todo o território brasileiro e o continente americano devido a sua considerável habilidade de dispersão e adaptação (Baumgartner e Greenberg 1984). Estas espécies se criam e se alimentam em fezes e carcaças em decomposição (Greenberg 1971, 1973), tornando-se potencialmente vetores de vírus e patógenos entéricos, que aliado ao alto grau de sinantropia, as coloca como importantes para a saúde pública uma vez que estão associadas a doenças e quadros de miíases (Guimarães *et al.* 1979). Em diversos levantamentos feitos na região de Campinas, SP, utilizando como iscas carcaças de animais (Mendes e Linhares 1993;

Souza 1998; Carvalho *et al.* 2004) e em coletas em cadáveres no Instituto Médico Legal (Carvalho *et al.* 2000), estas foram as espécies que mais se destacaram entre os dípteros coletados, pela grande abundância e frequência com que exploram este tipo de recurso. Também tem sido observado que estas espécies pertencem a um dos primeiros grupos de insetos a colonizar os corpos nos primeiros estágios de decomposição (Thyssen e Carvalho - comunicação pessoal), demonstrando o seu potencial para uso como vestígio dentro das peças periciais. *Chrysomya megacephala* tem a capacidade de se criar em diferentes substratos o qual torna possível seu desenvolvimento de dietas artificiais, mas *C. albiceps* é caracterizada como especialista devido ao fato de utilizar apenas um tipo de substrato para criação de suas larvas, neste caso, material de origem animal em decomposição (Zumpt 1965).

Na maioria das vezes, pela dificuldade de adaptação desta espécie a uma dieta artificial e também pela inexistência de um meio universal que possibilite a manutenção da maioria dos necrófagos coletados em corpos em decomposição com o fim de se investigar o tempo ou a causa do óbito em casos de crimes violentos, por exemplo, somente a carne pura acaba sendo escolhida para utilização como substrato de criação e desenvolvimento dos imaturos. Um dos grandes problemas observados em relação a esta questão é o odor característico de matéria orgânica em decomposição, bastante desagradável no local em que as amostras são depositadas, no decorrer dos dias, além do aumento de possível contaminação secundária por insetos atraídos a estes recintos.

A Entomotoxicologia, uma área recente dentro da Entomologia Forense, vem mostrando que substâncias tóxicas podem afetar a taxa de desenvolvimento de insetos necrófagos, uma vez que ao se alimentar dos tecidos introduzem as toxinas no seu metabolismo (Introna *et al.* 2001). Desse modo, a investigação dos efeitos causados por certas substâncias no desenvolvimento dos insetos deve ser levada em conta já que, gerando dados imprecisos sobre a sua idade, podem prejudicar a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), quando esta é baseada no aspecto biológico, ou seja, no tempo de desenvolvimento.

Não há dúvida que testes preliminares são cruciais para investigar e quantificar estes efeitos assim como também a criação de um banco de dados que possa ser útil na prática forense. A contribuição da dieta artificial, em particular neste caso, decorre da melhor uniformidade obtida para a adição de drogas, por possibilitar a sobrevivência de moscas necrófagas em laboratório, e por dispensar o uso de cobaias que têm um custo elevado em pesquisa básica.

Assim, o presente estudo avaliou a taxa de desenvolvimento pós-embriônico das espécies *C. albiceps* e *C. megacephala* quando criadas em dietas artificiais adicionando em cada preparação um tipo de tecido animal (fígado, rúmen e músculo bovinos ou coração de frango), as quais foram oferecidas como fonte exclusiva de alimentação. Tendo como objetivo desenvolver e aperfeiçoar uma nova dieta artificial para criação de dípteros necrófagos de importância forense em laboratório, visando obter uma melhor uniformidade para adição de substâncias tóxicas e tornar mais eficiente a criação e os testes biológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos exemplares para o estudo.

A coleta dos espécimes adultos foi feita em ambiente urbano no município de Campinas, SP, usando armadilhas apropriadas (Moretti *et al.* 2008), as quais continham como iscas fígado bovino, peixe e vísceras de frango, expostas no ambiente num período de 24 h. Após a coleta, os espécimes coletados foram encaminhados ao laboratório de Entomologia do Departamento de Parasitologia da UNICAMP, onde foram anestesiados durante 90 seg a -20°C para permitir sua identificação com o uso de chave dicotômica (Dear 1985).

Após a identificação, os exemplares foram transferidos para gaiolas plásticas transparentes (30 x 30 x 50 cm), mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12 h e $70 \pm 10\%$ de UR, onde os insetos adultos foram alimentados com solução açucarada, além do oferecimento de fígado bovino cru para maturação de seus folículos ovarianos. Para obtenção dos ovos foram colocados aproximadamente 50 g de carne bovina moída crua. Os ovos foram retirados da carne cuidadosamente, com uso de pincel fino, contados sob estereomicroscópio e depositados sobre os diferentes tipos de dietas contidas em frascos plásticos transparentes, devidamente etiquetados e identificados.

Descrição das dietas e montagem do experimento.

Foram testados cinco tipos de dietas, com e sem acréscimo de tecidos animais, comparando a eficiência de cada uma para o desenvolvimento dos imaturos em relação a um grupo controle, mantido somente em carne. A composição básica para o preparo de todas as dietas pode ser encontrada na Tabela 3.1 O preparo consiste em misturar o tecido animal a uma parte da água destilada até a completa homogeneização, sendo depois acrescidos os demais componentes básicos à mistura, exceto o agar-agar. Secundariamente, o agar deve ser preparado com 330 ml de água levando ao fogo até próximo à fervura. Após isto, o agar preparado a aproximadamente 50°C , deve ser misturado aos demais componentes homogeneizando o meio pela última vez. As dietas podem ser utilizadas após 30 min de preparo, ou então aproveitadas quando mantidas sob refrigeração, por até no máximo cinco dias.

Os testes foram realizados com 300 ovos, mantendo uma proporção de 1 g de alimento para cada ovo/larva e divididos em duas réplicas. Todos os imaturos foram mantidos em câmara de germinação modelo Fanem® 387 sob temperatura controlada de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, fotofase de 12 h e $70 \pm 10\%$ de UR.

Parâmetros biológicos.

A eficiência de cada dieta foi observada levando-se em conta o ganho de massa dos imaturos (mg), o tempo de desenvolvimento larval (h), a percentagem de pupas e de adultos obtidos (%), o intervalo de emergência (h) e o tamanho dos adultos.

Para mensurar o ganho de massa foi usada uma balança analítica modelo Scientech® SA 210. Antes da pesagem, todos os espécimes foram lavados com água destilada para remover os resíduos da dieta e secos em papel filtro. A cada 12 h após a eclosão e perdurando até a pupariação, 10 espécimes eram retirados, pesados individualmente sem reposição da amostra, selecionando os de maior tamanho para garantir uniformidade na mensuração.

Análise estatística.

Para testar a ocorrência de diferença entre as médias observadas para um dos parâmetros biológicos observados para cada tipo de dieta foi realizada análise de variância de um fator. As médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, com taxa global de erro (α) de 5%. Tal análise foi feita utilizando o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS® (SAS Inc. 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O grupo controle teve a maior eficiência no desenvolvimento das duas espécies (Fig. 3.1 e Tabelas 3.2 e 3.3), conforme o observado por D'Almeida *et al.* (2000) já que em condições naturais, o desenvolvimento pós-embrionário ocorre em substrato rico em proteína animal como carcaças de animais em decomposição.

No grupo dos imaturos *C. albiceps* alimentados na dieta D5, sem acréscimo de tecido animal, houve 100% de mortalidade às 144 h de desenvolvimento, ainda no início do terceiro

estádio larval (Tabela 3.2). Em testes preliminares a dieta proposta por Leal *et al.* (1982), já tinha se mostrado deficiente para a criação e manutenção de *C. albiceps* em condições de laboratório, tendo em vista as altas taxas de mortalidade de espécimes ainda na fase inicial de desenvolvimento (primeiro e segundo estágio larval). Isto sugere que os ingredientes dessa dieta são insuficientes e/ou inadequados para o completo desenvolvimento pós-embrionário desta espécie (Souza 1998).

As dietas de D1, D2, D3 e D4 não restringiram o desenvolvimento larval de *C. albiceps* até a pupariação, sendo que a maioria dos espécimes (Tabela 3.2) atingiu uma massa corporal na fase de pré-pupa superior ao peso mínimo necessário (42 mg) para a emergência de adultos como foi observado por Queiroz e Milward-de-Azevedo (1991).

O alto ganho de massa corpórea dos espécimes de *C. albiceps* alimentados com as dietas D1 e D2 em relação aos demais pode ser devido ao acréscimo de fígado e músculo bovino, respectivamente, os quais contêm proteína animal com um alto valor nutritivo, suplementando as proteínas já presentes no leite em pó. Porém, o fígado participa na filtração de impurezas e diversas toxinas transportadas via sanguínea no bovino, além de ter uma alta quantidade de lipídios, glicídios, proteínas, vitaminas e hormônios as quais podem ter afetado mais tardiamente a taxa de sobrevivência dos adultos (50%), como foi observado neste trabalho (Tabelas 3.2 e 3.4).

O músculo bovino, acrescido à dieta D2, não apresenta as mesmas desvantagens citadas acima para o fígado. Contudo, devido à gordura presente na carne foi difícil obter uma boa homogeneização no preparo da dieta, o que dificultaria a sua utilização para bioensaios, em particular na área de entomotoxicologia, que necessita um padrão de substrato uniforme para a adição de drogas ou quaisquer outras substâncias a serem testadas, possibilitando assim a obtenção de resultados confiáveis.

O prolongamento da fase larval para também *C. albiceps* sugere que a falta de uniformidade da dieta tenha feito com que os imaturos precisassem de um tempo maior para procurar o alimento que lhe garantiria uma massa corpórea mínima para atingir o estágio de pupa e, subsequentemente, a fase adulta. Logo, tal gasto energético pode ter contribuído

para a baixa taxa de sobrevivência (34%) observada (Fig. 3.1 e Tabelas 3.2 e 3.4), a qual torna a dieta inapropriada para a criação e manutenção de colônias em laboratório.

Todos os imaturos de *C. megacephala* conseguiram completar seu desenvolvimento nas cinco dietas testadas (Tabela 3.3). Somente espécimes alimentados com a dieta D3 apresentaram um intervalo de emergência maior (120 h) que os demais grupos (em média, aproximadamente, de 97 h), sugerindo que um maior tempo de desenvolvimento até o estágio adulto possa estar ligado a insuficiência nutricional devido ao tipo ou qualidade de proteína presente no rúmen ou a alguma substância que possa ter atuado como inibidora do metabolismo no estágio imaturo. Isto leva a um maior gasto energético, pois os imaturos tiveram que ingerir uma maior quantidade de alimento para atingir a fase subsequente de seu desenvolvimento, o que contribuiu também com a baixa taxa de sobrevivência (34%) observada (Tabela 3.5), tornando essa dieta inapropriada para *C. megacephala*.

Os imaturos alimentados na dieta D4, tanto para *C. albiceps* como para *C. megacephala* mostraram maior eficiência nos parâmetros: taxa de sobrevivência e intervalo de emergência (Fig. 3.1 e Tabelas 3.4 e 3.5), sendo este último um dos mais eficazes na avaliação das dietas artificiais (D'Almeida *et al.* 2001).

