

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**ABUNDÂNCIA, DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE INSETOS DE INTERESSE FORENSE DA REGIÃO DE PORTO
ALEGRE, RS, BRASIL**

Ana Carolina Reimann Ries

TESE DE DOUTORADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429

Fone: (051) 3320-3500

CEP 90619-900 Porto Alegre - RS

Brasil

2017

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**ABUNDÂNCIA, DIVERSIDADE E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
INSETOS DE INTERESSE FORENSE DA REGIÃO DE PORTO ALEGRE, RS,
BRASIL**

Ana Carolina Reimann Ries

Orientadora: Dra. Betina Blochtein

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE - RS - BRASIL

2017

SUMÁRIO

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
Apresentação	ix
Capítulo I – Abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados a carcaças de suínos expostas na região Sul do Brasil.....	18
Capítulo II – Coleópteros (Arthropoda: Insecta) associados a carcaças em decomposição no Sul do Brasil: a influência de fatores bióticos e abióticos sobre a abundância e diversidade de espécies	42
Capítulo III – O uso do DNA barcode como alternativa para identificação de espécies de sarcófagídeos de interesse forense do Sul do Brasil	71
Apêndices	88
Apêndice I – Localização geográfica do local de amostragem, no bairro Lami, extremo sul do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil	89
Apêndice II – Pontos de localização das carcaças suínas expostas no campo	90
Apêndice III – Fatores meteorológicos registrados pela estação do INMET em Porto Alegre na estação quente e seca (janeiro de 2014)	91
Apêndice IV - Fatores meteorológicos registrados pela estação do INMET em Porto Alegre na estação fria e úmida (setembro de 2014)	92
Apêndice V – Dados publicados pela revista britânica The Economist. Porto Alegre figura entre as 50 cidades com maior número de homicídios do mundo em 2016, segundo pesquisa do Instituto Igarapé	93
Considerações Finais	94

À minha dinda, Paula Anelise da Silva Ries
(*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Às mulheres fortes da ciência, principalmente à Betina Blochtein que aceitou o desafio de orientar fora da sua área e vem me acompanhando, e apostando em mim desde o Mestrado. Obrigada pela confiança, pela orientação minuciosa, pelos puxões de orelha e pelas longas conversas. Sem a tua aposta esse sonho não seria possível. E à Patricia Thyssen que também aceitou me acompanhar neste processo e que me ensinou tudo (ou quase tudo) do que sei sobre a EF. Obrigada por estar sempre disponível, pelo teu jeito e tua calma, pelo carinho com que trata individualmente cada um dos teus muitos alunos. Sou tua fã e serei eternamente grata por ter partilhado teu conhecimento comigo.

Aos Profs. Dr(s). Carlos Graeff-Teixeira, Laura Utz e Claudio José Von Zuben pelas discussões e contribuições no Comitê de Acompanhamento e exame de qualificação. Ao Prof. Dr. Cláudio José Barros de Carvalho, por me receber no seu laboratório e pelos ensinamentos sobre muscídeos e fanídeos.

À minha pequena família, não somente a de sangue, mas àquela que chamamos de nossa.

Aos meus pais, Rose e Francisco. E aqui, tenho que fazê-lo individualmente: à minha mãe, a mulher mais forte que conheço. Que me apoiou incansavelmente em todas minhas decisões, mas sempre com responsabilidade. Que me ensinou valores que me fizeram a mulher, pesquisadora e bióloga que sou. Que sempre colocou meus sonhos acima de qualquer coisa, me incentivando e me fazendo crescer. Ao meu pai, de quem herdei o perfeccionismo e o gênio forte. Que, assim como minha mãe, ensinou valores para me transformar em uma pessoa correta e honesta. Que incentivou minhas escolhas, mesmo quando não achava que eu pudesse estar certa, mas que eu deveria descobrir por mim mesma. Este título vindouro é nosso. Vocês são os grandes mestres da minha vida.

À minha avó, Lucy, de coração forte e grande, de abraços longos e apertados, da voz que me acalma e me traz felicidade. Da maior torcedora das minhas vitórias. Obrigada por tudo, tudo, desde sempre.

Ao meu noivo, Lucas. Que apesar de toda a loucura de um mestrado e doutorado em sequência, apostou que eu era a escolha certa. Obrigada por ser duro comigo quando eu preciso, por ser o meu equilíbrio, meu porto seguro e minha luz. Obrigada por não passar a mão na minha cabeça, mas por me fazer enfrentar meus problemas. Obrigada por sempre me apoiar e, independente de tempo e distância por me provar que o amor é maior que tudo. Repito mais uma vez: tu tens grande influência em todo meu crescimento, inclusive profissional. A toda família, que também considero minha: Leila, Gustavo, Laura, Sra. Marina e Sr. Bernard – obrigada!

Ao meu companheiro de madrugadas no computador, de lambidas quando eu caía no choro e de apertões nos dias de festa. Ao meu pequenino que tem acompanhado todos esses anos: Banzi querido! Só nós que temos a alma ligada a estes bichinhos sabemos o amor que nos une.

Aos meus tios Hilton e Silvana Reimann que sem titubear cederam sua propriedade para que eu pudesse desenvolver esta pesquisa, além de prestarem todo apoio logístico necessário. Obrigada por confiarem em mim e apoiarem este estudo. Ao ‘tio’ e amigo Alaerte Rizzieri por aceitar o desafio de participar dos experimentos e proceder com a eutanásia dos animais - sei que não foi uma tarefa fácil – muito obrigada! Ao médico veterinário Giordano Gianotti por acompanhar o procedimento de acordo com as normas estabelecidas para uso de animais em pesquisas.

À paixão pela biologia, que me fez descobrir uma vocação e um caminho a seguir; que me trouxe tantas conquistas e me apresentou pessoas e lugares incríveis. Principalmente a amizade que começou na graduação e segue até hoje. Dizem que os amigos da faculdade são aqueles que levamos para uma vida, e isso posso afirmar! Formamos um grupo de amigos que sei que levarei por toda vida. Há muitos (vários) anos atrás um desses amigos disse que “como biólogos, éramos espécies que formavam um ecossistema, cada um com suas particularidades, mas a falta de um, desequilibraria o todo” e nos tornamos assim. Apesar dos diferentes caminhos, quando nos encontramos acaba sendo tudo igual. Obrigada meus queridos! Vocês fizeram esses 11 anos muito mais leves. Em especial àquelas que dividiram todas as etapas até o último minuto: Bianca, Chalissa e Joana, obrigada por todos os momentos que só nós nos entendíamos. Pelas discussões na reta final, pela colônia de férias, pelos almoços que se

estendiam pela tarde e pelas conversas que varavam madrugadas – tenho certeza que vocês foram a melhor terapia que eu poderia ter! Não é possível construir uma tese de doutorado sem boas amizades. Obrigada por trazerem leveza quando foi necessário, por serem companhia nos bons e maus momentos; por torcerem pelas minhas conquistas assim como faço com as de vocês. José Ricardo, Thiago, Tiago, Katiucia, Verônica, Fernanda Borba e Fernanda Garcia – a biologia nunca seria a mesma sem vocês!

Aos mestres que tive durante toda a Pós-Graduação. Àqueles que aprendi a respeitar e ouvir com atenção. As aulas e momentos de discussão que nos agregaram conhecimento, experiência e lições. Muitas vezes foram em momentos fora da sala de aula onde pudemos conversar livremente que trouxeram as melhores construções.

Aos colegas de trabalho do Museu de Ciências e Tecnologia da PUCRS. Mais uma vez: não é possível construir um projeto de pesquisa sem o apoio de pessoas. Obrigada pelos sorrisos diários, pelas conversas no corredor, pelos muitos favores e trabalhos conjuntos. A profa. Melissa e ao prof. Zé Luis – pelas discussões sobre Educação e por me proporcionarem um último estágio docente tão especial. A todos os professores, funcionários, técnicos e estagiários – vocês são a força tão especial que move aquele Museu! Em especial ao colega e amigo, Juliano Romanzini. Eu aprendi muito nesses 6 anos de convívio contigo. Não somente sobre coleções e insetos, mas sobre a vida. Obrigada pelas conversas quase diárias, esse trabalho teve grande influência tua e sem tua ajuda não seria possível.

Aos coautores e amigos: Vinícius Costa-Silva, que além de enriquecer os trabalhos que fizemos em conjunto, me auxiliou indiretamente em discussões sobre moscas e formigas – mesmo dizendo ele que não entende nada disso. Obrigada por também abraçar junto comigo a ideia de fazer o primeiro curso de Entomologia Forense na PUC, e por ter tornado o projeto um sucesso. Charles Santos, que aceitou escrever um trabalho em uma área bem diferente da que estava habituado, pesquisando e estando sempre disponível para discussões. Nesses anos de convívio dividimos cafés e metodologias e aprendemos muito juntos. A Taís Madeira, que me ensinou muito sobre biologia molecular com toda sua calma e doçura, estando sempre disposta a me explicar com lindos tutoriais passo-a-passo! Meu muitíssimo obrigada a vocês queridos amigos e colegas!

Aos colegas do Laboratório de Ecologia de Abelhas, que nesse longo período aprenderam muito sobre porquinhos, moscas e experimentos na área forense. Obrigada por me acolherem e por enriquecerem essa tese com as contribuições de cada um. Em especial a colega e amiga Andressa Dorneles que me acompanhou durante alguns dias nas coletas em campo, que não se importou com a chuva e o cheiro da decomposição, e me ajudou lado a lado. Obrigada! Tua companhia e ajuda foram essenciais! E a minha pupila Daniela Marques, que aceitou o desafio de trabalhar comigo, me acompanhando em viagens, cursos, aulas... Obrigada gurias por conviverem comigo diariamente e aguentarem todas minhas manias (não sei como)!

Ao Laboratório de Geobiologia (LAGEB), do Instituto do Petróleo e Recursos Naturais (IPR) da PUCRS, pelo apoio nas análises moleculares procedidas nesse estudo, além de todas as discussões. Em especial a Adriana Giongo, Renata Medina da Silva, Rafael Rodrigues de Oliveira e a querida Letícia Marconatto.

Ao Instituto Geral de Perícias do RS, aqui representado por Alex Rozenquanz Schutz e Evandro Gomes da Silva, que apoiaram o projeto de pesquisa e abriram as portas do Departamento de Criminalística por muitas vezes. Agradeço pela confiança depositada e, sigamos em frente na parceria da Instituição com a Academia.

Aos muitos amigos que direta ou indiretamente estiveram presentes nesses quatro anos. Obrigada pela paciência e pela compreensão em muitas ausências justificáveis. Pelos churrascos e cervejinhas de final de semana; por entenderem minha paixão pela biologia e a reconhecerem e respeitarem; pelas férias em Floripa e pela amizade que sempre foi o combustível para tocar em frente.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Sul por possibilitar minhas pesquisas e formação acadêmica na graduação e pós-graduação, assim como à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos.

Estudos sobre a diversidade e biologia de insetos que colonizam carcaças expostas ao ambiente natural têm aumentado gradativamente e contribuído para o fomento da entomologia forense no Brasil. Essas pesquisas trazem informações que podem auxiliar na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) e na resolução de outras questões relacionadas ao âmbito legal. Esse trabalho teve como objetivo caracterizar a fauna de insetos associados a carcaças de suínos expostas na região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, relacionando os efeitos dos fatores bióticos e abióticos sobre a comunidade destes organismos. Adicionalmente, foram investigadas metodologias alternativas, a partir da análise do DNA barcode, para identificação de espécies de dípteros necrófagos de interesse forense para o local de estudo. Os experimentos foram conduzidos nos meses de janeiro e setembro de 2014, relacionando-os as estações quente e seca e fria e úmida, respectivamente. Como modelo experimental foram utilizados suínos domésticos machos de aproximadamente 12 kg. Imediatamente após a morte as carcaças foram dispostas em gaiolas metálicas sob uma armadilha modificada do tipo “Shannon”. Para a amostragem dos insetos adultos foram feitas coletas ativas para insetos alados e armadilhas de queda do tipo *pitfall* para os terrestres. Para a coleta de imaturos foram dispostas bandejas sob a carcaça contendo serragem, a qual tinha seu conteúdo removido e transferido para potes plásticos com cobertura de organza para permitir que empupassem e completassem seu desenvolvimento até a emergência. As coletas foram realizadas diariamente, assim como os registros fotográficos para caracterização dos estágios de decomposição. Dados abióticos tais como temperatura, umidade relativa do ar e precipitação foram obtidos junto ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Ao todo foram coletados 16.321 insetos pertencentes às ordens Diptera (78 espécies) e Coleoptera (56 espécies). Quatro estágios de decomposição foram reconhecidos: fresco, gasoso, avançado e seco. Na estação quente e seca, com médias de temperatura de 31,3 °C, umidade relativa do ar de 55,3% e precipitação total de 13,1mm, a decomposição ocorreu em 10 dias, tendo sido coletados 2.326 espécimes. Já na estação fria e úmida, com médias de temperatura de 19,3 °C, umidade de 78,4% e precipitação total de 161,4mm, a decomposição durou 34 dias, tendo sido coletados 13.995 espécimes. Diptera foi predominante em ambas as estações e representou a única ordem de insetos que utilizou a carcaça como recurso para o desenvolvimento de sua prole, dentre os quais aqueles pertencentes às famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae. A diversidade de besouros foi maior na estação fria e úmida, com representatividade de *Dermestes maculatus* (Dermestidae), *Euspilotus azureus* (Histeridae) e *Oxelytrum discicolle* (Silphidae). Diferindo de outros estudos semelhantes ocorridos na estação quente e seca, houve maior abundância de insetos acidentais (Chrysomelidae), fato que pode ser atribuído as altas temperaturas registradas, evidenciando a forte influência dos fatores abióticos sobre a diversidade da comunidade de insetos que colonizaram as carcaças. Para a caracterização molecular foram previamente determinados morfologicamente 40 indivíduos machos de sete espécies de sarcófagídeos de interesse forense. Foram obtidos fragmentos da região COI (citocromo oxidase I) do DNA mitocondrial de aproximadamente 595 pb, os quais se mostraram úteis para diferenciação e caracterização dos distintos táxons aqui propostos. Dessa forma, os resultados aqui obtidos evidenciam a importância de estudos regionais sobre os táxons de importância forense, sobretudo decorrente das influências abióticas sobre a comunidade local associada às carcaças.