Com relação ao ganho de massa corporal as moscas adultas foram maiores quando provenientes de pupas mais pesadas, evidenciando assim que a dieta D4 é apropriada para o desenvolvimento e continuidade da manutenção de colônias das duas espécies estudadas em laboratório pois, segundo Lopes (1941), o grau de desenvolvimento ovariano e a fecundidade são fatores dependentes sobretudo do tamanho das moscas adultas.

Finalmente, sugerimos que a dieta D4 pode ser utilizada na manutenção de colônias de dípteros muscóides em laboratório, principalmente califorídeos como *C. albiceps* e *C. megacephala* sem ocorrer maior interferência no desenvolvimento pós-embriônico. Enumeramos como vantagens o uso de um único tipo de dieta para toda manutenção de califorídeos no laboratório e, adicionalmente, por dispensar o uso de cobaias em análises toxicológicas, diminuindo desse modo o custo da pesquisa e priorizando ao máximo a ética experimental.

Tabela 3.1 Composição para o preparo de 1 kg das dietas artificiais usadas para o desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya megacephala*.

Grupos experimentais	Tecidos animais crus e quantidade de água para dissolução do tecido	Demais componentes
D1	300 g de fígado bovino + 700 ml	100 g de leite em pó integral
D2	300 g de músculo bovino moído + 900 ml	100 g de levedo de cerveja em pó
D3	200 g de rúmen bovino + 900 ml	5 g de caseína 2 g de nipagin
D4	200 g de coração de frango ¹ + 900 ml	15 g de agar-agar
D5 ²	1000 ml	4 g de nipagin ³ 20 g de agar-agar

¹ proveniente de aves alimentadas sem hormônios; ² proposta por Leal *et al.* 1982; ³ a quantidade dos demais componentes é semelhante a usada para as outras dietas.

Tabela 3.2 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya albiceps* ($\bar{x} \pm dp$) em diferentes meios de criação.

Tempo	C	D1	D2	D3	D4	D5
12	0.11 ± 0,01	0.15 ± 0,01	0.12 ± 0,01	0.08 ± 0,01	0.15 ± 0,01	0.08 ± 0,01
24	0.31 ± 0,01	0.29 ± 0,01	0.23 ± 0,01	0.27 ± 0,01	0.32 ± 0,01	0.26 ± 0,01
36	1.55 ± 0.24	0.60 ± 0,01	0.47 ± 0,01	0.78 ± 0,01	0.83 ± 0,01	0.46 ± 0,01
48	5.47 ± 0.46	1.24 ± 0.18	1.60 ± 0.11	2.35 ± 0.26	2.37 ± 0.31	0.68 ± 0.19
60	16.13 ± 3.24 ¹	3.52 ± 0.69	3.05 ± 0.45	5.13 ± 0.48	5.56 ± 0.36	0.82 ± 0.24
72	44.32 ± 6.13	5.29 ± 0.74	5.73 ± 0.77	8.11 ± 0.54 ¹	8.21 ± 0.78 ¹	1.21 ± 0.18
84	64.22 ± 5.93	7.87 ± 1.50 ¹	6.19 ± 0.87 ¹	17.76 ± 2.14	23.63 ± 2.88	2.20 ± 1.10
96	75.74 ± 4.56	13.25 ± 1.89	9.13 ± 1.84	24.22 ± 2.14	31.11 ± 3.45	2.51 ± 0.99
108	78.57 ± 4.77	26.97 ± 7.16	12.54 ± 3.53	41.16 ± 6.04	42.43 ± 4.70	3.77 ± 1.40
120	84.95 ± 10.22 ² (C) ⁵	35.94 ± 5.76	40.70 ± 6.49	49.45 ± 4.12	47.17 ± 4.26	3.85 ± 0.99 ¹
132	65.02 ± 4.35 ³	61.91 ± 5.28	60.72 ± 6.24	55.36 ± 5.06	54.71 ± 4.89	4.77 ± 1.46
144		69.75 ± 6.30	68.38 ± 6.11	64.49 ± 2.42	58.81 ± 4.21	5.77 ± 2.15 ⁴
156		71.44 ± 9.50	70.76 ± 8.91	65.60 ± 5.52 ² (A)	61.14 ± 4.62 ² (A)	
168		61.86 ± 5.30 ² (A)	69.83 ± 7.95 ² (B)	64.98 ± 3.67	59.43 ± 5.87	
180		54.65 ± 5.30 ³	67.93 ± 8.78	60.62 ± 5.96	56.75 ± 6.64	
192			55.85 ± 3.53 ³	54.05 ± 3.67	53.12 ± 4.45	
204				46.82 ± 4.16 ³	39.75 ± 4.72 ³	

¹ Terceiro estágio larval; ² Pré-pupa; ³ Estádio de pupa; ⁴ 100% de mortalidade no terceiro estágio larval; ⁵ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

Tabela 3.3 Média da massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya megacephala* ($\bar{x} \pm dp$) em diferentes meios de criação.

Tempo	C	D1	D2	D3	D4	D5
12	0,27 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01
24	0,92 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,09	0,91 $\pm$ 0,10	0,75 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,12
36	6,60 $\pm$ 1,39	3,10 $\pm$ 0,67	2,84 $\pm$ 0,83	2,43 $\pm$ 0,33	3,30 $\pm$ 0,70	2,35 $\pm$ 0,24
48	21,97 $\pm$ 4,09 ¹	8,60 $\pm$ 1,40	13,27 $\pm$ 1,39 ¹	8,00 $\pm$ 0,26	11,00 $\pm$ 0,60	7,11 $\pm$ 1,29
60	56,77 $\pm$ 4,96	26,93 $\pm$ 4,90 ¹	39,24 $\pm$ 4,32	27,24 $\pm$ 1,24	36,98 $\pm$ 5,05	25,69 $\pm$ 4,21 ¹
72	70,7 $\pm$ 3,99	49,31 $\pm$ 8,46	65,51 $\pm$ 4,22	56,19 $\pm$ 2,67	57,55 $\pm$ 4,74	48,14 $\pm$ 5,49
84	75,6 $\pm$ 3,29	67,37 $\pm$ 4,39	67,85 $\pm$ 5,04	75,76 $\pm$ 5,27 ¹	79,08 $\pm$ 3,18 ¹	66,40 $\pm$ 8,07
96	71,02 $\pm$ 7,34 ²	59,38 $\pm$ 5,18 ²	66,44 $\pm$ 3,87 ²	79,92 $\pm$ 4,38	74,28 $\pm$ 4,72 ²	64,40 $\pm$ 5,91 ²
108	61,03 $\pm$ 2,76 ³ (B) ⁴	52,61 $\pm$ 4,31 ³ (E)	56,23 $\pm$ 2,34 ³ (C)	76,05 $\pm$ 3,58 ²	67,70 $\pm$ 4,32	62,36 $\pm$ 6,80
120				67,93 $\pm$ 5,42	55,69 $\pm$ 2,20 ³ (A)	55,54 $\pm$ 6,58 ³ (D)
132				62,76 $\pm$ 2,47 ³ (A) ⁵		

¹ Terceiro estágio larval; ² Pré-pupa; ³ Estádio de pupa; ⁴ Para uma mesma linha, médias com letras iguais não são significativamente diferentes entre si, pelo Teste de Duncan ($\alpha = 5\%$).

Tabela 3.4 Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de *Chrysomya albiceps* em diferentes meios de criação (n = 150).

Grupo	Pupas (%)	Emergência de adultos (%)		Intervalo de emergência (h)
		Machos	Fêmeas	
Controle	89,3	62,0	27,3	96
Dieta D1	50,0	34,7	13,3	108
Dieta D2	34,0	21,3	12,0	96
Dieta D3	52,0	31,3	16,6	60
Dieta D4	68,0	26,0	37,3	60
Dieta D5	-- ¹	--	--	--

¹ 100% de mortalidade no terceiro estágio larval.

Tabela 3.5 Taxa de sobrevivência (%) e intervalo de emergência (h) de imaturos de *Chrysomya megacephala* em diferentes meios de criação (n = 150).

Grupo	Pupas (%)	Emergência de adultos (%)		Intervalo de emergência (h)
		Machos	Fêmeas	
Controle	70,0	39,5	29,5	96
Dieta D1	89,0	49,5	39,0	96
Dieta D2	73,5	35,0	39,0	96
Dieta D3	34,0	18,0	14,7	120
Dieta D4	91,3	51,3	39,3	108
Dieta D5	81,0	51,0	29,5	92

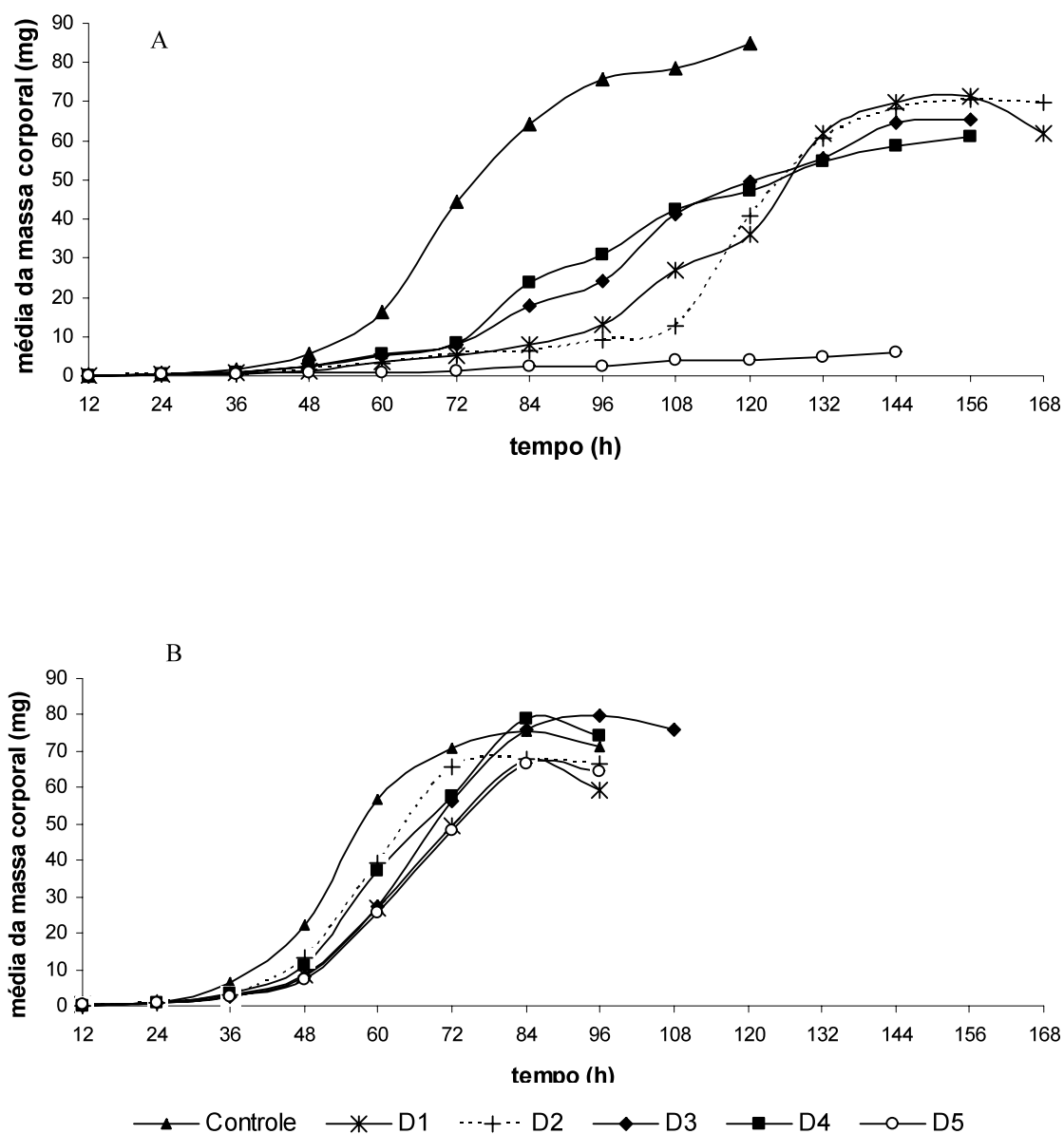


Fig. 3.1 Curvas de tempo de desenvolvimento (h) versus massa corporal (mg) de larvas de *Chrysomya albiceps* (A) e *Chrysomya megacephala* (B) alimentadas em diferentes dietas artificiais e em carne, desde as primeiras 12 h pós-eclosão até a o fim do terceiro estágio larval.