ABUNDANCE, DIVERSITY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INSECTS OF FORENSIC INTEREST IN THE REGION OF PORTO ALEGRE, RS, BRAZIL

Studies on diversity and biology of insects colonizing carcasses exposed to the natural environment have gradually increased and contributed to the development of forensic entomology in Brazil. These surveys provide information that may assist in estimating the postmortem interval (PMI) and in the resolution of other issues related to the legal scope. This study aimed to characterize the fauna of insects associated with exposed pig carcasses in the region of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, relating the effects of biotic and abiotic factors to the community of these organisms. In addition, alternative methodologies were investigated, based on DNA barcode analysis, to identify species of necrophagous Diptera of forensic interest for the study site. Experiments were conducted in the months of January and September of 2014, relating them to hot and dry and cold and wet seasons, respectively. As experimental model, domestic male pigs of approximately 12 kg were used. Immediately after death, carcasses were placed in metal cages under a modified "Shannon" trap. For sampling adult insects, active collections of winged insects were made and *pitfall* traps were used for the terrestrial ones. For the collection of immature insects, trays containing sawdust were placed under the carcass. The tray's contents were later removed and transferred to plastic pots with an organza cover to allow them to pupate and complete their development until emergence. Collections were performed daily, as well as photographic records to characterize the stages of decomposition. Abiotic data such as temperature, relative humidity and rainfall were obtained from the National Institute of Meteorology (INMET). In total, 16.321 insects belonging to orders Diptera (78 species) and Coleoptera (56 species) were collected. Four stages of decomposition were recognized: fresh, bloated, decay and dry. In the hot and dry season with temperature averages of 31.3° C, relative air humidity of 55.3% and total rainfall of 13.1 mm, the decomposition occurred in 10 days, and 2.326 specimens were collected. In the cold and wet season, with temperature averages of 19.3° C, humidity of 78.4% and total precipitation of 161.4 mm, the decomposition lasted 34 days, and 13.995 specimens were collected. Diptera was predominant in both seasons and represented the only order of insects that used the carcass as a resource for the development of their offspring, including those belonging to the families Calliphoridae, Muscidae and Sarcophagidae. Beetle diversity was higher in the cold and wet season, with representatives of *Dermestes maculatus* (Dermestidae), *Euspilotus azureus* (Histeridae) and *Oxelytrum discicolle* (Silphidae). Differing from other similar studies in the hot and dry season, there was an increase in the number of accidental insects (Chrysomelidae), a fact that can be attributed to the high temperatures recorded, evidencing the strong influence of abiotic factors on the diversity of the community of insects that colonized the carcasses. For the molecular characterization, 40 male individuals of seven species of flesh flies of forensic interest were morphologically determined previously. Fragments were obtained from the COI (cytochrome c oxidase subunit I) region of the mitochondrial DNA of approximately 595bp length, which were useful for differentiation and characterization of the different taxa proposed here. Thus, the results obtained here evidenced the importance of regional studies on taxa of forensic importance, mainly due to the biotic and abiotic influences on the local community associated with the carcasses.

APRESENTAÇÃO

A entomologia forense (EF) é definida como a aplicação do estudo de insetos, ou mesmo outros artrópodes, que associados aos demais procedimentos periciais, tem como propósito obter informações úteis para uma investigação criminal (Thyssen & Linhares, 2012). Após a morte, o tecido de animais, assim como de humanos, representa um atrativo e uma fonte de recurso energético para diversos insetos (Smith, 1986; Anderson & VanLaerhoven, 1996; Battán-Horenstein *et al.*, 2010). Eles são atraídos à carcaça em função dos gases emanados durante o processo de decomposição, da degradação de carboidratos e lipídios, entre outros, gerando gás amoníaco (NH₃), ácido sulfúrico (SH₂), nitrogênio (N₂) e gás carbônico (CO₂) (Magaña, 2001). A decomposição se caracteriza por um processo de degradação biológica contínuo, iniciando na hora da morte e finalizando quando a carcaça está reduzida ao esqueleto. Contudo pode ser subdividido em estágios a fim de facilitar o estudo do processo, sendo dependente das condições climáticas e sazonais (Bornemissza, 1956). Vários autores em diferentes localidades propuseram uma divisão que se adequasse às condições observadas: Mégnin (1894), na França, inicialmente, dividiu o processo de decomposição em oito etapas; Payne (1965) em seis, nos Estados Unidos; Bornemissza (1956) em cinco, na Austrália; e Reed (1958) em quatro estágios, nos Estados Unidos.

Os diferentes estágios do processo de decomposição atraem distintas espécies de insetos (Catts & Goff, 1992; Anderson & VanLaerhoven, 1996; Byrd & Castner, 2010), de acordo com os recursos disponibilizados. Segundo Smith (1986), quatro categorias ecológicas podem ser reconhecidas em comunidades associadas a carcaças: (1) espécies necrófagas, as quais verdadeiramente se alimentam da carcaça; (2) predadores e parasitas de espécies necrófagas, que se alimentam de outros insetos ou artrópodes presentes; (3) espécies onívoras, que se alimentam tanto do recurso quanto de seus colonizadores e (4) espécies acidentais, que utilizam a carcaça como uma extensão de seus ambientes.

As ordens Diptera e Coleoptera apresentam espécies com diversos hábitos alimentares, dentre os quais a necrofagia e o predatismo, representando cerca de 60% de toda a fauna decompositora associada a uma carcaça (Payne, 1965). Sua utilização está relacionada ao fato de serem usualmente os primeiros a encontrar um corpo após a morte, estando presentes em todas as fases de decomposição (Payne, 1965; Dillon & Anderson, 1995; Dillon, 1997), e, além disso, algumas espécies são específicas de certas áreas geográficas e estações (Payne, 1965; Catts & Goff, 1992; Anderson & VanLaerhoven, 1996).

Diptera apresenta-se como uma das mais diversas ordens de insetos, com aproximadamente 160.000 espécies, 11.000 gêneros e 160 famílias descritas mundialmente (Gullan & Cranston, 2012), sendo na região Neotropical conhecidas 31 mil espécies distribuídas em 118 famílias (Carvalho *et al.*, 2012). Contudo, estima-se que esse número seja bem superior, visto que existem áreas ainda não amostradas e o número de taxonomistas é reduzido (Rafael *et al.*, 2009). Devido à atratividade que a

matéria orgânica em decomposição exerce sobre estes insetos, são os primeiros a localizar e colonizar um corpo em decomposição, imediatamente após a morte (Keh, 1985; Campobasso *et al.*, 2001), fornecendo informações úteis nas investigações forenses (Byrd & Castner, 2010). Além disso, apresentam importância na área médico-veterinária, atuando como vetores de patógenos e causando miíases em humanos e animais (Linhares & Thyssen, 2007; Gullan & Cranston, 2012). Califorídeos e sarcófagídeos são frequentemente utilizados em procedimentos legais por serem os primeiros a colonizar um corpo após a morte e por apresentarem íntima associação com cadáveres humanos (Nuorteva, 1974).

Os besouros, pertencentes a ordem Coleoptera, são o mais rico e diverso grupo da classe Insecta, comportando 350 mil espécies, sendo seu sucesso evolutivo relacionado à forte esclerotização do corpo e a transformação das asas anteriores em élitros, sendo esses mecanismos responsáveis por uma redução na perda da água e proteção contra predadores (Cassari & Ide, 2012). Representando a segunda ordem de insetos de interesse forense no Brasil (Almeida *et al.*, 2015), apresenta diversos representantes necrófagos e predadores, com uma variação de hábito alimentar entre as fases adulta e larval (Mise *et al.*, 2007). A ausência de competição com os dípteros, na maioria das vezes, deve-se à maior mobilidade das moscas, que chegam primeiro ao recurso, se desenvolvendo em uma taxa acelerada, abandonando a carcaça antes que ela atinja o estágio seco. Os besouros, por sua vez, apresentam vantagens evolutivas, como o sistema sensorial e locomotor bem desenvolvido nos imaturos e a capacidade de escavar dos adultos, além de serem capazes de utilizar recursos alimentares não acessíveis a outros insetos, devido ao desenvolvimento do aparelho bucal, permitindo o consumo de partes mais secas do cadáver (Crowson, 1981). Dessa forma, os besouros necrófagos ocorrem nos estágios mais secos, sendo essenciais para determinação do intervalo pós-morte (IPM) nos estágios finais da decomposição (Mise *et al.*, 2010), quando a abundância de dípteros diminui. Assim, o estudo dos artrópodes associados a cadáveres pode produzir informações adicionais, auxiliando na resolução de crimes e suas circunstâncias (Benecke & Lessig, 2001), fornecendo informações a respeito do IPM, local da morte (possibilidade de relocação do cadáver), modo ou causa da morte, investigação de substâncias tóxicas, identificação de suspeitos ou vítimas e negligências ou maus tratos no cuidado de crianças, idosos ou incapacitados (Thyssen & Linhares, 2012).

O estudo da fauna cadavérica possibilita a aplicação mais importante da entomologia forense, baseando-se na exploração da carcaça ao longo de cada etapa da decomposição, o conhecimento a respeito do estágio de desenvolvimento de cada inseto, associados aos fatores abióticos, permite a utilização desses insetos para auxiliar na estimativa do IPM (Catts & Goff, 1992), uma das principais questões abordadas em uma investigação criminal. Comumente, na prática médico-legal, o IPM pode ser estimado por meio da observação da evolução dos fenômenos cadavéricos (Campobasso *et al.*, 2001). Contudo, a análise de circunstâncias intrínsecas e extrínsecas pode variar a marcha e fisionomia dos fenômenos cadavéricos putrefativos, sobretudo durante o processo de decomposição (Anderson &

Hobischak, 2004). Após 72h, as condições citadas acima não se tornam apropriadas para estimar o tempo de morte (Thyssen & Linhares, 2012), e dessa forma diversos autores sugerem que a entomologia forense pode determinar com maior acurácia o tempo de óbito em intervalos pós-morte mais longos (Kashyap & Pillay, 1989; Catts & Goff, 1992). Há duas metodologias principais para estimativa do IPM utilizando a informação a respeito dos insetos que visitam um corpo. A primeira, denominada cálculo do limite máximo, ou IPM máximo, proposta por Mégnin (1894), está baseada no estudo da sucessão da entomofauna associada a carcaça, ou seja, a presença e frequência com que os insetos estão visitando a carcaça em um determinado momento, e associa certas espécies a determinadas fases de decomposição do cadáver. A composição da entomofauna associada a cadáveres modifica-se conforme progride o processo de decomposição, e a sucessão dessas espécies segue um padrão normalmente previsível, sendo a sobreposição dos táxons e sua abundância, relacionados a região geográfica em questão, dessa forma, devendo-se considerar os diversos fatores bióticos e abióticos presentes para a estimativa do IPM. Portanto, torna-se imprescindível, para uma acurada estimativa do IPM, a identificação dos insetos para uma determinada área e condição climática. A segunda metodologia, e mais utilizada, baseia-se no conhecimento do ciclo de vida do inseto associado ao corpo (Anderson & VanLaerhoven, 1996; Thyssen & Linhares, 2012), ou seja, corresponde ao cálculo da idade dos imaturos que se criaram na carcaça, evidenciando o mínimo de tempo em que o corpo esteve exposto, também chamado de IPM mínimo, ou limite mínimo. Para isso, utiliza-se o cálculo do grau dia acumulado (GDA), considerando as condições de temperatura do local e dados da literatura sobre o tempo de desenvolvimento da espécie analisada. Dessa forma, a idade do exemplar mais velho coletado reflete o IPM mínimo, assumindo que a chegada das moscas e sua oviposição ocorreram logo após a morte.

Sabe-se, porém, que muitos fatores bióticos e abióticos influenciam na taxa de decomposição e na colonização de insetos, incluindo localização geográfica, condições climáticas, estação do ano, ambiente de decomposição e o estado físico em que se encontra a carcaça (Catts & Goff, 1992; Voss *et al.*, 2011). O clima, especialmente quando relacionado à temperatura e umidade, apresenta grande influência na decomposição e sucessão de insetos (Shean *et al.*, 1993), atuando como fatores importantes, tanto na velocidade de decomposição quanto na chegada dos diferentes tipos de artrópodes à carcaça. Enquanto altos índices de umidade e temperatura permitem a decomposição rápida da carcaça, baixas temperaturas e umidades fazem com que a carcaça demore mais tempo para se decompor (Monteiro-Filho & Penereiro, 1987). Este prolongamento no tempo de decomposição permite a chegada de mais insetos à carcaça. Assim, as variações na temperatura e umidade relativa estão frequentemente associadas com as estações do ano. Estudos como os de Souza & Linhares (1997), Moura e colaboradores (1997) e Monteiro-Filho & Penereiro (1987), entre outros, mostram que a fauna encontrada pode variar de acordo com as estações, sendo que algumas espécies podem não estar presentes em determinadas épocas do ano. Mise *et al.* (2007) relataram que houve diferença significativa na fauna de Coleoptera, por exemplo, encontrada em carcaças de porcos nas diferentes estações do ano.

A decomposição foi mais lenta no inverno, seguida do outono, primavera e verão e, além disso, o número de indivíduos coletados no inverno também foi menor, apesar da colonização ter ocorrido desde os seus primeiros dias.

A presença de drogas e outras toxinas em cadáveres também afetam a oviposição de insetos adultos ou o desenvolvimento dos seus imaturos (Avila & Goff, 1998). Carvalho e colaboradores (2001) investigaram o efeito de doses letais de diazepam no desenvolvimento de califorídeos e, observaram que os imaturos que se alimentaram do tecido com a droga se desenvolveram mais rápido que o grupo controle. Essas diferenças mostraram-se significativas para alterar a estimativa de IPM baseado no desenvolvimento larval dos insetos. A identificação do período de desenvolvimento das larvas, juntamente com o conhecimento a respeito da influência dos fatores bióticos e abióticos, para determinada região geográfica, torna possível a determinação do IPM com segurança (Catts & Goff, 1992; Anderson & VanLaerhoven, 1996)

A maioria dos insetos necrófagos, quando em estágio adulto, pode ser identificada morfológicamente, porém, em certos casos a identificação de imaturos e adultos é laboriosa. Caracteres diagnósticos para imaturos de insetos de interesse forense são poucos, além de apresentarem variações intraespecíficas e diferenças inconspícuas entre as espécies (Liu & Greenberg, 1989; Wells & Stevens, 2008). Assim sendo, existe a necessidade da criação das formas imaturas até a emergência dos adultos para identificação, porém, por muitas vezes, uma investigação criminal não dispõe de tempo hábil para tal. Ainda, devem ser levadas em consideração as espécies crípticas encontradas em muitas famílias de moscas necrófagas, como Sarcophagidae e Calliphoridae. Uma alternativa para o problema em questão é o uso de técnicas de biologia molecular a fim de auxiliar a identificação de insetos de interesse forense. O DNA mitocondrial (DNAm) vem se mostrando um excelente marcador molecular, sendo apresentado como uma molécula circular formada por aproximadamente 16kb e possuindo 37 genes, com organização simples e uniforme, baixo número de recombinação e alta taxa de substituição de nucleotídeos. Diversos estudos sugerem o uso do DNA *barcode* visando à identificação das espécies, através da utilização de um fragmento padronizado da citocromo c oxidase subunidade I (COI) (Harvey *et al.*, 2008; Boheme *et al.*, 2012). O DNA *barcode* tem sido apresentado com sucesso para prover a identificação de diversas espécies de importância forense (Madeira *et al.*, 2016). Hebert e colaboradores (2003) propuseram um sistema de bioidentificação global para animais, em que sugeriram o uso de um fragmento de 648 pb (pares de base), correspondente a subunidade I da citocromo oxidase do DNA mitocondrial, como marcador padrão e chamado de DNA *barcode*. A premissa levantada é que toda espécie deve apresentar uma ‘etiqueta’ ou ‘código de barras’ único, sendo que a variação interespecífica é bem mais elevada que a intraespecífica (Hebert *et al.*, 2003). A escolha deste gene como um fragmento padronizado tem como principais finalidades: identificação de espécies crípticas, descobrimento de novas espécies, identificação de formas imaturas e adultas de uma mesma espécie e, identificação a partir de fragmentos de material biológico.

O crescente aumento na criminalidade em diversos países de todo mundo demanda a multidisciplinaridade em investigações criminais. Nas últimas duas décadas, a taxa de homicídios no Brasil cresceu 41%, com uma média de 27,1 mortes por 100 mil habitantes (IBGE 2013). Campobasso & Introna (2001) defenderam a intergração dos esforços entre peritos criminais, antropólogos, patologistas forenses e entomólogos, entre outros profissionais. Complementando os avanços nas pesquisas biológicas, ferramentas que utilizam dados ecológicos e entomológicos estão sendo rotineiramente implementadas por cientistas no Brasil (Vasconcelos & Araujo, 2012). A alta taxa de homicídios em Porto Alegre enfatiza a importância desse trabalho conjunto entre a perícia criminal e a Universidade. Segundo dado recente da revista britânica *The Economist* (2017), a cidade está entre as 50 mais violentas do mundo em 2016, apresentando mais de 40 homicídios por ano para cada 100 mil habitantes (apêndice V).

Estrutura do trabalho

A ausência de estudos sobre entomologia forense e a escassez de dados na região de Porto Alegre estimularam o desenvolvimento do presente trabalho, o qual apresenta contribuições sistematizadas do conhecimento da fauna de importância forense para a região, realizada em duas estações, quente e seca e fria e úmida. Pretende-se, com os resultados obtidos, ampliar o conhecimento da entomofauna necrófaga e detectar possíveis espécies com aplicações forenses na região.

A pesquisa foi desenvolvida em propriedade particular no extremo sul do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, no bairro Lami (apêndice I) ($30^{\circ}14'18,74''$ S; $51^{\circ}07'19,82''$ O), nos meses de janeiro e setembro de 2014, referentes as estações quente/seca e fria/úmida, respectivamente. A área utilizada para realização dos experimentos se caracteriza como um ambiente rural, contudo com uma conjunção de produção primária (atividades voltadas a agricultura e extrativismo) e ocupação urbana. Esse modelo está inserido no conceito de “Cidade Rururbana”, proveniente do Plano Diretor de 1999 da cidade (SMURB).

Como modelo animal foram expostos, simultaneamente em cada estação, três suínos domésticos machos (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758) de aproximadamente 12 kg, e distavam em 30 m um do outro (apêndice II). Os dados abióticos foram obtidos da estação do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) localizada em Porto Alegre e são apresentados nos apêndices III e IV. As carcaças foram observadas diariamente e de acordo com as características fisionômicas de seus estágios de decomposição adotou-se a classificação proposta por Reed (1958).

O trabalho está organizado em três capítulos, seguidos de apêndices. Todos os manuscritos foram preparados de acordo com as normas dos periódicos a que serão submetidos, exceto as figuras e tabelas que são apresentadas ao longo do texto de acordo com as normas para teses do Programa de Pós-

Graduação em Zoologia da PUCRS. Os capítulos apresentam os principais resultados na forma de manuscritos independentes, a seguir:

Capítulo I: **Abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados a carcaças de suínos expostas na região Sul do Brasil.** Neste capítulo é avaliada a abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados às carcaças de suínos expostas na região de Porto Alegre, e a relação com os fatores bióticos e abióticos, visando indicar as espécies de maior relevância forense para estimativa de tempo de morte. O manuscrito será submetido ao periódico *Medical and Veterinary Entomology*.

Capítulo II: **Coleópteros (Arthropoda: Insecta) associados a carcaças em decomposição no Sul do Brasil: a influência de fatores bióticos e abióticos sobre a abundância e diversidade de espécies.** Neste estudo avaliou-se a composição de coleópteros associados a carcaças suínas expostas em uma área na região de Porto Alegre, RS, visando analisar como a abundância e riqueza desses insetos pode ser afetada pela atuação, em conjunto, de fatores bióticos (categorias ecológicas e processo de decomposição) e abióticos (temperatura, umidade e precipitação). O manuscrito será submetido ao *Journal of Medical Entomology*.

Capítulo III: **O uso de DNA barcode como alternativa para identificação de espécies de sarcófagídeos de importância forense do Sul do Brasil.** Nesse manuscrito foi analisado o potencial da aplicabilidade da metodologia de DNA *barcode* para identificação de espécies de sarcófagídeos associadas a carcaças suínas em decomposição em Porto Alegre, RS, de forma a ampliar a base de dados existente facilitando a identificação de espécies crípticas de interesse forense. O manuscrito será submetido ao periódico *Medical and Veterinary Entomology*.

REFERÊNCIAS:

- Almeida, L.M., Corrêa, R.C. & Grossi, P.C. (2015) Coleoptera species of forensic importance from Brazil: an updated list. *Revista Brasileira de Entomologia*, **59**, 274 – 284.
- Anderson, G.S. & Hobischak, N.R. (2004) Decomposition of carrion in the marine environment in British Columbia, Canada. *International Journal of Legal Medicine*, **118**, 206-209.
- Anderson, G.S. & VanLaerhoven, S.L. (1996) Initial studies on insect succession on carrion in Southwestern British Columbia. *Journal of Forensic Sciences*, **41**, 617-625.
- Avila, F.W. & Goff, M.L. (1998) Arthropod succession patterns onto burnt carrion in two contrasting habitats in the Hawaiian Islands. *Journal of Forensic Sciences*, **43**, 581-586.
- Battán-Horenstein, M.A., Linhares, X., Ferradas, B.R. & García, D. (2010) Decomposition and dipteran succession in pig carrion in central Argentina: ecological aspects and their importance in forensic science. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 16–25.
- Benecke, M. & Lessig, R. (2001) Child neglect and forensic entomology. *Forensic Science International*, **120**, 155–159.
- Boehme, P., Amendt, J. & Zehner, R. (2012) The use of COI barcodes for molecular identification of forensically important fly species in Germany. *Parasitology Research*, **110**, 2325-2332.
- Bornemissza, G.F. (1956) An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. *Australian Journal of Zoology*, **5**, 1-12.
- Byrd, J. M. & Castner, J.L. (2010) *Forensic Entomology: Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton
- Campobasso, C.P., Di Vella, G. & Introna, F. (2001) Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International*, **120**, 18-27.
- Campobasso, C.P. & Introna, F. (2001) The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. *Forensic Science International*, **120**, 132-139.
- Carvalho, C.J.B., Rafael, J.A., Couri, M.S. & Silva, V.C. (2012) Diptera. *Insetos do Brasil. Diversidade e Taxonomia*. pp. 701-743. Ed. Fapeam/Holos, Ribeirão Preto.
- Carvalho, L.M.L., Linhares, A.X. & Trigo, J.R. (2001) Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Science International*, **120**, 140-144.
- Cassari, A.S. & Ide, S. (2012) Coleoptera Linnaeus, 1758. *Insetos do Brasil, Diversidade e Taxonomia*. pp. 453-535. Ed. Fapeam/Holos, Ribeirão Preto.
- Catts, E.P. & Goff, M.L. (1992) Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, **37**, 253–272.
- Crowson, R.A. (1981) *The biology of Coleoptera*. Academic Press, New York.
- Dillon, L.C. (1997) *Insect succession on carrion in three biogeoclimatic zones in British Columbia*. M.Sc. thesis, Simon Fraser University.

- Dillon, L.C. & Anderson, G.S. (1995) Forensic Entomology: The use of insects in death investigations to determine elapsed time since death, *Canadian Police Research Centre*.
- Gullan, P.J. & Cranston, P.S. (2007) *Os insetos: um resumo de Entomologia*. Editora Roca Ltda, São Paulo.
- Harvey, M.L., Gaudieri, S., Villet, M.H. & Dadour, I.R. (2008) A global study of forensically significant calliphorids: implications for identification. *Forensic Science International*, **177**, 66-76.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & de-Waard, J.R. (2003) Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **270**, 569-599.
- IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>
Acesso em: 06 de Maio de 2017.
- Kashyap, V.K. & Pillay, V.V. (1989) Efficacy of entomological method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. *Forensic Science International*, **40**, 245-50.
- Keh, B. (1985) Scope and applications of forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, **30**, 137-54.
- Linhares, A.X. & Thyssen, P.J. (2007) Miíases de Importância Médica – Moscas e Entomologia Forense. *Parasitologia Clínica – seleção de métodos e técnicas de laboratório para o diagnóstico das parasitoses humanas*. pp. 709-730. Editora Atheneu, São Paulo.
- Liu, D. & Greenberg, B. (1989). Immature stages of some flies of forensic importance. *Annals of the Entomological Society of America*, **82**, 80–93.
- Madeira, T., Souza, C.M., Cordeiro, J. & Thyssen, P.J. (2016) The use of DNA barcode for identifying species of *Oxysarcodexia* Townsend (Diptera: Sarcophaidae): a preliminar survey. *Acta Tropica*, **161**, 73-78.
- Magaña, C. (2001) La entomología forense y su aplicación a la medicina legal. Data de la muerte. *Revista Ibérica de Aracnología*, **28**, 49-57.
- Mise, K.M., Almeida, L.M. & Moura, M.O. (2007) Levantamento da fauna de Coleoptera que habita a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. *Revista Brasileira de Entomologia*, **51**, 358–368.
- Mise, K.M., Souza, A.S.B., Campos, C.M., Keppler, R.L.F. & Almeida, L.M. (2010). Coleoptera associated with pig carcass exposed in a forest reserve, Manaus, Amazonas, Brazil. *Biota Neotropical*, **10**, 321–324.
- Mégnin, P. (1894) *Faune des cadavres. Application de L'entomologie a la Médecine Légale*. Masson et Gauthiers-Villars, Paris.
- Monteiro-Filho, E.L.A. & Penereiro, J.L. (1987) Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, **47**, 289-295.
- Moura, M.O., Carvalho, C.J.B. & Monteiro-Filho, E.L.A. (1997) A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**, 269-274.

Nuorteva, P. (1974) Age determination of a blood stain in a decaying shirt by entomological means. *Forensic Science*, **3**, 89-94.

Payne, J.A. (1965) A summer carrion study of the baby pig *Sus Scrofa*. *Ecology*, **46**, 592-602.

Rafael, J.A., Alexandre, P.A. & Amorim, D.S. (2009). Knowledge of Insect Diversity in Brazil: Challenges and Advances. *Neotropical Entomology*, **38**, 565-570

Reed, H.B. (1958) A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. *The American Midland Naturalist Journal*, **59**, 213-245.

Shean, B.S., Messinger, L. & Papworth, M. (1993) Observations of diferencial decomposition on sun exposed v. shaded pig carrion in coastal Washington State. *Journal of Forensic Science*, **38**, 938 - 949.

Smith, K.G.V. (1986) *A manual of forensic entomology*. British Museum, London.

SMURB (Secretaria Municipal de Urbanismo). Disponível em: http://www2.portoalegre.rs.gov.br/spm/default.php?reg=15&p_secao=46 Acesso em: 06 de Maio de 2017.

Souza, A.M. de & Linhares, A.X. (1997) Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in Southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**, 8-12.

The world's most dangerous cities. *The Economist*, Londres, 31 de março de 2017.

Thyssen, P.J. & Linhares, A.X. (2012) Entomologia Forense, Miíases e Terapia Larval. *Insetos do Brasil. Diversidade e Taxonomia*. Pp. 151-174. Ed. Fapeam/Holos, Ribeirão Preto.

Vasconcelos, S.D. & Araujo, M.C.S. (2012) Necrophagous species of Diptera and Coleoptera in northeastern Brazil: state of the art and challenges for the Forensic Entomologist. *Revista Brasileira de Entomologia*, **56**, 7-14.

Voss, S.C., Cook, D.F. & Dadour, I.R. (2011) Decomposition and insect succession of clothed and unclothed carcasses in Western Australia. *Forensic Science International*, **211**, 67-75.

Wells, J.D. & Stevens, J.R. (2008) Application of DNA-based methods in forensic entomology. *Annual Review of Entomology*, **53**, 103-120.