CONCLUSÕES GERAIS

1. Houve retardamento acentuado do desenvolvimento pós-embrionário e marcada diminuição no tamanho e ganho de massa corpórea dos imaturos das três espécies estudadas quando expostas às diferentes concentrações dos barbitúricos.
2. As três espécies estudadas, apesar de pertencerem à mesma família (Calliphoridae), apresentam susceptibilidade ou sensibilidade diferente aos barbitúricos avaliados, isto é, cada espécie reage de maneira diferente à mesma droga e sua concentração durante o estágio larval, apresentando padrões de desenvolvimento diferentes.
3. A mesma espécie quando submetida a drogas diferentes, mesmo que pertencentes à mesma classe, não exibem um padrão estável de desenvolvimento pós-embrionário e comportamento, tornando imprevisível o resultado da ação da droga sem experimentos prévios em laboratório. Por isto, é necessário avaliar cada droga em diferentes dosagens para cada uma das espécies de interesse forense para construção de um banco de dados que possa auxiliar às investigações criminais.
4. Os resultados obtidos neste trabalho são relevantes para a entomologia forense, visto a alteração dos processos de desenvolvimento e crescimento das moscas quando expostas às diferentes concentrações e drogas, principalmente no que diz respeito à estimativa do IPM, que pode ser equivocada no caso de somente serem avaliadas as condições do local da cena criminal e da necropsia. Com isso, a análise toxicológica deve ser feita tanto do material cadavérico, como das amostras de larvas e pupários de insetos coletados junto ao corpo, além de levar em conta fatores intrínsecos e extrínsecos que interagem no processo de desenvolvimento da fauna cadavérica. Embora esses dados sejam apenas para três espécies de moscas da família

Calliphoridae, pode-se assumir que variações semelhantes também existam para outras espécies que se alimentem em tecidos contendo as drogas utilizadas.

5. Futuros estudos devem ser feitos para estabelecer como diferentes drogas afetam o desenvolvimento dos insetos. Isto é necessário para interpretar os dados do ciclo de vida, visto que a presença destas drogas no substrato alimentar alteram o tempo de desenvolvimento das moscas na sua fase imatura, o qual tem como consequência resultados mais acurados na estimativa do IPM.
6. Com relação à dietas artificiais contendo tecido animal avaliadas para o desenvolvimento pós-embrionário de duas espécies da família Calliphoridae, sugerimos que a dieta D4, acrescida de coração de frango, seja utilizada na manutenção de colônias de dípteros muscóides em laboratório, principalmente califorídeos como *C. albiceps* e *C. megacephala*. Enumeramos como vantagens o uso de um único tipo de dieta para toda manutenção de califorídeos no laboratório e, adicionalmente, por dispensar o uso de cobaias em análises toxicológicas, diminuindo desse modo o custo da pesquisa e priorizando ao máximo a ética experimental. Contudo, ainda estão sendo realizados experimentos com outras espécies de moscas, incluídas aquelas da família Sarcophagidae, com a finalidade de definir uma dieta universal para a criação de dípteros muscóides de importância forense.

BIBLIOGRAFIA GERAL

Alves Jr MJ, Thyssen PJ, Giorgio S, Mello MMF, Linhares AX (2007) Detection of cocaine from *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) maggots rearing in cadaver: report of a forensic entomology case in southeastern Brazil. Congresso ESA - Entomological Society of America - Denver - USA.

Amendt J, Krettek R, Niess C, Zehner R, Bratzke H (2000) Forensic entomology in Germany. Forensic Sci Int 113: 309-314.

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

Ames C, Turner B (2003) Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. Med Vet Entomol 17: 178-186.

Amorim JA, Ribeiro OB (2001) Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 781-784.

Amoundi MA, Diab FM, Abou-Fannah SSM (1994) Development rate and mortality of immature *Parasarcophaga* (Liopygia) *ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) at constant laboratory temperatures. J Med Entomol 31: 168-170.

Anderson GS (1999) Wildlife forensic entomology; determining time of death in two illegally killed black bear cubs. J Forensic Sci 44: 856-859.

Anderson GS (2001) Succession on carrion and its relationship to determining time of death. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC, Boca Raton, FL, pp. 143-175.

Anderson GS, Cervenka VJ (2002) Insects associated with the body: their use and analyses. In: Haglund WD, Sorg MH (eds) Advances in forensic taphonomy: method, theory and archaeological perspectives. CRC, Boca Raton, FL, pp. 173-200.

Anderson GS (2004) Determining time of death using blow fly eggs in the early postmortem interval. Int J Legal Med 118: 240-241.

Anderson GS, Hobischak NR (2004) Decomposition of carrion in the marine environment in British Columbia, Canada. Int J Legal Med 118: 206-209.

Anônimo (1814) Instruction für die oeffentlich angestellten Aerzte und Wundaerzte in den k.k. oesterreichischen Staaten, wie sie sich bei geichtlichen Leichenschauen zu benehmen haben. Schoenfeld, Prague.

Arnaldos I, Romera E, Garcia MD, Luna A (2001) An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the southeastern Iberian peninsula. *Int J Legal Med* 114:156-162.

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

Bergeret M (1855) Infanticide, momification naturelle du cadavre. *Ann Hyg Publique Med Leg* 4: 442-452.

Beyer JC, Enos WF, Stajic M (1980) Drug identification through analysis of maggots. *J Forensic Sci* 25: 411-412.

Bourel B, Hedouin V, Martin-Bouyer L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D (1999) Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci* 44: 354-358.

Bourel B, Fleurisse L, Hedouin V, Cailliez JC, Creusy C, Gosset D, Goff ML (2001a) Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. *J Forensic Sci* 46: 596-599.

Bourel B, Tournel G, Hedouin V, Deveaux M, Goff ML, Gosset D (2001b) Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. *Forensic Sci Int* 120:127-131.

Bourel B, Tournel G, Hedouin V, Goff ML, Gosset D (2001c) Determination of drug levels in two species of necrophagous Coleoptera reared on substrates containing morphine. *J Forensic Sci* 46:600-603.

Bourel B, Tournel G, Hedouin V, Gosset D (2004) Entomofauna of buried bodies in Northern France. *Int J Legal Med* 118: 215-220.

Byrd JH, Castner JL (2001) Insects of forensic importance. *In: Byrd JH, Castner JL. Forensic Entomology - The utility of arthropods in legal investigations.* CRC Press, USA. pp 43-80.

Campobasso CP, Di Vella G, Introna F (2001) Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci Int* 120: 18-27.

Campobasso CP, Introna F (2001) The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. *Forensic Sci Int* 120: 132-139.

Campobasso CP, Gherardi M, Caligara M, Sironi L, Introna F (2004) Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. *Int J Legal Med* 118: 210-214.

Carlson DA, Geden CJ, Bernier UR (1999) Identification of pupal exuviae of *Nasonia vitripennis* and *Muscidifurax raptorellus* parasitoids using cuticular hydrocarbons. Biol Control 15: 97-106.

Carvalho LML (2004) Detecção e efeito de drogas no desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), duas moscas varejeiras de interesse forense. Universidade Estadual de Campinas. Tese de Doutorado. 104p.

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

Carvalho LML, Linhares AX, Trigo JR (2001) Determination of drug levels and effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. Forensic Sci Int 120: 140-144.

Carvalho LML, Thyssen PJ, Linhares AX, Palhares FB (2000) A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 135-138.

Carvalho LML, Thyssen PJ, Goff ML, Linhares AX (2004) Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. Aggrawal's Int J Forensic Med Toxicol 5: 33-39.

Catts EP, Goff ML (1992) Forensic entomology in criminal investigations. Ann Rev Entomol 37: 253-272.

Catts EP, Haskell NH (1990) Entomology and death: a procedural guide. Joyce's Print Shop, Clemson, USA 182p.

Clark MA, Worrell MB, Pless JE (1997) Postmortem changes in soft tissues. In: Haglund WD, Sorg MH (eds) Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains. CRC, Boca Raton, FL, pp. 151-170.

Clery JM (2001) Stability of prostate specific antigen (PSA), and subsequent Y-STR typing, of *Lucilia (Phaenicia) sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) maggots reared from a simulated postmortem sexual assault. Forensic Sci Int 120: 72-76.

Collins CA, Braga GL, Bonato PS (1997). Introdução a métodos cromatográficos. 7ª ed. Editora Unicamp, Campinas, 279p.

D'Almeida JM, Oliveira VC (2002) Dietas artificiais para a criação, em laboratório, de *Chrysomya* (*C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. putoria*) (Diptera: Calliphoridae). Entomol Vect 9: 79-91.

D'Almeida JM, Fraga MB, Ferro CL (2000) Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera:Calliphoridae), em dietas artificiais. Entomol Vect 7: 155-162.

D'Almeida JM, Ferro CL, Fraga MB (2001) Desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria* em dietas artificiais. Acta Biol Leopold 23: 25-30.

Davis JB, Goff ML. (2000) Decomposition patterns in terrestrial and intertidal habitats on Oahu Island and Coconut Island, Hawaii. J Forensic Sci 45: 836-842.

Dear JP (1985) A revision of the New World Chrysomyini (Diptera) (Calliphoridae). USA, Joyce Print Shop, 182p.

EMEA (2001) The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Veterinary Medicines and Information Technology. Thiopental sodium - Summary report, 4p.

Erzinçlioglu YZ (1983) The application of entomology to forensic medicine. Med Sci Law 23: 57-63.

Erzinçlioglu YZ (1989) The value of chorionic structure and size in the diagnosis of blowfly eggs. Med Vet Entomol 3: 281-285.

Erzinçlioglu YZ (1996) Blowflies. Richmond Publishing, Slough, UK, 72p.

Ferreira MJM (1978) Sinantropia de dípteros muscoideos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. Rev Bras Biol 38: 445-54.