CAPÍTULO I

Abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados a carcaças de suínos expostas na região Sul do Brasil

Manuscrito redigido no formato indicado para o periódico Medical and Veterinary
Entomology

Ries et al.:

Dípteros necrófagos do Sul do Brasil

Medical and Veterinary Entomology

Original Articles

A. C. Ries

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Av. Ipiranga, 6681

CEP: 90619-900

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: 55 51 33534376

Email: anacarolinaries@hotmail.com

Abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados a carcaças de suínos expostas na região Sul do Brasil

A. C. Ries, P. J. Thyssen and B. Blochtein

Abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados a carcaças de suínos expostas na região Sul do Brasil

Ana Carolina Reimann Ries ¹; Patrícia Jacqueline Thyssen ²; Betina Blochtein ¹

(1) Departamento de Biodiversidade e Ecologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Rio Grande do Sul;

(2) Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo

Resumo. A entomofauna que coloniza carcaças varia de acordo com a região, ambiente, clima, estação do ano, além dos fatores bióticos destacando-se principalmente a competição. O presente estudo objetivou avaliar a abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados a carcaças de suínos expostas na região de Porto Alegre, local de clima subtropical úmido ao Sul do Brasil, visando indicar espécies de maior relevância forense para a estimativa do intervalo pós-morte dentro do âmbito forense. Três suínos (*Sus scrofa* L.) pesando aproximadamente 12 kg cada foram expostos simultaneamente em cada estação, imediatamente após a morte. Foram coletados 11.914 espécimes adultos e 3.992 imaturos pertencentes as famílias Fanniidae, Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae e Anthomyiidae. A abundância e riqueza variaram entre as estações e fases de decomposição, sendo a maior diversidade observada na estação fria e úmida. Na estação quente/seca houve associação de *Oxysarcodexia culmiforceps* com o estágio fresco, *Chrysomya albiceps* e *Musca domestica* com o gasoso e *Ravinia belforti* com o estágio seco. Na estação fria e úmida as espécies mais abundantes, de acordo com os estágios de decomposição, foram *Stomoxys calcitrans*, *Lucilia eximia*, *O. culmiforceps* e *Fannia heydenii*, respectivamente. Dentre as espécies que completaram seu ciclo de vida utilizando o recurso, foi observada a dominância de *C. albiceps* em ambas as estações. Em setembro, *L. eximia* e *Ophyra aenescens* apresentaram elevada abundância, podendo ser consideradas espécies indicadoras forenses para a estação.

Palavras-chave: Calliphoridae, Sarcophagidae, intervalo pós-morte, entomologia forense.

Abstract. The entomofauna that colonizes carcasses varies according to region, environment, climate, season, besides the biotic factors emphasizing mainly the competition. The study aimed to evaluate the abundance and diversity of scavenger dipterans associated with exposed pig carcasses in Porto Alegre, an area with a humid subtropical climate in southern Brazil, in order to determine the species of greatest forensic relevance for estimating postmortem interval. Three pigs (*Sus scrofa* L.) were exposed simultaneously in each season, immediately after death. A total of 11,914 adult and 3,992 immature specimens belonging to the families Fanniidae, Sarcophagidae, Calliphoridae, Muscidae and Anthomyiidae were collected. The abundance and richness varied between seasons and stages of decomposition, with the greatest diversity observed in the cold and wet season. In the hot/dry season there was an association of *Oxysarcodexia culmiforceps* with the fresh stage, *Chrysomya albiceps* and *Musca domestica* with the bloated stage and *Ravinia belforti* with the dry stage. In the cold/wet season the most abundant species, according to the stages of decomposition, were *Stomoxys calcitrans*, *Lucilia eximia*, *O. culmiforceps* and *Fannia heydenii*, respectively. Among the species that completed their life cycle using the resource, the dominance of *C. albiceps* was observed in both seasons. In September, *L. eximia* and *Ophyra aenescens* presented high abundance, being considered as forensic indicator species for the season.

Key-words: Diptera, necrophagous flies, postmortem interval, forensic entomology

INTRODUÇÃO

Diversos fatores locais ou regionais regulam a biodiversidade, sendo que em uma mesma região geográfica a diversidade presente é refletida pela coexistência entre táxons que interagem entre si (Ferraz *et al.*, 2009). Entre esses fatores a intervenção do homem pode causar mudanças irreversíveis à biodiversidade e as comunidades que compõe o ecossistema de determinada região. Sabe-se que a diversidade de espécies de numerosos táxons é maior nos trópicos, principalmente quando nos referimos aos insetos, devido a sua capacidade de produzir gerações em curto período de tempo, as quais podem se tornar indicadores ecológicos de ambientes (Primack & Rodrigues, 2001).

A matéria orgânica animal em decomposição se caracteriza como um recurso alimentar efêmero para uma grande quantidade de organismos e, na ausência de vertebrados carnívoros os insetos necrófagos são os principais responsáveis pela decomposição de carcaças expostas (Hanski, 1987, Campobasso *et al.*, 2001, Marchenko, 2001). As comunidades de insetos variam de acordo com as regiões geográficas em que são encontradas devido à influência do clima e por vezes fisiogeografia local. Uma variedade de insetos ocorre associada a esse recurso, dependendo da sua preferência pelos estágios de decomposição, e alguns desses não somente visitam a carcaça, mas também utilizam a mesma para completar seu desenvolvimento (Norris, 1965; Keh, 1985; Souza & Linhares, 1997; Campobasso *et al.* 2001.).

A principal razão para o uso de insetos em investigações criminais se concentra no fato de que estes organismos, principalmente moscas, são os primeiros a detectar e colonizar um corpo em decomposição e, além disso, algumas espécies são características de determinadas regiões ou períodos (Carvalho *et al.*, 2000). Destaca-se ainda que a oviposição dos insetos ocorre em seguida após a morte, permitindo inferir questões relacionadas ao tempo de morte do cadáver (Smith, 1986).

Diptera destaca-se por exibir alta diversidade, apresentando na região Neotropical aproximadamente 31 mil espécies (Carvalho *et al.*, 2012). Destas, muitas são consideradas pela entomologia forense, pois são frequentemente atraídas pela matéria orgânica animal em decomposição, fornecendo informações úteis em investigações criminais (Byrd & Castner, 2010). Considerando-se os hábitos de colonização se reconhece a importância forense das famílias Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae (Smith, 1986; Catts & Goff, 1992; Carvalho *et al.*, 2000), inclusive em ambientes sinantrópicos (Nuorteva, 1963). O conhecimento dos aspectos biológicos e ecológicos dessas espécies em regiões e períodos climáticos distintos, torna-se substancial de forma a estabelecer a entomologia forense como uma ferramenta auxiliar no âmbito legal (Rocha *et al.*, 2009). Neste contexto, esse estudo objetivou avaliar a abundância e diversidade de dípteros necrófagos associados a carcaças de suínos expostas e sua relação com os fatores abióticos e bióticos, visando indicar as espécies de maior relevância forense para estimar o intervalo pós-morte para a região Sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi conduzida em uma propriedade particular (30°14'18,74" S, 51°07'19,82" O) no extremo sul do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. A propriedade possui uma área de 10ha e está localizada ao nível do mar, e o clima é classificado como subtropical úmido (CFA) três suínos domésticos machos (*Sus scrofa* L.), pesando aproximadamente 12 kg cada, foram expostos em cada experimento. Os animais foram eutanasiados com disparo de arma de fogo na região occipital. Anestésicos e sedativos não foram utilizados evitando-se influenciar no processo de decomposição das carcaças e subsequente colonização dos insetos (Introna *et al.*, 2001).

Imediatamente após a morte, as carcaças foram expostas em decúbito lateral em gaiolas metálicas com dimensões de 100 cm³, para restringir o acesso de vertebrados carnívoros. As gaiolas foram dispostas em uma área com vegetação herbácea, a cerca de um metro de distância de um remanescente de mata nativa, e com 30 metros entre elas. Sobre cada gaiola uma armadilha do tipo “Shannon” modificada foi colocada, consistindo de tubos de PVC cobertos com tecido organza e com uma abertura de 30 cm na parte inferior para permitir a entrada dos insetos. Ao redor das carcaças foram colocadas seis armadilhas *pitfall* (Kearns & Inouye, 1993) contendo água e uma gota de detergente para coleta de insetos. Abaixo das gaiolas uma bandeja contendo serragem foi usada para a coleta dos insetos imaturos que abandonavam espontaneamente o recurso no terceiro ínstar.

Os experimentos foram executados entre os dias 14-23 de janeiro (estação quente e seca); e de 1° de setembro a quatro de outubro (estação fria e úmida). Diariamente, com o uso de frascos mortíferos as moscas aprisionadas dentro da armadilha Shannon eram coletadas, assim como o conteúdo dos *pitfalls*, armazenados em álcool 90% e encaminhados ao laboratório para triagem. Os imaturos encontrados nas bandejas eram recolhidos junto com a serragem e depositados em frascos plásticos cobertos com tecido organza para registro do intervalo de emergência. Para isso, os frascos foram mantidos em local próximo aos experimentos, e protegido da chuva. Os espécimes foram identificados utilizando-se chaves taxonômicas (Carvalho & Ribeiro, 2000; Carvalho *et al.*, 2002; Carvalho, 2002; Carvalho & Mello-Patiu, 2008), coleções de referência, e quando necessário encaminhados a especialistas, sendo, posteriormente, incorporados à seção Entomológica Forense da Coleção de Insetos do Museu de Ciências e Tecnologia (MCT) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Dados abióticos (temperatura, umidade relativa e precipitação) foram obtidos a partir de consulta à base de dados mantida pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), provenientes da estação localizada em Porto Alegre. As carcaças foram fotografadas diariamente para documentação dos estágios de decomposição, que foram identificados com base em informações constantes na literatura e a partir das observações pessoais diárias. A classificação dos estágios de decomposição que mais se adequaram às condições climáticas do presente estudo, foram as descritas por Reed (1958), sendo

denominados como: fresco, gasoso, avançado e seco. Os experimentos foram finalizados quando não havia mais a presença de insetos adultos e imaturos.

A diversidade da fauna de insetos associada às carcaças suínas durante os experimentos foi estimada por meio dos índices de diversidade de Shannon, Simpson e Equitabilidade de Pielou, considerando a estação de experimento e estágio de decomposição, com o software PAST (Hammer *et al.*, 2001). Diferenças na riqueza, abundância e índices de diversidade entre as estações (seca/quente e fria/úmida) e entre os estágios de decomposição (fresco, gasoso, avançado e seco) foram testados através de uma análise de variância (ANOVA). Testes de Tukey foram aplicados *a posteriori* de forma a determinar diferenças individuais.

De forma a testar as diferenças na composição de espécies entre as estações do ano e entre os estágios de decomposição, uma análise de variância multivariada de dois fatores (*Permanova two-way*) foi realizada. A similaridade entre os estágios e estações foi calculada usando o índice de Bray-Curtis (1957), que é baseado nas distâncias calculadas a partir do módulo das diferenças entre as densidades de amostras para cada espécie dada (Nering & Von Zuben, 2010), ou seja é uma análise quantitativa que visa avaliar as diferenças na composição de espécies, de acordo com a abundância. Varia de 0 a 1, onde valores próximos de 1 demonstram maior diferença na composição. Comparações par a par foram realizadas para visualizar as diferenças individuais. A fim de demonstrar graficamente as diferenças foi elaborado um gráfico de ordenação de uma análise de correspondência destendenciosa (DCA). O método escolhido de DCA utiliza similaridades em associações de espécies para ordenar grupos (Hill & Gauch, 1980; Ludwig & Reynolds, 1988). A DCA é derivada da análise de correspondência, porém é mais refinada, pois reduz a compressão no primeiro eixo e a distorção no segundo e terceiro eixos (Hill & Gauch, 1980).

Análises da influência dos fatores abióticos (temperatura, umidade e precipitação) foram realizadas utilizando um modelo linear generalizado (GLM), para abundância e riqueza separadamente, em ambas as estações de experimento e, também foram testadas as influências na interação entre os fatores escolhidos. Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio do software PAST (Hammer *et al.*, 2001), levando em consideração $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padrão de decomposição das carcaças e ocorrência de dípteros associados. O teste de Kruskal-Wallis indicou que não houve diferenças significativas ($p = 0,79$) entre as três carcaças suínas utilizadas nos estudos no que diz respeito à diversidade de insetos em cada estágio de decomposição (figura S1 em Material Suplementar). A análise de ordenação (NMDS) também demonstrou que não há diferença significativa ($p = 0,63$) na composição de espécies entre as carcaças suínas expostas (figura S2 em

Material Suplementar). Dessa forma, os dados foram agrupados para desenvolvimento das demais análises.

Foram adotados os estágios propostos por Reed (1958), sendo eles: fresco, gasoso, avançado e seco. O padrão da decomposição registrado neste estudo é semelhante ao de outros conduzidos em ambientes Neotropicais, independente da classificação dos estágios adotada pelos autores, concordando com o que fora observado por Vasconcelos e colaboradores (2013). A duração dos estágios de decomposição das carcaças expostas foi mais longa na estação fria e úmida (34 dias de duração), fato que pode estar relacionado às variações ambientais, principalmente da alta umidade e baixa insolação que promoveram um prolongamento na duração dos estágios. Assim como foi observado por Archer (2004), em carcaças de suínos neonatais, a combinação da chuva com a umidade do solo pode retardar a decomposição, fato que foi observado durante o estágio avançado da decomposição, que se prolongou por 17 dias, tendo também apresentado o maior registro de precipitação (104,6 mm) (apêndice 4). Enquanto no mês de janeiro a decomposição foi mais rápida (10 dias), devido às altas temperaturas observadas (tabela 1) que contribuem para acelerar os processos químicos e físicos que ocorrem na carcaça (Campobasso *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2016). Além disso, a alta atividade de imaturos de dípteros no interior do corpo contribuiu para a rápida decomposição da matéria orgânica, como assinalado por Campobasso *et al.* (2001).

Tabela 1: Abundância de dípteros necrófagos coletados em carcaças suínas expostas relacionada as temperaturas e umidades relativas médias, e duração dos estágios de decomposição (I – fresco, II – gasoso, III – avançado e IV – seco), em duas estações, na região Sul do Brasil.

Experimento	Janeiro (quente/seca)				Setembro (fria/úmida)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Estágios de decomposição								
Tempo de duração (dias)	1	2	3	4	3	6	17	8
Temperatura média (°C)	26,5	24,5	29,4	36,6	18	19,7	19,6	19
Umidade relativa média (%)	71	81	53	40	85	78	78	76
Anthomyiidae	0	0	0	0	0	4	9	0
Calliphoridae	0	216	74	0	30	410	108	43
Fanniidae	5	143	7	2	278	3.132	4.047	696
Muscidae	0	32	48	2	67	222	408	81
Sarcophagidae	8	156	97	21	44	511	834	179
Total	13	547	226	25	419	4279	5406	999

Um total de 15.906 indivíduos foi amostrado nos experimentos, sendo 11.914 coletados com frascos mortíferos e armadilhas *pitfall*, e 3.992 emergiram após completar seu desenvolvimento nos frascos plásticos. Os espécimes estão distribuídos em cinco famílias (Anthomyiidae, Calliphoridae, Fanniidae, Muscidae e Sarcophagidae) e 78 espécies. Os representantes dos táxons aqui observados apresentam-se como dominantes em estudos forenses em toda região Neotropical (Souza & Linhares,

1997; Carvalho & Linhares, 2001; Battán-Horenstein *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2016). A rápida colonização das carcaças por dípteros necrófagos é atribuída à habilidade dessas espécies em localizar recursos efêmeros (Campobasso *et al.*, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2016). A riqueza de espécies necrófagas observada no estudo (S = 78) é superior a outros experimentos semelhantes (Vasconcelos *et al.*, 2016 – 50 spp.; Vasconcelos *et al.*, 2013 – 28spp.; Souza *et al.*, 2008 – 20spp.; Battán-Horenstein *et al.*, 2010 – 24spp.; Rosa *et al.*, 2009 – 14 spp.). As moscas necrófagas das famílias acima citadas foram mais abundantes no estágio de decomposição avançado (tabela 1), no entanto a maior abundância (11.103) e diversidade (S = 74) foi registrada na estação fria e úmida (tabela 2).

Tabela 2: Abundância absoluta (n) e abundância relativa (%) de dípteros coletados em carcaças de suínos expostos ao ambiente rural em duas estações (quente/seca e fria/úmida) na região Sul do Brasil.

Taxa	Estações				n (%)
	Quente/Seca		Fria/Úmida		
	n	(%)	n	(%)	
Anthomyiidae	0	0	13	0,12	13 (0,11)
<i>Anthomyia punctipennis</i> Wiedemann, 1830	0	0	12	0,1	12 (0,10)
<i>Anthomyia</i> sp.	0	0	1	0,01	1 (0,01)
Calliphoridae	290	35,75	591	5,32	881 (7,39)
<i>Calliphora lopesi</i> Mello, 1962	2	0,24	9	0,08	11 (0,09)
<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1830)	220	2,71	41	0,37	261 (2,19)
<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)	14	1,72	4	0,03	18 (0,15)
<i>Chrysomya putoria</i> (Wiedemann, 1818)	18	2,21	9	0,08	27 (0,22)
<i>Cochliomyia hominivorax</i> (Coquere!, 1858)	1	0,12	8	0,07	9 (0,07)
<i>Cochliomyia macellaria</i> (Fabricius, 1775)	24	2,95	70	0,63	94 (0,79)
<i>Hemilucilia segmentaria</i> (Fabricius, 1775)	0	0	20	0,18	20 (0,16)
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> (Rondani, 1850)	1	0,12	1	0,01	2 (0,01)
<i>Lucilia eximia</i> (Wiedemann, 1819)	10	1,23	429	3,86	439 (3,68)
Fanniidae	157	19,35	8.153	73,43	8.310 (69,74)
<i>Fannia</i> (subgrupo) <i>pusio</i>	10	1,23	71	0,64	81 (0,68)
<i>Fannia femoralis</i> (Stein, 1898)	1	0,12	1	0,01	2 (0,01)
<i>Fannia heydenii</i> (Weidemann, 1830)	5	0,61	187	1,68	192 (1,61)
<i>Fannia obscurinervis</i> Stein, 1900	2	0,24	45	0,4	47 (0,39)
<i>Fannia penicillaris</i> (Stein, 1900)	0	0	21	0,19	21 (0,17)
<i>Fannia</i> sp. 1	2	0,24	92	0,83	94 (0,79)
<i>Fannia</i> sp. 2	3	0,36	18	0,16	21 (0,17)
<i>Fannia tumidifemur</i> Stein, 1911	4	0,49	62	0,55	66 (0,55)
<i>Fannia yenhedi</i> Albuquerque, 1957	3	0,36	33	0,29	36 (0,30)
Fanniidae spp. * ¹	95	11,71	6.477	58,37	6.572 (55,20)
Fanniidae spp. * ²	32	3,94	1.146	10,32	1.178 (9,89)

Tabela 2. Continuação

Taxa	Estações				n (%)
	Quente/Seca		Fria/Úmida		
	n	(%)	n	(%)	
Muscidae	82	10,11	778	7	860 (7,22)
<i>Biopyrellia bipuncta</i> (Wiedemann, 1830)	0	0	5	0,04	5 (0,04)
<i>Bitharacochaeta</i> sp.	0	0	3	0,02	3 (0,02)
<i>Brontaea normata</i> (Bigot, 1885)	2	0,24	3	0,02	5 (0,04)
<i>Coenosini</i> sp.	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Cordiluroides</i> sp.	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Cyrtoneurina</i> sp.	1	0,12	3	0,02	4 (0,03)
<i>Dolichophaonia</i> sp.	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Graphomya</i> sp.	0	0	8	0,07	8 (0,06)
<i>Helina</i> sp.	0	0	3	0,02	3 (0,02)
<i>Limnophora</i> sp. 1	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Limnophora</i> sp. 2	0	0	2	0,02	2 (0,01)
<i>Micropotamia</i> sp.	0	0	6	0,05	6 (0,05)
<i>Morellia humerallis</i> (Stein, 1918)	0	0	49	0,44	49 (0,41)
<i>Morellia</i> sp.	1	0,12	17	0,15	18 (0,15)
<i>Morellia violacea</i> (Robineau-Desvoidy, 1830)	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Musca domestica</i> Linnaeus, 1758	40	4,93	33	0,3	73 (0,61)
Muscidae spp.	1	0,12	27	0,24	28 (0,23)
<i>Mydaea</i> sp.	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Myospila</i> sp.	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Neodexiopsis</i> sp.	0	0	10	0,09	10 (0,08)
<i>Neomuscina</i> sp.	0	0	14	0,12	14 (0,11)
<i>Ophyra aenescens</i> (Wiedemann, 1830)	26	3,2	151	1,36	177 (1,48)
<i>Ophyra albuquerquei</i> Lopes, 1985	4	0,49	9	0,08	13 (0,11)
<i>Ophyra solitaria</i> Albuquerque, 1958	0	0	73	0,65	73 (0,61)
<i>Ophyra</i> sp.	5	0,61	47	0,42	52 (0,43)
<i>Pseudoptilolepis</i> sp.	0	0	6	0,05	6 (0,05)
<i>Psilochaeta pampiana</i> (Shannon & Del Ponte, 1926)	0	0	3	0,02	3 (0,02)
<i>Stomoxys calcitrans</i> (Linnaeus, 1758)	2	0,24	299	2,69	301 (2,52)
Sarcophagidae	282	34,77	1.568	14,12	1.850 (15,53)
<i>Helicobia aurescens</i> (Townsend, 1927)	4	0,49	1	0,01	5 (0,04)
<i>Microcerella halli</i> (Engel, 1931)	3	0,36	79	0,71	82 (0,69)
<i>Microcerella</i> sp.	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Nephochaetopteryx cyaniventris</i> Lopes, 1936	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Oxysarcodexia admixta</i> (Lopes, 1933)	0	0	48	0,43	48 (0,40)
<i>Oxysarcodexia avuncula</i> (Lopes, 1933)	1	0,12	6	0,05	7 (0,06)
<i>Oxysarcodexia confusa</i> Lopes, 1946	0	0	2	0,02	2 (0,01)
<i>Oxysarcodexia culmiforceps</i> Dodge, 1966	45	5,54	248	2,23	293 (2,46)
<i>Oxysarcodexia parva</i> Lopes, 1946	0	0	2	0,02	2 (0,01)
<i>Oxysarcodexia paulistanensis</i> (Mattos, 1919)	7	0,86	106	0,95	113 (0,95)
<i>Oxysarcodexia riograndensis</i> Lopes, 1946	4	0,49	53	0,47	57 (0,48)
<i>Oxysarcodexia</i> sp.	1	0,12	0	0	1 (0,01)
<i>Oxysarcodexia thornax</i> (Walker, 1849)	9	1,11	143	1,29	152 (1,27)
<i>Oxysarcodexia varia</i> (Walker, 1836)	0	0	2	0,02	2 (0,01)
<i>Oxysarcodexia xanthosoma</i> Aldrich, 1916	0	0	9	0,08	9 (0,07)

Tabela 2. Continuação

Taxa	Estações				n (%)
	Quente/Seca		Fria/Úmida		
	n	(%)	n	(%)	
Sarcophagidae (continuação)					
<i>Peckia (Euboettcheria) australis</i> (Fabricius, 1805)	0	0	10	0,09	10 (0,08)
<i>Peckia (Euboettcheria) collusor</i> (Curran & Walley, 1934)	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Peckia (Euboettcheria) florencioi</i> (Prado & Fonseca, 1932)	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Peckia (Euboettcheria) koehleri</i> (Blanchard, 1939)	0	0	1	0,01	1 (0,01)
<i>Peckia (Pattonella) resona</i> Lopes, 1935	0	0	3	0,02	3 (0,02)
<i>Peckia (Peckia) chrysostoma</i> (Wiedemann, 1830)	1	0,12	4	0,03	5 (0,03)
<i>Peckia</i> spp.	2	0,24	0	0	2 (0,01)
<i>Ravinia advena</i> (Walker, 1853)	3	0,36	15	0,13	18 (0,15)
<i>Ravinia belforti</i> (Rondani, 1875)	12	1,48	30	0,27	42 (0,35)
Sarcophagidae spp. * ¹	182	22,44	673	6,06	855 (7,18)
Sarcophagidae spp. * ²	6	0,74	128	1,15	134 (1,12)
<i>Tricharaea (Sarcophagula) canuta</i> (Wulp, 1896)	1	0,12	0	0	1 (0,01)
<i>Tricharaea (Sarcophagula) occidua</i> (Fabricius, 1794)	1	0,12	1	0,01	2 (0,01)
Total	811	100	11.103	100	11.914
Total de espécies	43		74		77

*¹, fêmeas; *², machos

Fanniidae compreendeu 69,74% (8.310) dos insetos coletados, porém aproximadamente três- quartos (6.572) desses indivíduos não puderam ser identificados por limitações taxonômicas. Não foram observados indivíduos da família se desenvolvendo na carcaça (tabela 3). Contudo, a presença da família associada a carcaças expostas reforça o seu potencial associado a estudos forenses, uma vez que Vasconcelos e colaboradores (2014) abordaram o registro de indivíduos de *Fannia* associados a cadáveres humanos.

Sarcophagidae representou 15,53% (1.850) dos insetos adultos coletados. Contudo, assim como em Fanniidae, alguns indivíduos não puderam ser determinados no nível de espécie em função de impedimentos taxonômicos, abrangendo 989 indivíduos não identificados (entre machos e fêmeas). *Oxysarcodexia* é um dos gêneros que possui alta riqueza e abundância associada a carcaças no Brasil (Carvalho & Linhares, 2001, Barros *et al.*, 2008), tendo apresentando o maior número de espécies (11) entre os indivíduos representados em ambas as estações, assim como observado por Barros e colaboradores (2008), no bioma Cerrado. *Oxysarcodexia culmiforceps* Dodge, 1966 foi a espécie mais abundante nas duas estações. Embora os sarcófagídeos tenham apresentado alta riqueza entre os insetos atraídos, indivíduos foram observados utilizando a carcaça para completar seu desenvolvimento (estação quente/seca, n = 2; fria/úmida, n = 53) (tabela 3), representados por *Microcerella halli* e ainda um indivíduo que não teve sua identidade confirmada, exibindo um padrão sazonal, com preferência por condições mais amenas.

Tabela 3: Abundância absoluta (n) e abundância relativa (%) de dípteros criados em carcaças de suínos expostos ao ambiente rural em duas estações (quente/seca e fria/úmida) na região Sul do Brasil.

Taxa	Estações		n (%)
	Quente/Seca n (%)	Fria/Úmida n (%)	
Calliphoridae	1.427 (99,83)	1.976 (77,09)	3.403 (85,24)
<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1830)	1.416 (99,09)	1.509 (58,87)	2.925 (73,27)
<i>Chrysomya megacephala</i> (Fabricius, 1794)	6 (0,41)	12 (0,46)	18 (0,45)
<i>Chrysomya putoria</i> (Wiedemann, 1818)	2 (0,13)	3 (0,11)	5 (0,12)
<i>Hemilucilia segmentaria</i> (Fabricius, 1775)	0 (0)	44 (1,71)	44 (1,10)
<i>Lucilia eximia</i> (Wiedemann, 1819)	3 (0,2)	408 (15,91)	411 (10,29)
Muscidae	0 (0)	534 (20,83)	534 (13,37)
<i>Ophyra aenescens</i> (Wiedemann, 1830)	0 (0)	523 (20,40)	523 (13,10)
<i>Ophyra</i> spp.	0 (0)	11 (0,42)	11 (0,27)
Sarcophagidae	2 (0,13)	53 (2,06)	55 (1,37)
<i>Microcerella halli</i> (Engel, 1931)	1 (0,06)	50 (1,95)	51 (1,27)
Sarcophagidae spp.	1 (0,06)	3 (0,11)	4 (0,10)
Total	1.429	2.563	3.992
Total de espécies	6	9	9

Os califorídeos representaram 4.284 dos insetos adultos, na estação quente e seca, e foram dominantes nos estágios de decomposição iniciais, enquanto Sarcophagidae predominou nos estágios finais. Resultados similares foram observados por Monteiro-Filho & Penereiro (1987) e Carvalho & Linhares (2001) em área geográfica distinta. A exploração simultânea do recurso por famílias diferentes não indica necessariamente competição, visto que essas utilizam o recurso de forma diferente. Sarcófagídeos são ovovivíparos e depositam larvas capazes de se alimentar diretamente, enquanto o desenvolvimento dos califorídeos pode ser retardado em função do depósito de ovos que devem se desenvolver (Carvalho & Linhares, 2001).