Freire O (1914) Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. Gaz Med Bahia 46: 110-125.

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

Geden CJ (1997) Development models for the filth fly parasitoids *Spalangia gemina*, *S. cameroni*, and *Muscidifurax raptor* (Hymenoptera: Pteromalidae) under constant and variable temperatures. Biol Control 9: 185-192.

Geden CJ, Bernier UR, Carlson DA, Sutton BD (1998) Identification of *Muscidifurax* spp., parasitoids of muscoid flies, by composition patterns of cuticular hydrocarbons. Biol Control 12: 200-207.

Godfray HCJ (1994) Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. Princeton Univ. Press, NJ, 520p.

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

Goff ML, Odom CB (1987) Forensic entomology in the Hawaiian Islands: three case studies. Am J Forensic Med Pathol 8:45-50.

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

Goff ML, Brown WA, Hewadikaram KA, Omori AI (1991) Effects of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. J Forensic Sci 36: 537-542.

Goff ML, Brown WA, Omori AI (1992) Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. J Forensic Sci 37: 867-872.

Goff ML, Brown WA, Omori AI, LaPointe DA (1993) Preliminary observations of the effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of postmortem interval. J Forensic Sci 38: 316-22.

Goff ML, Brown WA, Omori AI, LaPointe DA (1994) Preliminary observations of the effect of phencyclidine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae). J Forensic Sci 39: 123-128.

Goff ML, Miller ML, Paulson JD, Lord WD, Richards E, Omori AI (1997) Effects of 3,4-methelenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of drug in postmortem blood, liver, tissue, larvae and pupae. J Forensic Sci 42: 276-280.

Grassberger M, Frank C (2003a) Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. J Med Entomol 41: 511-523.

Grassberger M, Frank C (2003b) Temperature-dependent development of the parasitic wasp *Nasonia vitripennis* and its forensic implications. Med Vet Entomol 17:257-262.

Greenberg B (1971) Flies and disease. Vol 1. Princeton Univ. Press, NJ, 865p.

Greenberg B (1973) Flies and disease. Vol 2. Princeton Univ. Press, NJ, 447p.

Greenberg B (1991) Fly as forensic indicators. J Med Entomol 28: 565-577.

Greenberg B, Kunich JC (2002) Entomology and the law: flies as forensic indicators. Cambridge Univ. Press, 334p.

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

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

Grella MD, Estrada DA, Thyssen PJ (2007) The effect of scopolamine on the development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) and its importance for the postmortem interval estimate. VIII Congresso Latinoamericano de entomologia. Entomología Mexicana 6: 870-873.

Guimarães JH, Prado AP, Linhares AX (1978) Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). Rev Bras Entomol 22: 53-60.

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

Gunatilake K, Goff ML (1989) Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. J Forensic Sci 34: 714-716.

Gupta A, Setia P (2004) Forensic entomology - Past, present and future. Aggrawal Internet J Forensic Med Toxicol 5: 50-53.

Haddad ML, Parra JRP, Moraes RCB (1999) Métodos para estimar os limites térmicos inferior e superior de desenvolvimento de insetos. Fealq, SP, Brasil, 29p.

Hall RD (2001) Perceptions and status of forensic entomology In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC, Boca Raton, FL, pp. 1-15.

Harvey M, Dadour I, Gaudieri S (2003) Mitochondrial DNA cytochrome oxidase I gene: potential for distinction between immature stages of some forensically important fly species (Diptera) in western Australia. Forensic Sci Int 131:134-139.

Haskell NH, McShaffrey DG, Hawley DA, Williams RE, Pless JE (1989) Use of aquatic insects in determining submersion interval. J Forensic Sci 34: 622-632.

Haskell NH, Hall RD, Cervenka VJ, Clark MA (1997) On the body: insect's life stage presence, their postmortem artifacts. In: Haglund WD, Sorg MH (eds) Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains. CRC, Boca Raton, FL, pp. 415-448.

Hédouin V, Bourel B, Martin-Bouyer L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D (1999a) Determination of drug levels in larvae of *Lucilia sericata* reared on rabbit carcasses containing morphine. J For Sci 44: 351-353.

Hédouin V, Bourel B, Martin-Bouyer L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D (1999b) Morphine perfused rabbits: a tool for experiments in forensic entomotoxicology. J Forensic Sci 44:347-350.

HenBge C, Althaus L, Bolt J, Freisleder A, Haffner HT, HenBge CA, Hoppe B, Schneider V (2000) Experiences with a compound method for estimating the time since death. I. Rectal temperature nomogram for time since death. Int J Legal Med 113: 303-319.

Higley LG, Haskell NH (2001) Insect development and forensic entomology. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC, Boca Raton, FL, pp. 287-302.

Hobischak NR, Anderson GS (1999) Freshwater-related death investigations in British Columbia in 1995-1996, a review of coroner's cases. Can Soc Forensic Sci 32: 97-106.

Hobischak NR, Anderson GS (2002) Time of submergence using aquatic invertebrate succession and decomposition changes. J Forensic Sci 47: 142-51.

Holdaway FG, Evans AC (1930) Parasitism a stimulus to pupation: *Alysia manducator* in relation to the host *Lucilia sericata*. Nature 125: 598-599.

Introna F Jr, Lo Dico C, Caplan YH, Smialek JE (1990) Opiate analysis in cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. J Forensic Sci 35: 118-22.

Introna F, Campobasso CP (2000) Forensic dipterology. In: Papp L, Darvas B (eds) Contributions to a manual of palaearctic diptera. 1. General and applied dipterology. Science Herald, Budapest, pp. 793-846.

Introna F, Campobasso CP, Goff ML (2001) Entomotoxicology. Forensic Sci Int 120: 42-47.

Kashyap VK, Pillay VV (1989) Efficacy of entomological method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. Forensic Sci Int 40: 245-250.

Keh B (1985) Scope and applications of forensic entomology. Ann Rev Entomol 30: 137-154.

Keiper JB, Chapman EG, Foote BA (1997) Midge larvae (Diptera: Chironomidae) as indicators of postmortem submersion interval of carcasses in a woodland stream: a preliminary report. J Forensic Sci 42: 1074-1079.

Kintz P, Godelar A, Tracqui A, Mangin P, Lugnier AA, Chaumont AJ (1990a) Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. J Forensic Sci 35: 204-207.

Kintz P, Tracqui A, Ludes B, Waller J, Boukhabza A, Mangin P, Lugnier AA, Chaumont AJ (1990b) Fly larvae and their relevance in forensic entomology. Am J Forensic Med Pathol 11: 63-65.

Kintz P, Tracqui A, Mangin P (1990c) Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. J Forensic Sci Soc 30: 243-246.

Kintz P, Tracqui A, Mangin P (1994) Analysis of opiates in fly larvae sampled on a putrefied cadaver. J Forensic Sci Soc 34: 95-97.

Kitching, R.L. 1976. The immature stages of the Old-World screw-worm fly, *Chrysomya bezziana* Villeneuve, with comparative notes on other Australasian species of *Chrysomya*. Bull Entomol Res 66: 195-203.

Knight B (1991) Forensic pathology. Edward Arnold, London, 636p.

Krahmer FL (1857) Handbuch der gerichtlichen Medizin. Braunschweig, Schwetschke 625p.

Lamb RJ, Gerber GH, Atkinson GF (1984) Comparison of developmental rate curves applied to egg hatching data of *Entomoscelis americana* Brown (Coleoptera: Chrysomelidae). Environ Entomol 13: 868-872.

LaSalle J, Gauld ID (1991) Parasitic Hymenoptera and the biodiversity crisis. Redia 74: 315-334.

Leal TTS, Prado AP, Antunes AJ (1982) Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. Revta Bras Zool 1: 41-44.

Leclercq M, Brahy G (1985) Entomologie et médecine legale: détermination de la mort. J Med Leg 28: 271-278.

Levine B, Golle M, Smialek JE (2000) An unusual drug death involving maggots. Am J Forensic Med Pathol 21: 59-61.

Linhares AX, Thyssen PJ (2007) Miíases de Importância Médica - Moscas e Entomologia Forense. In: De Carli, G. A. (org.) Parasitologia Clínica - Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. 2º ed. Ed. Atheneu, São Paulo, pp. 709-730.

Liu D, Greenberg B (1989) Immature stage of some flies of forensic importance. Ann Entomol Soc Am 82: 80-93.

Lopes HS (1941) Sobre o aparelho genital dos Sarcophagidae (Diptera) e sua importância na classificação. Rev Bras Biol 1: 215-221.

Lord WD (1990) Case histories of the use of insects in investigations. In: Catts EP, Hankell NH (eds) Entomology and death: A procedural guide. Joyce's Print Shop, SC, pp. 9-37.

Lord WD, Stevenson JR (1986) Directory of forensic entomologists. Washington DC, Am. Reg. Prof. Entomol, 42p.

Malgorn Y, Coquoz R (1999) DNA typing for identification of some species of Calliphoridae: an interest in forensic entomology. Forensic Sci Int 102: 111-119.

Manhoff DT, Hood I, Caputo F, Perry J, Rosen S, Mirchandani HC (1991) Cocaine in decomposed human remains. J Forensic Sci 36: 1732-1735.

Mann RW, Bass WM, Meadows L (1990) Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. J Forensic Sci 35: 103-111.

Margaritis LH (1985) Structure and physiology of the eggshell. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds) Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol I. Embryogenesis and reproduction. Pergamon Press, Oxford, pp. 153-230.

Méglin JP (1894) La faune des cadavres: application de l'entomologie a la médecine légale. Encyclopédie scientifique des Aides-mémoires. Masson et Gauthiers-Villars, Paris.

Mende LJK (1829) Ausführliches Handbuch der gerichtlichen Medizin für Gesetzgeber, Rechtsgelehrte, Aerzte und Wundaerzte, Teil 5.

Mendes J, Linhares AX (1993) Atratividade por iscas e estágios de desenvolvimento ovariano em fêmeas de várias espécies sinantrópicas de Calliphoridae (Diptera). Rev Bras Entomol 37: 157-166.

Merrit RW, Wallace JR (2001) The role of aquatic insects in forensic investigations. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC, Boca Raton, FL, pp. 177-222.

Meskin I (1991) The eggs of the highveld blowfly, *Calliphora croceipalpis* Jaennicke Diptera: Calliphoridae), with a key to the eggs of five other highveld species. J Entomol Soc South Afr 54: 185-190.

Miller ML, Lord WD, Goff ML, Donnelly B, MacDonough ET, Alexis JC (1994) Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. J Forensic Sci 39: 1305-1313.

Monteiro-Filho ELA, Penereiro JL (1987) Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do Estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Biol 47: 289-295.

Moore JM, Casale JF (1994) In-depth chromatographic analyses of illicit cocaine and its precursor, coca leaves. J Chromatogr A 674: 165-205.

Moretti TC, Thyssen PJ, Godoy WAC, Solis DR (2008) Necrophagy by the social wasp *Agelaia pallipes* (Hymenoptera: Vespidae: Epiponini): possible forensic implications. Sociobiol 51: 393-398.

Moura MO, Carvalho CJB, Monteiro ELA (1997) A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Parana. Mem Inst Oswaldo Cruz 92: 269-274.

Nolte KB, Pinder RD, Lord WD (1992) Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. J Forensic Sci 37: 1179-1185.