Chrysomya albiceps foi uma das espécies mais abundantes coletadas (n = 261) e entre as que se criaram na carcaça (n = 2.925), sendo esta a espécie que utilizou de forma mais homogênea o recurso para completar seu desenvolvimento, tendo utilizado o substrato para completar seu desenvolvimento em ambas as estações de amostragens. Esse resultado pode estar relacionado a sua alta capacidade de dispersão e pelo seu hábito predador de outras larvas, sendo uma espécie cosmopolita e apresentando potencial para estimativa de tempo de morte em muitos países (Faria *et al.*, 2013). Contudo, *C. albiceps* não é considerada uma boa indicadora forense quanto à região (urbana ou natural), visto que diversos autores já registraram a presença da espécie associada a carcaças em ambos os ambientes (Carvalho & Linhares, 2001). A espécie exótica apresenta-se como dominante em estudos forenses (Carvalho & Linhares, 2001; Vasconcelos *et al.*, 2016). No experimento relativo a estação quente e seca, *C. albiceps* associou-se ao estágio avançado, assim como observado por Biavati e colegas (2010), no Cerrado, tal

fato pode estar associado ao odor emanado da ativa decomposição da matéria orgânica e da disponibilidade de alimento para os imaturos da espécie. Representantes do gênero *Chrysomya* também foram registrados por Souza & Linhares (1997) em Campinas, (SP) e, Cavalcante e colaboradores (2015), na Paraíba, (PB), associadas às carcaças de suínos. Battán-Horenstein e colaboradores (2010), na Argentina, observaram que nos meses quentes quando a abundância de *C. albiceps* era elevada, somente essa espécie emergia das carcaças, contudo em outros períodos, quando a abundância de adultos diminuía, outras espécies eram capazes de se desenvolver no recurso. Oliveira & Vasconcelos (2010), observaram a emergência de adultos de *C. albiceps* coletados de cadáveres, no Instituto Médico Legal de Pernambuco. Além disso, em contraponto ao que foi observado por Carvalho & Linhares (2001), em Campinas (SP), Calliphoridae (n = 881) apresentou menos espécimes coletados que outras famílias (tabela 1), e *C. albiceps* foi a espécie mais abundante coletada (n = 220) somente em janeiro. Na estação quente e seca os indivíduos de *C. albiceps* começaram a emergir após a finalização do experimento, 10 dias após a morte, mantendo a emergência de indivíduos até 25 dias após o início do experimento. Na estação fria e úmida, os primeiros adultos de *C. albiceps* emergiram somente 22 dias após a morte, e indivíduos de *L. eximia* demoraram mais de um mês para emergir. Altas temperaturas tendem a reduzir o tempo de desenvolvimento de moscas (Campobasso *et al.*, 2001), enquanto o atraso na oviposição na estação fria e úmida pode estar relacionado as temperaturas mais baixas, que tendem a diminuir a atividade de insetos.

Pertencente à mesma família e com elevada abundância para adultos coletados (n = 439) e imaturos criados nas carcaças (n = 411), observou-se *Lucilia eximia*, tendo sido coletada associada às carcaças na estação fria e úmida, desenvolvendo-se nas carcaças também durante o mês de setembro, estação úmida, resultado também observado por Rosa *et al.*, (2009) para o mesmo período estacional. Moura e colaboradores (1997) coletaram a espécie associada às carcaças de roedores no Paraná. Essa espécie é conhecida como um dos primeiros insetos a colonizar carcaças (Biavati *et al.*, 2010). Anthomyiidae apresentou poucos indivíduos (n = 13), com prevalência de *A. punctipennis* (tabela 2), tendo sido a espécie também observada associada a carcaças expostas em Recife (Vasconcelos *et al.*, 2013).

Muscidae obteve 7,21% (860) da abundância relativa total, com dominância de *Ophyra aenescens* (n = 177) nos indivíduos coletados. Essa espécie também utilizou o recurso para completar seu desenvolvimento, porém somente na estação fria e úmida, com a emergência de 523 adultos. Registrou-se a prevalência de adultos de *Stomoxys calcitrans* e *Ophyra aenescens* em setembro, enquanto que na estação quente e seca *Musca domestica* foi dominante. Somente *O. aenescens* utilizou a carcaça para desenvolver sua prole na estação mais fria e sua abundância representativa (n = 523) pode estar relacionada ao fato de que a espécie utiliza diversos substratos para seu desenvolvimento e suas larvas apresentam comportamento predador (d'Almeida *et al.*, 1999). É possível considerá-la como uma espécie indicadora forense para a estação fria na região, uma vez que em outros estudos a espécie

encontra-se associada a períodos mais quentes e secos (Battan-Horenstein *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2013).

Diversidade e fatores abióticos. Os menores índices de diversidade foram observados no estágio fresco ($H' = 0,96$) na estação quente e seca, assim como na fria e úmida ($H' = 1,46$), evidenciando o início da colonização pelos dípteros necrófagos. Os baixos valores de equitabilidade observados nos estágios gasoso e avançado ($J' = 0,7$) na estação quente e seca, e no estágio avançado ($J' = 0,45$) na estação fria e úmida (tabela 4), indicam que os indivíduos não estão distribuídos igualmente entre as espécies. Em contraponto, o estágio seco ($BP = 0,24$) da estação quente e, seco e gasoso ($BP = 0,30$) da estação fria e úmida apresentaram os maiores índices de dominância de Berger-Parker, baseados na dominância proporcional das espécies mais abundantes, ressaltando que esses estágios apresentam espécies com maior abundância de indivíduos (tabela 4).

Através das análises é possível observar que na estação quente/seca o estágio com maior diversidade de espécies é o gasoso com uma média de 260,5 insetos/dia, enquanto o menos diverso é o inicial (fresco), com 13 insetos/dia. Já na estação úmida e fria a maior diversidade continua sendo no estágio gasoso ($H' = 2,11$), apresentando uma média de 502 insetos/dia, contudo a menor diversidade ($H' = 1,51$) é observada no estágio seco. As comunidades de insetos na estação seca e quente apresentaram maior dissimilaridade entre os estágios fresco e avançado, indicando que a composição de espécies com relação a suas abundâncias foi mais diversificada (89,09%), enquanto a menor dissimilaridade foi observada entre os estágios gasoso e avançado (56,18%), apresentando uma composição menos diversa. Na estação subsequente (fria/úmida) o maior índice de dissimilaridade foi observado entre os estágios fresco e avançado (70,47%), e o menor (29,84%) foi compartilhado pelos estágios gasoso e avançado. As espécies mais abundantes na estação compreendida no mês de janeiro (quente/seca) foram *Oxysarcodexia culmiforceps*, *Chrysomya albiceps*, *Musca domestica* e *Ravinia belforti*, respectivamente para cada estágio de decomposição das carcaças (fresco, gasoso, avançado e seco). Em setembro foi observada uma composição diferente, com *Lucilia eximia* e *Stomoxys calcitrans* apresentando dominância nos estágios iniciais, e *S. calcitrans*, *O. culmiforceps* e *Fannia heydenii* indicando preferência pelos estágios finais da decomposição (tabela 4).

Tabela 4: Índices ecológicos médios de diversidade e dissimilaridade entre os estágios de decomposição das carcaças de suínos expostos na região Sul do Brasil, nas duas estações do ano (quente/seca e fria/úmida).

Quente/Seca				
	Fresco	Gasoso	Avançado	Seco
Maior dissimilaridade ^a	Seco (87,26)	Seco (79,18)	Fresco (89,09)	Fresco (87,26)
Menor dissimilaridade ^a	Gasoso (74,51)	Avançado (65,55)	Gasoso (56,18)	Avançado (73,84)
Riqueza (S)	3,33	28	14,67	4,33
Abundância (n)	5	222,67	99,67	10,67
Simpson (D')	0,53	0,84	0,78	0,66
Shannon (H')	0,96	2,31	1,87	1,25
Equitabilidade (J')	0,88	0,70	0,70	0,90
Berger-Parker (BP)	0,15	0,08	0,12	0,24
Espécies mais abundantes	<i>Oxysarcodexia culmiforceps</i>	<i>Chrysomya albiceps/ O. culmiforceps</i>	<i>C. albiceps/ Musca domestica</i>	<i>Ravinia belforti/ M. domestica</i>
Média insetos/dia	13	260,5	73	6

Fria/Úmida				
	Fresco	Gasoso	Avançado	Seco
Maior dissimilaridade ^a	Avançado (70,47)	Fresco (68,55)	Fresco (70,47)	Fresco (70,29)
Menor dissimilaridade ^a	Gasoso (60,39)	Avançado (41,73)	Gasoso (29,84)	Avançado (56,00)
Riqueza (S)	11,33	48,67	52,67	22
Abundância (n)	143,67	1465,67	1865	362
Simpson (D')	0,61	0,73	0,60	0,55
Shannon (H')	1,46	2,11	1,77	1,51
Equitabilidade (J')	0,61	0,54	0,45	0,52
Berger-Parker (BP)	0,11	0,30	0,27	0,05
Espécies mais abundantes	<i>Stomoxys calcitrans/ Lucilia eximia</i>	<i>Lucilia eximia/ S. calcitrans</i>	<i>O. culmiforceps/ S. calcitrans</i>	<i>O. culmiforceps/ Fannia heydenii</i>
Média insetos/dia	101	502	237	79,8

^a Bray-Curtis Dissimilaridade

Por meio da ANOVA de dois fatores, observou-se que houve diferenças significativas na riqueza média (S) e abundância média (n) entre as estações estudadas (S: $F_{1,23} = 66,06$; $p < 0,001$ / n: $F_{1,23} = 71,10$; $p < 0,001$) e entre os estágios de decomposição (S: $F_{3,23} = 34,23$; $p < 0,001$ / n: $F_{3,23} = 19,48$; $p < 0,001$), sendo a interação entre os fatores, também, significativa (S: $F_{3,23} = 5,81$; $p = 0,007$ / n: $F_{3,23} = 13,51$; $p < 0,001$). Durante a estação compreendida no mês de janeiro (quente/seca) a riqueza foi significativamente maior no estágio gasoso do que no fresco (Tukey 6,724; $p = 0,004$) e seco (Tukey 6,45; $p = 0,006$). Já na estação fria e úmida foi visualizado um maior número de espécies nos estágios gasoso do que nos estágios fresco (Tukey: 10,18, $p < 0,001$) e seco (Tukey 2,908; $p = 0,002$). O mesmo foi observado entre o avançado e fresco (Tukey 11,27, $p < 0,001$) e seco (Tukey 8,350; $p < 0,001$). Com relação ao número de espécimes, na estação seca e quente não houve diferenças significativas (figura 1). Contudo, no mês de setembro, a abundância registrada foi significativamente maior entre os estágios gasoso do que fresco (Tukey 9,012; $p < 0,001$) e seco (Tukey 7,524; $p = 0,001$), e avançado do que fresco (Tukey 11,73; $p < 0,001$) e seco (Tukey 10,25; $p < 0,001$), sendo os estágios gasoso e avançado

significativamente maiores em setembro do que em janeiro (figura 1). O aumento observado na riqueza e abundância de moscas nos períodos intermediários da decomposição (gasoso e avançado) já foi relatado por outros autores (Carvalho & Linhares, 2001) evidenciando a importância desses insetos no consumo da carcaça e consequentemente sua importância forense.

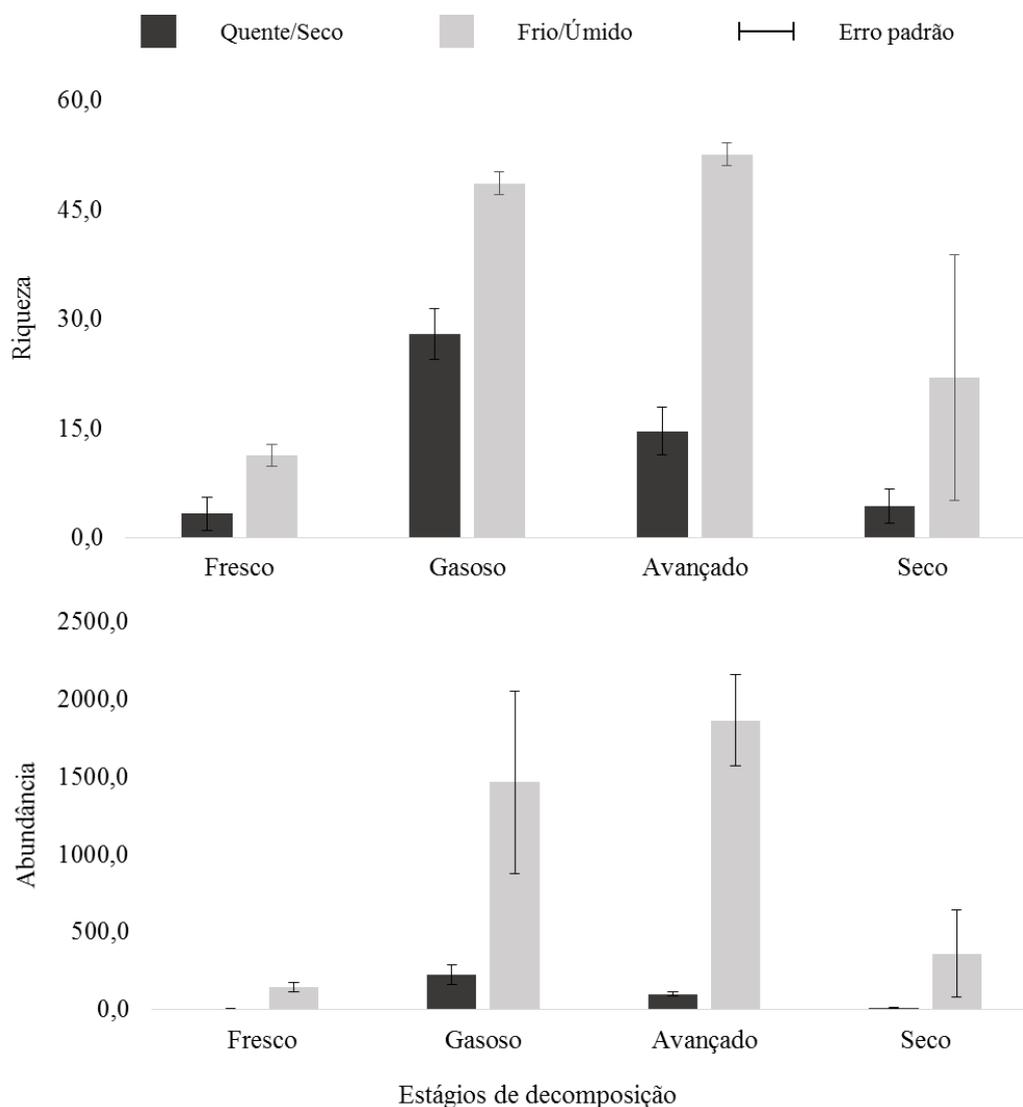


Figura 1: Relações de riqueza e abundância de espécies de Diptera associados a carcaças de suíno em decomposição em ambiente rural nas estações quente/seca e fria/úmida, respectivamente em janeiro e setembro 2014 e, os estágios de decomposição das carcaças (as barras representam o erro padrão).

A análise de Permanova mostrou claras diferenças na composição entre os meses ($F_{1,23} = 6,17$; $p = 0,0001$) e, entre os estágios de decomposição ($F_{3,23} = 2,06$; $p = 0,008$), contudo a interação dos fatores não foi significativa ($F_{3,23} = 1,43$, $p = 0,10$). Para o fator *estação* a composição de espécies do experimento frio/úmido foi diferente do quente/seco, enquanto para os *estágios de decomposição* as diferenças foram evidenciadas principalmente entre o estágio fresco (Tukey = 0,01) e gasoso (Tukey = 0,01). A análise de correspondência entre os estágios de decomposição das carcaças e a presença das

espécies associadas revelou na estação quente/seca associação entre *Chrysomya albiceps* e o estágio avançado e, entre *Ravinia belforti* e o estágio seco e, enquanto na estação fria e úmida *Fannia* sp. 1 e *Stomoxys calcitrans* estão associados ao estágio fresco e *F. heydeni* ao seco (figura 2), ordenando-se nos dois primeiros eixos, que somaram 30% da variância total dos dados, enfatizando o que foi registrado de acordo com os índices de diversidade e espécies mais abundantes por estação e estágios de decomposição, evidenciando claramente a separação entre as estações do ano no que diz respeito a composição de espécies. As espécies *L. eximia* e *C. macellaria* estão associadas as estações fria/úmida e quente/seca, respectivamente, contudo não apresentaram preferência por nenhum estágio de decomposição.

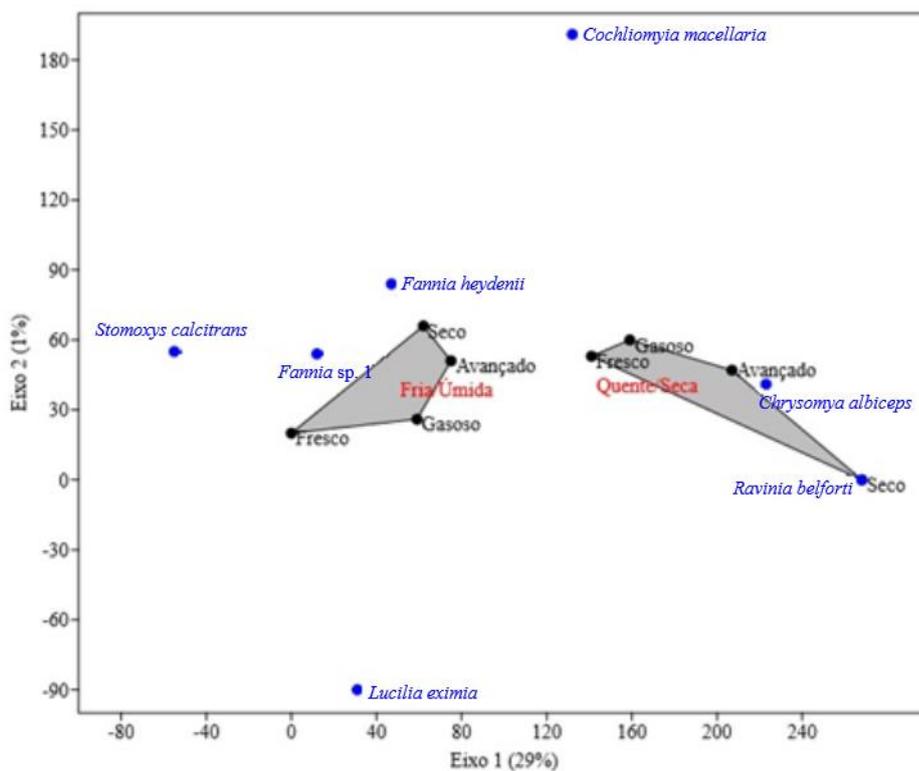


Figura 2: Análise de correspondência entre espécies de insetos indicadoras e fases de decomposição (em azul – Fresco, Gasoso, Avançado e Seco) em carcaças suínas, nas duas estações (em vermelho – quente/seca; fria/úmida) coletadas em ambiente rural no Sul do Brasil.

No mês de janeiro, relativo a estação seca e quente, a temperatura média foi de 31,3 °C ($\pm 4,4$ °C), umidade relativa de 55,3% ($\pm 14,7\%$) e apresentou precipitação acumulada de 13,1 mm durante os 10 dias relativos ao processo de decomposição da carcaça. No experimento realizado no mês de setembro (frio e úmido) a temperatura média foi de 19,3 °C com menor variação ($\pm 1,9$ °C), umidade relativa média de 78,4% ($\pm 5,9\%$) e chuva acumulada na estação de 161,4 mm, totalizando 34 dias de decomposição total das carcaças. De forma a explicar a variação da riqueza e abundância total entre os dias de estudo,

foram testados sete modelos diferentes com os fatores abióticos. Três dos sete modelos foram significantes para explicar os padrões observados nas espécies de moscas. A temperatura e a umidade foram negativamente relacionadas à riqueza total e à abundância (tabela 5). Contudo, os modelos representando a interação entre esses fatores abióticos foram positivamente relacionados com a riqueza ($z = 3,98$; $p < 0,001$) e abundância ($z = 10,97$; $p < 0,001$). Para a precipitação não foram observadas significâncias (tabela 5).

Tabela 5: Efeito de fatores abióticos sobre a riqueza de espécies e abundância total de moscas associadas a carcaças de suínos em ambiente rural, em duas estações (quente/seca e fria/úmida) no Sul do Brasil.

		Riqueza	Abundância
Temperatura	Z	-4,36	-12,99
	p	<0,001	<0,001
Umidade	Z	-3,36	-5,84
	p	<0,001	<0,001
Precipitação	Z	-0,95	0,85
	p	0,33	0,39
Temperatura e Umidade	Z	3,98	10,97
	p	<0,001	<0,001
Temperatura e Precipitação	Z	0,67	0,62
	p	0,49	0,53
Umidade e Precipitação	Z	0,94	-0,46
	p	0,34	0,64
Todos os fatores	Z	-0,64	-1,34
	p	0,52	0,18

Valores estatisticamente significativos representados em negrito ($p < 0,01$).

Dessa forma, é possível concluir que a composição e abundância da fauna relacionada à carcaça foram influenciadas pelas condições ambientais, em especial no que diz respeito a temperatura e umidade, conjuntamente. A duração de cada experimento e as temperaturas registradas, também são fatores que influenciaram na composição de espécies (tabela 4). Baixas temperaturas (17°C) e alta umidade relativa média (78%) contribuíram para elevada abundância ($n = 11.103$) registrada na estação fria e úmida (tabela 4), assim como a duração de cada estágio de decomposição ter se prolongado o recurso.

Os resultados referentes ao experimento da estação quente e seca diferem de outros estudos, uma vez que a máxima temperatura (37,1°C) registrada e a baixa abundância de moscas necrófagas ($n = 811$) difere de outros experimentos realizados na região Neotropical no mesmo período estacional (Battán-Horenstein *et al.*, 2010). Contudo, nesse experimento foi registrada a maior emergência de adultos dos imaturos coletados e a decomposição durou somente dez dias. O fato de a carcaça ter se decomposto

mais rapidamente na estação quente e seca está relacionado ao rápido aumento da atividade de insetos (adultos e imaturos), principalmente nas fases gasosa e avançada, acelerando o processo de decomposição, reduzindo a carcaça rapidamente a restos. Além disso, como observado por Centeno e colegas (2002) e Battán-Horenstein e colaboradores (2010), a insolação apresenta influência substancial no processo de decomposição, e visto que a estação quente e seca apresentou dias sem chuva e altas temperaturas, as carcaças foram rapidamente reduzidas a ossos. Evidenciando a influência da interação entre os fatores abióticos estudados.

Foi possível concluir que as espécies consideradas de relevância forense para estudos no âmbito legal na região de estudo, devido ao fato de terem utilizado o recurso para completarem seu desenvolvimento, foram *C. megacephala* na estação quente e seca; *Hemilucilia segmentaria*, *Lucilia eximia*, *Ophyra aenescens* e *Microcerella halli* para a estação fria e úmida; e *C. albiceps* para as duas estações. *Stomoxys calcitrans*, *F. heydenni* e *R. belforti* podem apresentar potencial relevância forense, devido a sua abundância, dominância e padrão de ocupação temporal durante a decomposição. Os resultados apresentados destacam a importância da avaliação da abundância e diversidade de moscas necrófagas associadas a carcaças expostas em diferentes regiões geográficas e sob influência de fatores abióticos.

AGRADECIMENTOS

À Taís Madeira pelo auxílio na identificação dos sarcófagídeos, ao Dr. Claudio JB Carvalho pela ajuda na identificação de muscídeos e fanídeos, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo à primeira autora.

CONFORMIDADE COM OS PADRÕES ÉTICOS

Os estudos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal e, foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o registro 13/00369.

REFERÊNCIAS

- Archer, M.S. (2004) Rainfall and temperature effects on the decomposition rate of exposed neonatal remains. *Science & Justice*, **44**, 35-41.
- Barros, R.M., Mello-Patiu, C.A. & Pujol-Luz, J.R. (2008) Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **52**, 606-609.
- Battán-Horenstein, M., Linhares, A.X., Ferradas, B.R. & García, D. (2010) Decomposition and dipteran succession in pig carrion in central Argentina: ecological aspects and their importance in forensic science. *Medical and Veterinary Entomology*, **24**, 16-25.
- Biavati, G.M., Santana, F.H.A. & Pujol-Luz, J.R. (2010) A checklist of calliphoridae blowflies (Insecta, Diptera) associated with a pig carrion in Central Brazil. *Journal of Forensic Sciences*, **55**, 1603-1606.
- Bray, J.R. & Curtis, J.T. (1957) An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, **27**, 325-349.
- Byrd, J.M. & Castner, J.L. (2010) *Forensic Entomology: Utility of Arthropods in Legal Investigations*. CRC Press, Boca Raton.
- Campobasso, C.P.G., Vella, D. & Introna, F. (2001) Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Science International*, **120**, 18-27.
- Carvalho, C.J.B. (2002) *Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: Taxonomy*. Editora UFPR, Curitiba.
- Carvalho, C.J.B. & Mello-Patiu, C.A. (2008) Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, **52**, 390-406.
- Carvalho, C.J.B., Moura, M.O. & Ribeiro, P.B. (2002) Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **46**, 107-114.
- Carvalho, C.J.B., Rafael, J.A., Couri, M.S. & Silva, V.C. Diptera (2012) *Insetos do Brasil. Diversidade e Taxonomia*. pp. 701-743. Ed. Fapeam/Holos, Ribeirão Preto.
- Carvalho, C.J.B. & Ribeiro, P.B. (2000) Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, **9**, 169-173.
- Carvalho, L.M.L. & Linhares, A.X. (2001) Seasonality of insects succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. *Journal of Forensic Science*, **46**, 604-608.