Nuorteva P (1977) Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: Tedeshi CG, Eckert WG, Tedeshi LG (eds) Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards. Vol. II. London, pp. 1072-1095.

Nuorteva P, Nuorteva SL (1982) The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. Ambio 11: 34-37.

Nuorteva P, Schumann H, Isokoski M, Laiho K (1974) Studies on the possibilities of using blowflies (Diptera: Calliphoridae) as medicolegal indicators in Finland. Ann Entomol Fenn 40: 70-74.

O'Brien C, Turner B (2004) Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. Int J Legal Med 118: 188-189.

Oliva A, Ravioli J, Trezza F, Navarri C (1995) Entomologia forense. Prensa Méd Argent 82: 229-234.

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

Parra JR (1990) Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, ESALQ, 125p.

Payne JA, King EW (1972) Insect succession and decomposition of pig carcasses in water. J Ga Entomol Soc 7: 153-162.

Pien K, Laloup M, Piperleers-Marichal M, Grootaert P, De Boeck G, Samyn N, Boonen T, Vits K, Wood M (2004) Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae

and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. Int J Legal Med 118: 190-193.

Pounder DJ (1991) Forensic entomotoxicology. J Forensic Sci 31: 469-472.

Queiroz MMC, Milward-de-Azevedo WMV (1991) Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. Rev Bras Zool 8: 75-84.

Repogle J, Lord WD, Bodowle B, Meinking TL, Taplin D (1994) Identification of host DNA by amplified fragment length polymorphism (AMP-FLP) analysis of human crab louse excreta. J Med Entomol 31: 686-690.

Ribeiro NMD (2003) Comparação entre a decomposição e a sucessão entomológica em carcaças de suínos expostas em área de cerrado e mata ciliar, no Sudeste Brasileiro. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 64p.

SAS Inc (2006) SAS for Microsoft Windows Professional. Versão 9.1. Cary, NC, 1028p.

Sadler DW, Fuke C, Court F, Pounder DJ (1995) Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. Forensic Sci Int 71: 191-197.

Sadler DW, Richardson J, Haigh S, Bruce G, Pounder DJ (1997a) Amitriptyline accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. Am J Forensic Med Pathol 18: 397-403.

Sadler DW, Robertson L, Brown G, Fuke C, Pounder DJ (1997b) Barbiturate and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. J Forensic Sci 42: 481-485.

Sadler DW, Chuter G, Senevernatne C, Pounder DJ (1997c) Commentary on Sadler DW, Robertson L, Brown G, Fuke C, Pounder DJ. Barbiturate and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. J Forensic Sci 42:481-485. J Forensic Sci 42: 1214-1215.

Silveira Neto S, Nakano O, Barbin D, Villa Nova NA (1976) Manual de Ecologia dos Insetos. São Paulo, Ed. Ceres, 419p.

Singh P, Moore RF (1985) Handbook of Insects Rearing. Elsevier Science Publ. Publishers, Amsterdam and New York, 2v, 600p.

Skopp G (2004) Preanalytic aspect in postmortem toxicology. Forensic Sci Int 142: 75-100.

Smith KGV (1986) A manual of forensic entomology. British Museum of Natural History, Cornell Univ Press, London, 205p.

Smith ML (1993) Ethical considerations in the treatment of epilepsy. In Wyllie E (ed) *Epilepsy: Principles and Practice*, Philadelphia, Lea e Febiger.

Sorg MH, Dearborn JH, Monahan EI, Ryan HF, Sweeney KG, David E (1997) Forensic taphonomy in marine contexts. In: Haglund WD, Sorg MH (eds) *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. CRC, Boca Raton, FL, pp. 567-604.

Souza AM, Linhares AX (1997) Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Med Vet Entomol* 11: 8-12.

Souza AM (1998) *Biologia em laboratório dos estágios imaturos de espécies de Calliphoridae e Sarcophagidae (Diptera), de importância medicolegal na região de Campinas, São Paulo*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Tese de Doutorado. 94p.

Sperling FA, Anderson GS, Hickey DA (1994) A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J Forensic Sci* 39: 418-427.

Spradbery JP (1991) *A manual for the diagnosis of screw-worm fly*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO) Division of Entomology, Canberra, Australia, 64p.

Stevens JR, Wall R (2001) Genetic relationships between blowflies (Calliphoridae) of forensic importance. *Forensic Sci Int* 120: 116-23.

Tavares MCH (2003) *Sucessão faunística de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostas em diferentes altitudes e condições pluviométricas na reserva florestal da Serra do Japi, Jundiaí, SP*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Tese de Doutorado. 121p.

Tomberlin JK, Adler PH (1998) Seasonal colonization and decomposition of rat carrion in water and on land in an open field in South Carolina. *J Med Entomol* 35: 704-709.

Tracqui A, Keyser-Tracqui C, Kintz P, Ludes B (2004) Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? *Int J Legal Med* 118: 194-196.

Thyssen PJ (2000) *Decomposição e sucessão entomológica em carcaças de suínos (Sus scrofa L.) de tamanhos diferentes: estudos em ambiente de mata natural na região de Campinas - SP*. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. Dissertação de Mestrado. 85p.

Thyssen PJ, Lessinger AC, Azeredo-Espin AML, Linhares AX (2005) The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. *Neotrop Entomol* 34: 777-78.

Thyssen PJ, Linhares AX (2007) First description of the immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). *Biol Res* 40: *in press*.

Tz'u S, McKnight BE (1981) The washing away of wrongs: forensic medicine in thirteenth-century China. Ann Arbor, University of Michigan Center for Chinese Studies, 181p.

Utsumi K (1958) Studies on arthropods congregation to animal carcasses, with regard to the estimation of portmortem interval. Ochanomizu Med J 7: 203-223.

Vance GM, VanDyk JK, Rowley WA (1995) A device for sampling aquatic insects associated with carrion in water. J Forensic Sci 40: 479-482.

Von Zuben CJ, Bassanezi RC, Reis SF, Godoy WAC, Zuben FJV (1996) Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. J Appl Entomol 120: 379-382.

Wagner TL, Wu HI, Sharpe PJH, Schoolfield RM, Coulson RM (1984) Modeling insect development rates. A literature review and application of a biophysical model. Ann Entomol Soc Am 77: 208-255.

Wall R, Fisher P (2001) Visual and olfactory cue interaction in resource-location by the blowfly, *Lucilia sericata*. Physiol Entomol 26: 212-218.

Wallman JF, Donnellan SC (2001) The utility of mitochondrial DNA sequences for the identification of forensically important blowflies (Diptera: Calliphoridae) in southeastern Australia. Forensic Sci Int 120: 60-67.

Watson EJ, Carlton CE (2003) Spring succession of necrophilous insects on wildlife carcasses in Louisiana. J Med Entomol 40: 338-347.

Wells JD, Sperling FA (2001) DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). Forensic Sci Int 120: 110-115.

Wells JD, Pape T, Sperling FAH (2001a) DNA based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). J Forensic Sci 46: 87-91.

Wells JD, Introna F Jr, Di Vella G, Campobasso CP, Hayes J, Sperling FA (2001b) Human and insect mitochondrial DNA analysis from maggots. J Forensic Sci 46: 685-687.

Williams KR, Pounder DJ (1997) Site-to-site variability of drug concentrations in skeletal muscle. Am J Forensic Med Pathol 18: 246-250.

Wilson Z, Hubbard S, Pounder DJ (1993) Drug analysis in fly larvae. Am J Forensic Med Pathol 14: 118-120.

Wolff M, Builes A, Zapata G, Morales G, Benecke M (2004) Detection of parathion (O,O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphothioate) by HPLC in insects of forensic importance in Medellín, Colombia. Aggrawal Internet J Forensic Med Toxicol 5: 6-11.

Wolff M, Zapata Y, Morales G, Benecke M (2006) Detección y cuantificación de propoxur en la sucesión de insectos de importancia médico-legal. *Revta Colombiana Entomol* 32: 159-164.

Zumt F (1965) *Myiasis in man and animals in the old world*. Butterworths, London, 267p.

ANEXOS

1. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> na no grupo controle.														
	Massa corporal individual (mg)													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,7	0,7	0,5	0,4	0,5	0,6	0,8	0,5	0,8	**	5,5	0,61	0,15	2°
36	2,3	2,1	3,4	2,5	2,0	2,1	1,9	2,9	2,6	2,2	24,0	2,40	0,46	2°
48	7,6	7,0	7,2	7,3	7,5	7,3	6,7	6,8	7,8	7,1	72,3	7,23	0,35	2°
60	18,4	20,0	17,2	22,3	27,8	22,6	18,1	20,0	15,5	23,7	205,6	20,56	3,62	3°
72	45,7	50,2	27,2	34,8	41,9	45,5	40,6	35,2	38,6	40,7	400,4	40,04	6,56	3°
84	62,7	52,2	65,5	64,4	68,0	68,0	50,0	67,1	65,1	65,1	628,1	62,81	6,40	3°
96	65,9	67,4	60,8	68,8	60,5	60,9	73,7	51,3	63,8	64,6	637,7	63,77	6,01	3°
108	55,6	57,5	50,9	65,2	49,8	47,5	57,3	43,6	52,8	52,4	532,6	53,26	6,03	Pré-pupa
120	50,5	37,5	43,0	45,6	57,9	45,9	47,0	45,0	41,5	31,9	445,8	44,58	7,03	Pupa

2. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> na concentração 150 mg/kg de fenobarbital.														
	Massa corporal individual (mg)													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8	0,9	0,7	0,9	0,6	0,7	7,0	0,70	0,12	2°
36	2,5	2,4	1,9	2,6	2,3	2,5	3,0	2,4	1,7	2,4	23,7	2,37	0,36	2°
48	6,8	6,8	6,3	7,3	6,9	6,5	6,8	5,3	6,3	6,8	65,8	6,58	0,54	2°
60	18,8	19,8	14,3	20,8	13,5	21,3	19,3	22,9	15,9	19,5	186,1	18,61	3,08	3°
72	39,9	39,8	19,0	39,5	25,7	42,8	45,6	33,9	45,1	43,4	374,7	37,47	8,79	3°
84	57,6	65,5	59,5	61,4	63,0	56,8	50,6	62,1	52,4	43,5	572,4	57,24	6,70	3°
96	46,8	59,0	54,4	65,6	65,0	57,9	58,0	59,7	55,5	48,1	570,0	57,00	6,18	3°
108	44,6	55,6	55,5	56,8	54,1	49,8	46,7	46,8	51,8	52,2	513,9	51,39	4,27	Pré-pupa
120	49,7	39,7	43,4	43,3	51,4	47,2	42,6	49,2	44,7	43,8	455,0	45,50	3,71	Pupa

3. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos															
de <i>Chrysomya megacephala</i> na concentração 500 mg/kg de fenobarbital.															
	Massa corporal individual (mg)														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO	
24	0,5	0,6	0,8	0,6	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	5,3	0,53	0,12	2°	
36	1,6	1,7	2,1	2,0	1,1	1,7	1,1	1,3	1,2	1,1	14,9	1,49	0,38	2°	
48	5,5	6,8	5,6	4,7	5,3	3,8	3,2	5,8	4,5	5,4	50,6	5,06	1,04	2°	
60	5,2	13,3	9,8	9,9	3,2	11,2	10,6	11,7	10,0	13,0	97,9	9,79	3,22	2°	
72	24,8	19,9	21,1	22,6	26,9	8,7	10,0	12,2	23,1	27,3	196,6	19,66	6,90	3°	
84	44,5	47,8	45,9	22,3	35,5	45,5	47,3	48,0	35,1	39,1	411,0	41,10	8,23	3°	
96	44,6	38,0	44,0	44,8	24,0	40,0	30,0	40,5	26,8	41,9	374,6	37,46	7,70	3°	
108	34,2	39,2	36,2	39,1	39,0	45,5	39,5	34,5	34,5	23,7	365,4	36,54	5,65	Pré-pupa	
120	23,4	20,0	21,1	22,7	27,1	24,9	26,7	22,0	22,6	25,2	235,7	23,57	2,35	Pupa	

4. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos															
de <i>Chrysomya megacephala</i> na concentração 1000 mg/kg de fenobarbital.															
	Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO	
24	0,4	0,2	0,7	0,6	0,6	0,4	0,4	0,7	0,2	0,4	4,6	0,46	0,18	2°	
36	0,9	1,0	1,1	0,8	1,1	0,8	1,1	0,9	1,0	0,8	9,5	0,95	0,13	2°	
48	1,4	3,0	2,4	1,9	1,4	1,2	1,5	0,9	1,2	1,9	16,8	1,68	0,63	2°	
60	2,6	5,3	2,9	3,4	4,7	2,9	4,4	3,5	1,7	3,1	34,5	3,45	1,08	2°	
72	3,2	5,6	2,8	4,9	4,9	4,5	3,6	5,0	3,6	3,0	41,1	4,11	0,98	2°	
84	9,5	7,0	5,0	8,5	8,4	7,5	6,7	4,4	6,0	6,1	69,1	6,91	1,61	2°	
96	7,7	6,9	14,6	12,8	6,8	9,8	5,2	12,8	12,8	5,9	95,3	9,53	3,46	2°	
108	15,8	18,7	18,9	23,5	14,7	19,9	10,1	17,5	7,9	5,0	152,0	15,20	5,83	3°	
120	26,3	12,7	33,8	17,2	16,9	20,7	17,2	18,6	21,3	13,2	197,9	19,79	6,31	3°	
132	34,4	30,3	37,8	19,7	30,4	34,4	47,9	45,5	38,0	26,1	344,5	34,45	8,48	3°	
144	43,2	46,3	31,9	52,0	49,7	39,9	50,0	39,5	29,4	51,7	433,6	43,36	8,10	3°	
156	42,4	35,8	44,2	30,3	39,4	37,2	35,5	46,3	24,5	40,2	375,8	37,58	6,54	Pré-pupa	
168	43,6	40,3	17,0	36,4	31,8	33,4	28,9	32,6	37,0	40,2	341,2	34,12	7,51	Pré-pupa	
180	26,6	33,8	33,5	38,1	35,3	27,6	26,6	31,8	36,0	25,2	314,5	31,45	4,60	Pupa	

5. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> no grupo controle, sem adição de fenobarbital														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,6	1,1	0,9	1,0	0,7	0,6	0,8	0,8	0,8	1,0	8,3	0,83	0,17	2º
36	4,6	4,0	4,9	5,1	4,1	3,3	3,8	4,3	5,0	4,9	44,0	4,40	0,60	2º
48	14,1	7,5	10,0	9,3	8,9	9,0	10,6	8,7	7,3	8,1	93,5	9,35	1,96	2º
60	20,9	29,1	28,5	30,8	24,1	22,7	27,2	28,0	19,5	27,3	258,1	25,81	3,78	3º
72	31,1	41,5	40,7	50,1	38,7	44,8	27,8	35,2	35,7	35,9	381,5	38,15	6,51	3º
84	52,6	54,4	49,2	45,2	56,2	52,3	61,3	39,9	49,7	45,4	506,2	50,62	6,15	3º
96	47,0	48,9	50,1	51,2	56,4	40,5	48,9	55,6	44,8	52,2	495,6	49,56	4,78	Pré-pupa
108	44,2	47,5	53,2	52,3	34,4	50,8	44,7	47,2	43,2	52,5	470,0	47,00	5,75	Pré-pupa
120	44,5	39,4	46,2	39,4	48,1	39,4	45,4	38,8	29,9	41,3	412,4	41,24	5,21	Pupa

6. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> que se desenvolveram na concentração 150 mg/kg de fenobarbital.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,4	0,9	0,7	0,7	0,8	0,6	0,7	0,6	0,7	0,7	6,8	0,68	0,13	2º
36	2,5	1,7	2,6	1,9	3,1	2,2	2,9	2,4	3,6	2,0	24,9	2,49	0,59	2º
48	4,4	5,3	5,6	7,1	7,7	4,9	4,9	5,1	5,8	4,7	55,5	5,55	1,07	2º
60	13,9	13,5	15,2	12,9	14,9	12,7	16,8	11,2	11,0	9,6	131,7	13,17	2,17	3º
72	13,8	22,1	24,5	21,0	19,4	21,3	24,4	19,3	21,4	25,9	213,1	21,31	3,43	3º
84	34,9	36,3	41,4	29,1	43,5	34,8	33,9	45,8	45,5	48,0	393,2	39,32	6,33	3º
96	50,0	37,1	43,8	48,3	47,8	40,0	43,3	34,4	43,8	45,4	433,9	43,39	4,98	3º
108	44,0	42,1	36,4	44,5	51,2	29,2	31,5	54,0	16,1	20,6	369,6	36,96	12,56	3º
120	43,8	47,9	46,8	48,0	47,0	39,4	46,9	48,3	41,4	40,3	449,8	44,98	3,45	3º
132	44,1	38,9	33,4	48,2	20,3	22,0	43,8	38,4	32,1	44,0	365,2	36,52	9,52	Pré-pupa
144	36,9	40,9	32,8	41,8	40,1	43,0	33,3	33,1	31,2	39,1	372,2	37,22	4,32	Pupa

7. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> que se desenvolveram na concentração 500 mg/kg de fenobarbital.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,4	0,9	0,5	0,7	0,6	0,5	0,8	0,8	0,4	0,5	6,1	0,61	0,18	2º
36	0,9	1,0	0,8	1,0	1,0	1,2	0,9	0,8	0,9	1,1	9,6	0,96	0,13	2º
48	4,1	3,8	3,9	2,2	2,9	3,1	2,7	2,8	3,0	2,1	30,6	3,06	0,69	2º
60	5,0	3,7	4,5	5,0	5,7	5,6	4,9	4,6	4,9	5,9	49,8	4,98	0,65	2º
72	9,2	7,5	8,8	6,5	9,6	5,9	7,3	6,8	8,0	6,0	75,6	7,56	1,31	3º
84	12,2	10,4	19,6	12,0	11,5	13,3	13,9	14,2	15,0	15,2	137,3	13,73	2,58	3º
96	21,3	14,9	18,2	9,7	12,4	10,6	15,1	14,8	17,7	15,5	150,2	15,02	3,52	3º
108	8,3	34,0	20,6	9,2	5,3	15,1	16,3	17,5	12,3	6,0	144,6	14,46	8,55	3º
120	42,4	40,8	37,5	33,9	32,0	39,2	39,5	35,4	32,7	36,2	369,6	36,96	3,52	3º
132	31,7	21,9	21,0	13,6	24,6	22,3	22,0	28,9	18,5	26,7	231,2	23,12	5,18	3º
144	38,1	28,7	36,4	33,0	32,4	46,4	49,5	34,6	40,0	33,3	372,4	37,24	6,50	3º
156	40,6	44,6	38,8	35,0	38,3	28,5	30,2	38,0	29,9	37,4	361,3	36,13	5,19	3º
168	29,3	25,7	26,5	31,6	28,7	34,1	38,3	31,1	27,7	22,9	295,9	29,59	4,43	Pré-pupa
180	27,2	25,6	28,8	26,3	20,3	17,1	21,9	19,3	24,9	21,3	232,7	23,27	3,83	Pré-pupa
192	21,7	30,4	20,0	21,9	26,9						120,9	24,18	4,33	Pupa

8. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> que se desenvolveram concentração 1000 mg/kg de fenobarbital.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,3	0,5	0,7	0,4	0,5	0,4	0,6	0,3	0,4	**	4,1	0,46	0,13	2º
36	0,4	0,8	1,0	0,6	0,5	1,1	0,7	0,3	0,4	0,4	6,2	0,62	0,27	2º
48	0,9	0,7	0,8	0,7	1,0	1,2	1,2	1,0	1,0	1,6	10,1	1,01	0,27	2º
60	1,3	1,4	1,0	1,5	3,1	2,0	1,4	1,9	1,0	1,8	16,4	1,64	0,62	2º
72	2,1	2,6	1,8	1,5	1,3	1,4	1,9	1,3	1,7	1,6	17,2	1,72	0,40	2º
84	6,0	3,9	3,2	4,5	3,8	3,2	3,3	3,5	3,6	2,9	37,9	3,79	0,90	2º
96	3,3	2,3	2,4	3,4	2,3	3,3	3,9	4,7	2,0	2,1	29,7	2,97	0,89	2º
108	2,9	3,8	5,0	4,0	3,6	3,9	5,8	3,6	2,2	3,3	38,1	3,81	1,01	2º
120	2,5	1,3	2,1	1,6	3,2	1,6	2,5	3,7	2,8	1,3	22,6	2,26	0,82	2º
132	1,6	1,0	0,8	1,3	2,0	0,5	1,0	1,2	1,0	0,8	11,2	1,12	0,43	2º

9. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> no grupo controle, sem adição de fenobarbital.															
	Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO	
36	0,8	1,0	1,2	0,7	0,7	0,8	0,5	0,7	1,0	0,9	8,3	0,83	0,20	2°	
48	2,7	2,6	1,5	3,3	2,2	1,8	2,3	2,3	1,7	1,9	22,3	2,23	0,54	2°	
60	4,7	5,1	4,2	4,4	4,7	4,8	5,4	4,4	3,7	3,7	45,1	4,51	0,55	2°	
72	9,1	5,5	14,0	9,4	6,9	7,5	10,9	6,1	6,2	6,3	81,9	8,19	2,68	3°	
84	15,6	22,0	9,8	19,6	10,1	10,6	11,9	12,6	14,8	10,5	137,5	13,75	4,23	3°	
96	46,9	28,5	33,1	33,3	30,6	29,4	29,1	30,3	29,5	29,4	320,1	32,01	5,48	3°	
108	37,2	52,7	59,4	25,3	48,2	56,9	57,4	66,7	63,5	52,7	520,0	52,00	12,49	3°	
120	59,1	46,1	55,1	59,6	56,0	62,7	42,3	57,7	50,1	48,3	537,0	53,70	6,65	3°	
132	59,7	51,2	53,4	54,4	32,7	35,9	43,9	51,4	53,1	49,3	485,0	48,50	8,51	3°	
144	48,2	40,2	42,3	54,5	31,0	50,8	43,2	39,8	48,5	40,3	438,8	43,88	6,77	Pré-pupa	
156	31,0	40,4	41,3	41,9	35,8	42,5	42,9	52,5	49,7	32,4	410,4	41,04	6,80	Pupa	

10. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> concentração 150 mg/kg de fenobarbital.															
	Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO	
36	1,4	0,9	0,8	1,1	0,8	0,7	1,3	1,0	1,1	0,9	10,0	1,00	0,23	2°	
48	2,0	2,8	3,5	2,3	2,0	3,7	3,1	2,8	2,7	3,1	28,0	2,80	0,58	2°	
60	4,5	5,7	5,1	4,8	5,7	5,2	4,4	6,1	6,2	6,9	54,6	5,46	0,80	2°	
72	16,2	11,5	12,8	12,2	6,6	12,4	10,3	6,0	8,6	10,6	107,2	10,72	3,05	3°	
84	25,8	13,5	15,5	23,6	22,0	20,0	17,2	16,1	15,6	20,5	189,8	18,98	4,02	3°	
96	31,5	33,0	21,7	25,3	27,1	23,3	21,4	23,8	27,1	23,3	257,5	25,75	3,95	3°	
108	40,8	45,3	43,7	23,5	38,8	29,8	23,4	37,9	31,8	37,1	352,1	35,21	7,79	3°	
120	45,4	42,9	36,5	37,2	42,9	34,3	33,2	29,9	29,1	28,9	360,3	36,03	6,07	3°	
132	31,3	20,1	20,7	24,5	20,0	19,8	23,9	20,3	23,1	22,9	226,6	22,66	3,51	Pré-pupa	
144	23,4	36,4	33,5	26,1	33,7	20,1	25,0	16,7	23,8	14,6	253,3	25,33	7,33	Pupa	

11. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> concentração 500 mg/kg de fenobarbital.															
Massa corporal individual															
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO	
48	1,0	0,8	0,7	0,9	1,2	1,0	0,9	1,2	0,9	0,8	9,4	0,94	0,16	2°	
60	1,8	1,7	1,3	1,9	1,6	2,3	1,5	1,9	1,1	1,9	17,0	1,70	0,34	2°	
72	1,4	1,9	2,4	1,2	2,9	1,5	2,5	1,6	2,7	2,2	20,3	2,03	0,59	2°	
84	2,6	1,8	2,6	2,9	2,8	4,3	4,1	2,6	2,3	3,0	29,0	2,90	0,76	2°	
96	4,4	5,1	3,7	3,6	3,7	4,6	3,9	2,6	3,4	3,3	38,3	3,83	0,71	3°	
108	4,4	2,6	4,1	3,3	2,9	3,2	2,4	2,6	1,4	2,6	29,5	2,95	0,86	3°	
120	4,7	5,2	3,7	3,2	2,8	3,5	3,0	4,8	5,7	6,3	42,9	4,29	1,22	3°	
132	23,0	32,7	19,3	18,2	23,1	18,2	13,1	15,8	15,2	10,3	188,9	18,89	6,30	3°	
144	15,5	7,5	17,7	9,7	14,1	12,2	12,3	10,7	9,6		109,3	12,14	3,20	3°	
156	6,2	7,1	16,8	7,4	5,0	8,7	4,3	**	**	**	55,5	7,93	4,18	3°	

12. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> concentração 1000 mg/kg de fenobarbital.															
Massa corporal individual															
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO	
60	0,4	0,7	0,4	0,4	0,6	0,3	0,2	0,7	0,4	0,4	4,5	0,45	0,16	2°	
72	1,2	0,9	0,5	0,5	0,4	0,4	0,2	0,6	0,5	0,2	5,4	0,54	0,31	2°	
84	1,1	1,2	1,0	0,7	0,6	1,3	1,2	0,6	1,3	0,6	9,6	0,96	0,30	2°	
96	0,8	1,1	0,9	0,9	0,6	**	**	**	**	**	4,3	0,86	0,18	2°	

13. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> que se desenvolveram no grupo controle, sem adição de tiopental.															
Massa corporal individual															
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO	
12											1,6*	0,16	0,00	2°	
24	0,3	0,4	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4	0,6	0,4	0,5	4,1	0,41	0,10	2°	
36	1,8	1,4	1,4	1,6	1,2	1,2	1,4	1,2	1,2	1,2	13,6	1,36	0,21	2°	
48	5,4	4,8	4,8	4,3	4,3	4,3	4,2	4,1	4,4	4,6	45,2	4,52	0,39	2°	
60	5,4	8,5	9,0	14,1	8,9	8,1	6,7	9,8	6,5	10,8	87,8	8,78	2,47	3°	
72	15,2	12,3	15,9	16,2	17,9	15,7	14,6	14,1	16,5	15,5	153,9	15,39	1,51	3°	
84	29,2	26,6	27,8	28,4	30,1	33,4	24,1	32,9	29,0	27,0	288,5	28,85	2,81	3°	
96	34,4	27,8	34,8	30,5	29,9	41,8	33,3	34,4	23,5	24,3	314,7	31,47	5,48	3°	
108	45,8	40,2	45,1	38,3	42,5	47,6	39,9	37,8	46,9	38,6	422,7	42,27	3,79	3°	
120	27,9	27,7	35,7	36,8	23,9	36,2	31,9	31,9	3,8	23,0	278,8	27,88	9,78	Pré-pupa	
132	34,1	44,1	31,9	29,8	45,4	45,2	22,5	48,5	38,3	27,7	367,5	36,75	8,85	Pré-pupa	
144	41,2	45,8	35,5	39,4	40,7	42,9	56,1	37,5	42,3	38,4	419,8	41,98	5,76	Pupa	

14. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos														
de <i>Chrysomya putoria</i> que se desenvolveram na concentração 0,5 DL 50 de tiopental.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
36	1,1	1,4	2,4	1,1	1,6	1,5	1,1	1,1	1,7	1,1	14,1	1,41	0,42	2º
48	3,5	3,4	3,2	3,2	3,6	5,0	4,5	3,2	3,7	4,4	37,7	3,77	0,64	2º
60	5,4	7,4	8,4	8,1	4,9	8,4	7,5	6,3	11,0	5,2	72,6	7,26	1,87	3º
72	13,9	10,5	11,6	11,3	7,4	10,0	8,5	8,1	7,2	9,0	97,5	9,75	2,12	3º
84	21,1	22,9	31,5	19,0	23,3	16,7	17,1	13,6	22,4	17,1	204,7	20,47	5,01	3º
96	42,5	44,4	30,4	33,2	45,6	44,9	41,3	43,7	32,0	25,3	383,3	38,33	7,36	3º
108	40,3	48,5	43,6	44,7	51,6	44,2	44,3	43,2	43,1	45,4	448,9	44,89	3,13	3º
120	34,7	28,5	31,4	33,8	32,3	37,2	32,7	34,9	36,0	34,7	336,2	33,62	2,50	Pré-pupa
132	42,5	45,0	42,1	45,1	42,4	42,0	47,2	43,5	48,9	45,6	444,3	44,43	2,35	Pré-pupa
144	39,7	42,4	37,1	44,2	41,9	44,9	35,1	39,5	39,6	42,2	406,6	40,66	3,06	Pupa

15. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos														
de <i>Chrysomya putoria</i> que se desenvolveram na concentração DL 50 de tiopental.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,7	0,6	0,7	0,6	1,0	0,8	0,6	0,7	0,7	0,6	7,0	0,70	0,12	2º
36	1,8	1,6	1,5	1,2	1,2	1,1	1,5	1,2	1,2	1,3	13,6	1,36	0,23	2º
48	4,1	4,0	4,3	3,8	4,5	4,6	4,6	3,7	3,7	4,9	42,2	4,22	0,42	2º
60	5,5	4,6	6,4	5,3	5,3	5,8	5,4	4,6	4,2	4,8	51,9	5,19	0,65	3º
72	18,5	16,1	17,4	17,0	14,2	18,7	16,2	16,9	16,9	14,2	166,1	16,61	1,52	3º
84	27,1	29,1	22,0	22,0	26,0	23,4	24,2	26,1	24,1	31,1	255,1	25,51	2,98	3º
96	33,8	24,4	25,7	30,1	26,3	32,8	24,4	28,2	31,3	27,8	284,8	28,48	3,40	3º
108	38,9	36,0	48,3	42,2	37,3	32,9	39,4	37,1	38,3	41,9	392,3	39,23	4,19	3º
120	38,8	40,6	38,4	51,1	39,3	45,0	38,0	50,1	38,7	47,5	427,5	42,75	5,18	3º
132	43,8	44,0	40,8	48,7	36,2	32,9	41,8	32,5	30,0	49,0	399,7	39,97	6,77	3º
144	36,3	49,1	44,9	41,1	34,8	34,2	47,6	40,3	48,9	37,3	414,5	41,45	5,83	3º
156	31,3	38,0	45,3	41,9	37,0	44,1	47,2	42,8	40,1	38,3	406,0	40,60	4,67	3º
168	38,4	35,9	39,8	41,0	43,5	30,1	37,6	35,0	36,9	34,2	372,4	37,24	3,78	Pré-pupa
180	35,3	37,4	33,7	38,5	33,3	36,3	37,6	33,5	33,7	35,0	354,3	35,43	1,92	Pré-pupa
192	26,5	26,5	24,8	23,2	26,1	20,7	23,6	22,6	31,5	22,8	248,3	24,83	3,02	Pupa

16. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> que se desenvolveram na concentração 2x DL 50 de tiopental.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
48	3,2	1,5	1,4	1,9	2,2	2,6	2,4	1,6	2,0	2,1	20,9	2,09	0,55	2º
60	5,1	3,5	5,4	5,2	4,7	4,1	3,7	4,0	3,8	3,8	43,3	4,33	0,70	2º
72	8,7	5,2	5,6	4,4	5,9	4,7	8,4	6,3	4,7	4,5	58,4	5,84	1,56	3º
84	12,0	7,8	9,4	8,0	10,9	11,0	10,0	6,8	6,8	8,3	91,0	9,10	1,83	3º
96	17,6	16,2	14,5	9,3	9,0	9,4	6,2	5,1	6,6	9,6	103,5	10,35	4,31	3º
108	23,1	21,4	16,5	20,4	22,0	27,8	9,4	11,5	10,6	10,5	173,2	17,32	6,50	3º
120	32,5	27,4	26,4	23,7	16,1	15,2	15,8	25,5	15,2	13,9	211,7	21,17	6,65	3º
132	32,2	19,0	22,9	29,1	20,3	20,4	16,8	22,6	17,2	35,5	236,0	23,60	6,47	3º
144	19,0	24,0	32,7	23,6	21,5	20,5	21,7	22,4	16,5	15,2	217,1	21,71	4,81	3º
156	27,3	39,0	29,4	35,5	26,6	27,3	25,8	25,7	25,0	26,0	287,6	28,76	4,71	3º
168	18,5	25,1	23,6	34,0	21,4	31,8	24,8	35,7	26,3	18,7	259,9	25,99	6,06	Pré-pupa
180	18,9	28,5	24,7	21,1	23,2	17,4	21,4	23,7	33,6	23,9	236,4	23,64	4,68	Pré-pupa
192	11,2	14,5	14,2	21,3	10,5	**	**	**	**	**	71,7	14,34	4,27	Pupa

17. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> no grupo controle, sem adição de tiopental.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
36	2,0	2,1	1,4	1,7	1,8	2,1	1,6	1,7	2,2	1,4	18,0	1,80	0,29	2º
48	5,2	4,6	5,4	5,4	5,2	4,4	4,5	4,6	5,2	5,1	49,6	4,96	0,39	2º
60	7,7	12,6	10,3	14,3	13,9	11,4	12,6	10,6	11,4	10,6	115,4	11,54	1,93	3º
72	14,6	17,7	21,7	21,1	19,4	15,1	16,4	15,7	17,2	16,5	175,4	17,54	2,45	3º
84	28,2	33,1	31,0	29,6	32,5	31,1	33,4	30,2	32,6	27,3	309,0	30,90	2,08	3º
96	40,6	48,2	48,1	36,3	47,4	43,1	39,1	41,1	43,1	40,9	427,9	42,79	4,03	3º
108	39,8	4,2	48,3	42,7	44,5	46,6	35,0	37,7	42,7	42,9	384,4	38,44	12,66	3º
120	33,5	35,5	34,4	43,7	37,4	34,9	40,4	35,4	53,5	32,2	380,9	38,09	6,40	3º
132	62,2	68,9	77,4	82,0	61,7	52,6	44,4	56,0	62,8	69,9	637,9	63,79	11,30	Pré-pupa
144	71,0	61,7	51,5	48,3	52,8	55,1	53,8	48,4	40,0	44,9	527,5	52,75	8,72	Pupa

18. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> que se desenvolveram concentração 0,5 DL 50 de tiopental.														
Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
36	1,3	1,8	1,0	1,0	1,0	2,0	1,3	1,8	1,1	1,2	13,5	1,35	0,38	2º
48	4,0	4,5	4,7	3,6	3,0	3,7	3,0	4,4	4,0	4,2	39,1	3,91	0,59	2º
60	8,9	6,0	7,7	8,2	7,6	8,0	8,0	7,7	7,2	6,4	75,7	7,57	0,85	3º
72	15,7	15,6	14,9	16,5	17,1	16,4	14,3	15,3	15,9	13,8	155,5	15,55	1,02	3º
84	25,8	26,6	30,0	22,7	28,5	28,6	24,3	25,7	26,8	25,7	264,7	26,47	2,16	3º
96	30,6	28,9	36,1	36,9	44,0	31,2	35,1	29,1	25,2	33,7	330,8	33,08	5,30	3º
108	43,1	47,1	41,3	40,4	40,9	37,3	51,8	40,2	42,6	38,2	422,9	42,29	4,31	3º
120	45,5	44,3	41,4	46,7	47,7	49,4	50,5	58,4	50,9	42,6	477,4	47,74	4,93	3º
132	63,0	68,3	76,3	58,3	65,1	57,0	44,1	51,8	45,8	47,4	577,1	57,71	10,59	Pré-pupa
144	69,7	55,0	65,8	44,9	44,6	75,0	57,9	47,3	66,5	48,1	574,8	57,48	11,20	Pupa

19. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> que se desenvolveram concentração DL 50 de tiopental.														
Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
48	2,4	1,8	1,8	1,9	2,0	2,3	2,6	1,6	2,1	1,7	20,2	2,02	0,33	2º
60	5,2	4,4	3,5	3,9	4,3	3,6	3,8	6,9	3,7	3,8	43,1	4,31	1,04	2º
72	7,5	7,7	10,0	6,7	8,6	4,9	5,4	5,9	6,2	5,8	68,7	6,87	1,58	3º
84	12,0	18,8	12,4	14,4	21,1	15,3	11,6	13,2	14,4	12,7	145,9	14,59	3,10	3º
96	12,6	17,9	16,6	16,8	22,0	18,1	14,5	23,2	20,6	22,7	185,0	18,50	3,56	3º
108	22,5	25,6	23,0	13,3	30,4	27,7	26,4	24,0	24,5	26,9	244,3	24,43	4,56	3º
120	31,5	28,7	28,6	29,2	35,0	29,1	28,2	25,5	31,1	23,0	289,9	28,99	3,26	3º
132	32,1	30,1	34,1	35,3	29,0	34,6	29,5	30,5	25,7	22,3	303,2	30,32	4,07	3º
144	48,9	37,0	36,5	35,3	42,7	39,5	36,9	32,5	29,4	38,8	377,5	37,75	5,37	3º
156	33,8	35,7	42,2	30,9	30,0	33,7	35,4	40,7	33,3	42,6	358,3	35,83	4,52	Pré-pupa
168	24,6	27,7	24,4	26,7	24,4	21,6	25,1	24,1	26,0	27,1	251,7	25,17	1,78	Pré-pupa
180	22,0	28,5	28,8	35,4	19,6	20,2	16,5	21,5	20,7	15,8	229,0	22,90	6,14	Pupa

20. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> que se desenvolveram concentração 2x DL 50 de tiopental.														
Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
48	2,0	1,7	1,2	1,3	2,2	1,4	1,3	1,3	1,2	2,0	15,6	1,56	0,38	2°
60	2,6	2,6	3,0	1,5	2,1	2,7	1,6	2,8	2,7	1,2	22,8	2,28	0,63	2°
72	4,6	3,9	2,7	3,0	3,2	4,7	2,6	4,2	3,7	3,8	36,4	3,64	0,75	2°
84	3,5	3,6	6,9	2,9	2,9	3,1	4,3	3,3	4,4	3,9	38,8	3,88	1,19	3°
96	3,1	4,1	4,3	2,6	3,2	2,4	2,7	2,2	3,0	2,8	30,4	3,04	0,69	3°
108	3,0	3,8	4,5	3,3	3,5	3,1	2,8	2,2	2,5	3,1	31,8	3,18	0,65	3°
120	4,6	3,1	2,9	4,5	**	**	**	**	**	**	15,1	3,78	0,90	3°
132	19,2	13,7	20,9	20,5	15,6	16,1	15,2	10,6	7,8	4,3	143,9	14,39	5,46	3°
144	19,3	13,7	20,9	20,5	25,6	16,1	15,2	10,6	7,8	4,3	154,0	15,40	6,52	3°

21. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> que se desenvolveram no grupo controle, sem adição de tiopental.														
Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	1,0	0,9	0,8	1,0	0,9	1,3	1,1	0,9	0,8	0,9	9,6	0,96	0,15	2°
36	3,4	5,7	4,3	5,1	4,7	5,4	3,2	3,6	4,0	4,2	43,6	4,36	0,85	2°
48	8,4	9,0	8,8	7,6	8,8	7,7	7,4	8,6	8,7	8,9	83,9	8,39	0,60	2°
60	12,9	16,8	22,2	24,8	17,8	22,1	16,8	21,2	21,4	23,7	199,7	19,97	3,73	3°
72	26,6	25,0	28,9	33,3	39,2	37,8	31,6	40,5	30,2	32,5	325,6	32,56	5,25	3°
84	46,6	58,8	44,9	57,6	60,4	60,0	63,3	42,8	56,9	56,1	547,4	54,74	7,22	3°
96	49,0	50,3	50,4	50,7	46,7	48,5	46,2	49,4	53,5	45,3	490,0	49,00	2,45	pré-pupa
108	51,7	50,8	48,0	50,6	42,1	46,9	47,8	55,6	59,1	41,5	494,1	49,41	5,45	pré-pupa
120	39,2	45,8	41,3	36,8	41,8	35,7	48,5	35,2	42,3	48,1	414,7	41,47	4,86	pupa

22. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya megacephala</i> que se desenvolveram na concentração 0,5 DL 50 de tiopental.														
Massa corporal individual														
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,7	0,6	0,6	0,9	0,8	0,6	0,7	0,8	0,9	**	6,6	0,73	0,12	2°
36	2,9	2,1	2,5	2,4	2,3	2,3	2,1	2,2	2,4	2,6	23,8	2,38	0,24	2°
48	5,3	4,3	5,7	5,2	4,0	5,4	4,3	5,1	4,3	4,2	47,8	4,78	0,62	2°
60	9,6	8,3	9,8	11,9	8,0	11,3	10,4	9,8	9,9	8,1	97,1	9,71	1,31	3°
72	14,7	16,2	17,8	15,1	9,8	10,4	21,9	9,0	9,0	19,6	143,5	14,35	4,64	3°
84	28,0	40,4	36,4	31,5	41,8	35,2	33,4	30,9	43,2	31,8	352,6	35,26	5,11	3°
96	45,6	44,3	55,6	36,2	44,7	48,0	40,6	38,9	34,8	35,4	424,1	42,41	6,54	3°
108	41,9	63,1	62,5	59,1	57,9	59,0	50,9	66,2	57,3	48,1	566,0	56,60	7,49	3°
120	41,3	38,7	31,5	35,9	49,9	46,1	51,2	48,3	48,0	35,7	426,6	42,66	6,94	pré-pupa
132	38,3	33,4	39,8	36,5	44,0	44,7	35,6	37,4	48,4	40,8	398,9	39,89	4,64	pupa

23. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos														
de <i>Chrysomya megacephala</i> que se desenvolveram na concentração DL 50 de tiopental.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,6	1,0	0,6	1,2	0,6	0,7	1,0	0,8	0,8	0,9	8,2	0,82	0,20	2°
36	2,4	3,2	2,0	2,4	2,3	2,7	2,6	3,1	2,0	2,3	25,0	2,50	0,41	2°
48	5,3	4,5	3,9	3,8	5,2	3,7	3,5	6,3	3,6	5,1	44,9	4,49	0,94	2°
60	6,6	6,8	6,7	7,4	9,4	8,5	8,5	6,8	8,3	8,1	77,1	7,71	0,98	2°
72	4,4	5,0	5,5	4,6	5,2	7,1	5,3	7,4	4,3	5,0	53,8	5,38	1,06	2°
84	23,3	43,5	30,3	29,9	30,8	26,3	28,5	29,2	38,1	26,8	306,7	30,67	5,92	3°
96	34,6	35,4	32,8	30,9	30,9	32,5	34,1	30,3	31,7	28,2	321,4	32,14	2,19	3°

24. Massa corporal (mg) e tempo de desenvolvimento (h) de imaturos														
de <i>Chrysomya megacephala</i> que se desenvolveram na concentração 2x DL 50 de tiopental.														
	Massa corporal individual													
Tempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL	Média	DP	ESTÁDIO
24	0,6	0,7	0,7	0,6	0,8	0,5	0,7	0,8	0,6	0,5	6,5	0,65	0,11	2°
36	2,2	2,3	1,4	1,8	1,7	2,0	2,2	1,5	1,6	1,8	18,5	1,85	0,31	2°
48	4,8	3,4	3,3	4,5	2,7	2,6	3,7	3,9	3,4	5,7	38,0	3,80	0,96	2°
60	6,1	6,7	5,9	6,5	6,0	6,1	5,3	7,1	6,6	5,9	62,2	6,22	0,51	2°
72	7,3	6,3	8,3	7,2	8,4	6,5	9,7	8,2	5,0	4,6	71,5	7,15	1,59	3°
84	16,3	7,2	17,8	17,8	10,9	11,6	9,2	8,7	9,8	**	109,3	12,14	4,09	3°
96	10,0	11,4	12,9	10,8	10,6	19,1	18,2	18,7	15,9	17,2	144,8	14,48	3,70	3°