- Carvalho, L.M.L., Linhares, A.X., Thyssen, P.J. & Palhares, F.A.B. (2000) A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Memórias da Fundação Oswaldo Cruz*, **95**, 135-138
- Catts, E.P. & Goff, M.L. Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, **37**, 253-272.
- Cavalcante, A.N.P., Dal-Bó, D., Creão-Duarte, A.J. & Azevedo, R.C. (2015) Espécies de Calliphoridae (Diptera) associadas a carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus, 1758 em área de restinga na Paraíba, Brasil, e espécies de importância forense para a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM). *Entomotropica*, **30**, 150-159.
- Centeno, N., Maldonado, M. & Oliva, A. (2002) Seasonal patterns of arthropods occurring on sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). *Forensic Science International*, **126**, 63-70.
- d'Almeida, J.M., Borges, C. & Gonçalves, C.A. (1999) Desenvolvimento pós-embrionário de *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Muscidae) em diferentes dietas, sob condições de laboratório. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **94**, 123-126.
- Faria, L.S., Paseto, M.L., Franco, F.T., Perdigão, V.C., Capel, G. & Mendes J. (2013) Insects breeding in pig carrion in two environments of a rural area of the state of Minas Gerais, Brazil. *Neotropical Entomology*, **42**, 216-222.
- Ferraz, A.C.P., Gadelha, B.Q. & Aguiar-Coelho, V.M. (2009) Análise faunística de Calliphoridae (Diptera) da Reserva Biológica do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Entomologia*, **53**, 620-628.
- Hammer, Ř., Harper, D.A.T. & Ryan, P.D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, **4**, 9pp. Disponível em <http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>.
- Hanski, I. (1987) Nutritional ecology of dung-and carrion-feeding insects. *Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates*. pp. 834-887. John Wiley & Sons, New York.
- Hill, M.O. & Gauch, H.G. (1980) Detrend correspondence analysis, an improved ordination technique. *Vegetatio*, **42**, 47-58.
- (INMET) Instituto Nacional de Meteorologia. (2012) Dados Climatológicos. Disponível em <http://www.inmet.gov.br/portal/>

- Introna, F., Campobasso, C.P. & Goff, M.L. (2001) Entomototoxicology. *Forensic Science International*, **120**, 42-47.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W. (1993) *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot.
- Keh, B. (1985) Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Reviews of Entomology*, **30**, 137-151.
- Ludwig, J.A. & Reynolds, J.F. (1988) *Statistical Ecology: a primer on methods and computing*. John Wiley & Sons, New York.
- Marchenko, M.I. (2001) Medico legal relevance of cadaver entomofauna for the determination of time of death. *Forensic Science International*, **120**, 89-109.
- Monteiro-Filho, E.L.A. & Penereiro, J.L. (1987) Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, **47**, 289-295.
- Moura, M.O., Carvalho, C.J.B. & Monteiro-Filho, E.L.A. (1997) A preliminar analysis of insects of Medico-Legal importance in Curitiba, state of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**, 269-274.
- Nering, M.B. & Von Zuben, C.J. (2010) Métodos quantitativos em Parasitologia. Funep, Jaboticabal.
- Norris, K.R. (1965) The bionomics of blow flies. *Annual Review of Entomology*, **10**, 47-68.
- Nuorteva, P. (1963) Synanthropy of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Finland. *Annales Entomologici Fennici*, **29**, 1-49.
- Oliveira, T.C. & Vasconcelos, S.D. (2010) Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: implications for forensic entomology. *Forensic Science International*, **198**, 97-102.
- Primack, R.B. & Rodrigues, E. (2001) *Biologia da conservação*. Editora Planta, Londrina.
- Reed, H.B. (1958) A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. *The American Midland Naturalist*, **59**, 213-245.
- Rocha, R.R., Mello-Patiu, C.A., Mello, R.P. & Carvalho, M.M. (2009) New records of calyptrate dipterans (Fanniidae, Muscidae and Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**, 923-926.
- Rosa, T.A., Babata, M.L.Y., Souza, C.M., Sousa, D., Mello-Patiu, C.A. & Mendes, J. (2009) Dípteros de interesse forense em dois perfis de vegetação de Cerrado em Uberlândia, MG. *Neotropical Entomology*, **38**, 859-866.

- Smith, K.G.V. (1986) *A manual of forensic entomology*. British Museum, London.
- Souza, A.M. & Linhares, A.X. (1997) Diptera and Coleoptera of potencial forensic importance in Southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Medical and Veterinary Entomology*, **11**, 8-12.
- Souza, A.S.B., Kirst, F.D. & Krüger, R.F. (2008) Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul state in southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **52**, 641-646.
- Vasconcelos, S.D., Cruz, T.M., Salgado, R.L. & Thyssen, P.J. (2013) Dipterans associated with a decomposing animal carcass in a rainforest fragment in Brazil: notes on the early arrival and colonization by necrophagous species. *Journal of Insect Science*, **13**, 1-11.
- Vasconcelos, S.D., Salgado, R.L., Barbosa, T.M. & Souza, J.R.B. (2016) Diptera of Medico-Legal importance associated with pig carrion in a Tropical Dry Forest. *Journal of Medical Entomology*, **53**, 1131-1139.
- Vasconcelos, S.D., Soares, T.F. & Costa, D.L. (2014) Multiple colonization of a cadaver by insects in an indoor environment: first record of *Fannia trimaculata* (Diptera: Fanniidae) and *Peckia (Peckia) chrysostoma* (Sarcophagidae) as colonizers of a human corpse. *International Journal of Legal Medicine*, **128**, 229-233.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura S1: Diversidade de Shannon (H') observada entre as três carcaças de suínos expostas, nas duas estações, em Porto Alegre, RS ($X^2 = 0,46$; $p = 0,79$) (as barras representam o erro padrão).

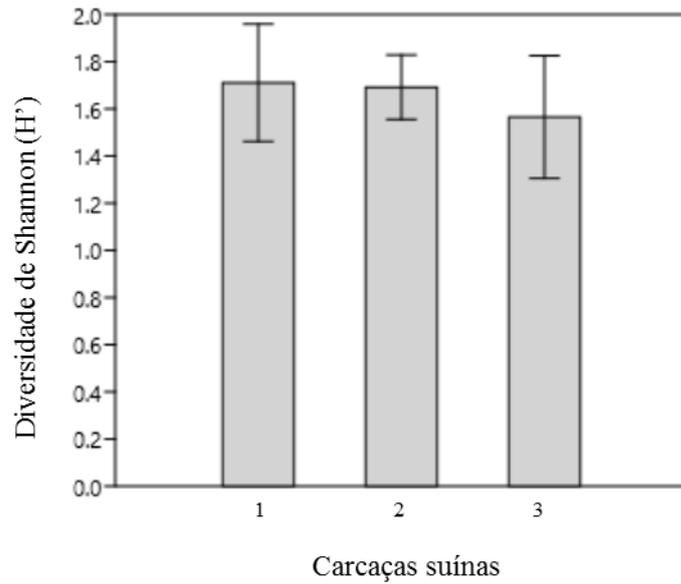
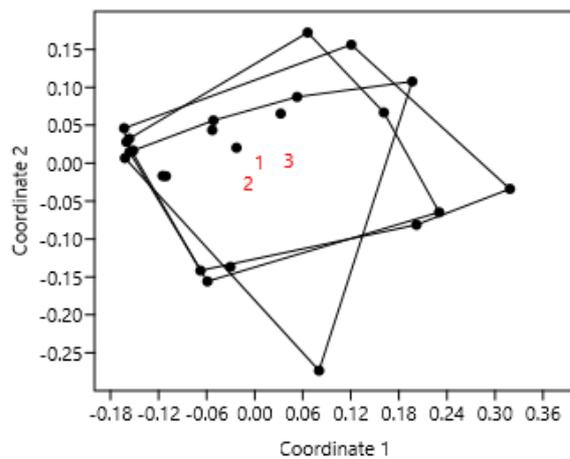


Figura S2: Análise de ordenação não-métrica (NMDS) entre as amostras das três carcaças (1,2,3) suínas expostas, nas duas estações, em Porto Alegre, RS.



CAPÍTULO II

Coleópteros (Arthropoda: Insecta) associados a carcaças em decomposição no Sul do Brasil: a influência de fatores bióticos e abióticos sobre a abundância e diversidade de espécies

Manuscrito redigido conforme normas indicadas pelo periódico Journal of Medical Entomology

1 Ries et al.: Coleoptero fauna do Sul do Brasil

2

3

4 Journal of Medical Entomology

5 Direct Injury, Myiasis, Forensic

6

7

8

9

10 **Coleópteros (Arthropoda: Insecta) associados a carcaças em**
11 **decomposição no Sul do Brasil: a influência de fatores**
12 **bióticos e abióticos sobre a abundância e diversidade de**
13 **espécies**

14

15

16 A. C. Ries, V. Costa-Silva, C. F. Santos, B. Blochtein and P. J. Thyssen

17

18

19

20

21

22

23

24

A. C. Ries

Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul (PUCRS)

Av. Ipiranga, 6681

CEP: 90619-900

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: 55 51 33534376

Email: anacarolinaries@hotmail.com

25 **Coleópteros (Arthropoda: Insecta) associados a carcaças em**
26 **decomposição no Sul do Brasil: a influência de fatores bióticos e**
27 **abióticos sobre a abundância e diversidade de espécies**

28 Ana Carolina Reimann Ries ¹; Vinícius da Costa-Silva ²; Charles Fernando dos Santos ¹; Betina
29 Blochtein ¹; Patrícia Jacqueline Thyssen ²

30 (1) Departamento de Biodiversidade e Ecologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
31 do Sul (PUCRS), Rio Grande do Sul

32 (2) Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São
33 Paulo
34

35 **RESUMO** A Ordem Coleoptera é a mais abundante dentre todos os animais, apresentando os mais
36 diversos hábitos alimentares, incluindo a necrofagia. Por essa razão podem ser relevantes no âmbito
37 forense para estimar o tempo de morte. As dimensões continentais, diferenças climáticas entre regiões
38 e presença de diversos biomas no Brasil refletem em alta diversidade, incluindo insetos associados a
39 carcaças. O objetivo deste estudo foi determinar a influência de fatores abióticos e bióticos na
40 composição de besouros colonizadores de carcaças no sul do Brasil. As amostras foram coletadas em
41 duas estações, uma quente/seca e outra fria/úmida em uma área de Porto Alegre, RS, Brasil, a partir de
42 carcaças de três suínos abatidos por disparo de arma de fogo e imediatamente dispostos em gaiolas
43 metálicas. Insetos foram coletados diariamente com frascos mortíferos e *pitfall*, totalizando 415
44 indivíduos de 56 espécies. A diversidade de besouros foi maior na estação fria/úmida ($S = 51$), com
45 predomínio de *Dermestes maculatus* (Dermestidae), *Euspilotus azureus* (Histeridae) e *Oxelytrum*
46 *discicolle* (Silphidae), representando respectivamente 30,89%, 19,10% e 9,87% dos insetos amostrados.
47 Na estação quente-seca foram coletadas 22 espécies e os táxons predominantes foram *Chaetocnema* spp.
48 (Chrysomelidae) e *Necrobia rufipes* (Cleridae). Comparando ambas as estações, verifica-se que a
49 colonização das carcaças pelos besouros foi distinta, possivelmente devido à influência de fatores
50 bióticos e abióticos. A composição de espécies observada difere de outras pesquisas no Brasil, pois a
51 maior abundância e diversidade ocorreram na estação fria-úmida. Estes resultados apontam para a
52 importância dos estudos entomológicos forenses regionais, em virtude das diferenças na decomposição
53 das carcaças e composição faunística.

54 **PALAVRAS-CHAVE:** insetos necrófagos, ecologia da decomposição, intervalo pós-morte, espécies
55 neotropicais, entomologia forense.

56

57

58

59 **ABSTRACT** The Coleoptera Order is the most abundant of all animals, presenting the most diverse
60 eating habits, including necrophagia. For that reason, they may be relevant in the forensic scope to
61 estimate the time of death. The continental dimensions, climatic differences between regions and the
62 presence of several biomes in Brazil reflect in high diversity including insects associated with carcasses.
63 The aim of this study was to determine the influence of abiotic and biotic factors in the composition of
64 beetles colonizing carcasses in southern Brazil. The samples were collected in two seasons, one hot/dry
65 and the other cold/wet in an area of Porto Alegre, Brazil. Three pigs shot by firearm were used and
66 immediately placed in metal cages. Samples were collected daily with lethal bottles and *pitfall*, totaling
67 415 individuals from 56 species. Beetle diversity was higher in the cold/wet season ($S = 51$), with
68 predominance of *Dermestes maculatus* (Dermestidae), *Euspilotus azureus* (Histeridae) and *Oxelytrum*
69 *discicolle* (Silphidae), respectively representing 30.9%, 19.1% and 9.8% of the insects sampled. In the
70 hot/dry season 22 species were sampled, and the predominant taxa were *Chaetocnema* spp.
71 (Chrysomelidae) and *Necrobia rufipes* (Cleridae). Comparing both season, it is verified that the
72 colonization of the carcasses by the beetles was strongly different and influenced by biotic and abiotic
73 factors. The observed species composition differs from other studies in Brazil, since the greatest
74 abundance and diversity occurred in the cold/wet season. These results point to the importance of
75 regional forensic entomological studies, due to differences in carcass decomposition and faunal
76 composition.

77 **KEY WORDS:** necrophagous insects, decomposition ecology, postmortem interval, Neotropical
78 diversity, forensic entomology

79
80
81
82
83
84
85
86
87
88

89 A influência dos fatores abióticos está intimamente relacionada com o ciclo de vida dos insetos podendo
90 afetar sua sobrevivência, forrageio, reprodução, período de desenvolvimento e, conseqüentemente,
91 modificando sua dinâmica populacional no ambiente (Silveira-Neto et al. 1976, Medeiros et al. 2004).
92 Os insetos decompositores apresentam um importante papel ecológico na natureza (Thomanzini &
93 Thomanzini 2000), facilitando a reintrodução dos elementos químicos no meio, como aqueles presentes
94 em uma carcaça animal.

95 O tempo de decomposição de uma carcaça está relacionado com a sucessão de insetos que irão
96 colonizá-la (Catts & Goff 1992); todavia, o fluxo desses insetos, principalmente aqueles pertencentes às
97 ordens Diptera e Coleoptera, depende de fatores bióticos e abióticos presentes no local do estudo (Moura
98 et al. 1997). Segundo Smith (1986), quatro categorias ecológicas podem ser reconhecidas na
99 entomofauna associada a carcaças em decomposição: necrófagos, predadores, onívoros e acidentais. A
100 ordem Coleoptera, composta por aproximadamente 400 mil espécies de besouros (Bouchard et al. 2009,
101 2011), apresenta importância ecológica no ecossistema terrestre, como por exemplo, na fertilização
102 edáfica. Nesta relação com a matéria orgânica em decomposição, os besouros possuem papel relevante
103 na entomologia forense, sendo frequentemente associados a cadáveres em decomposição, compondo,
104 junto com as moscas 60% da fauna decompositora (Moretti et al. 2008). Esses insetos apresentam
105 potencial importância forense principalmente em casos onde o cadáver encontra-se em avançado estágio
106 de decomposição, compreendendo a principal evidência entomológica na determinação do intervalo
107 pós-morte (IPM) nesta fase (Kulshrestha & Satpathy 2001).

108 Na América do Sul, estudos em entomologia forense têm focado sobre a influência de fatores
109 abióticos (Faria et al. 2013, Domínguez et al. 2015) ou bióticos (Santos et al. 2014), entretanto a análise
110 de ambos os fatores conjuntamente pode ser mais adequada para o entendimento da complexidade da
111 fauna de besouros associada a carcaças nos diferentes estágios de decomposição. Além disso, distintas
112 condições ambientais e ecológicas determinam que certas espécies de besouros possuam distribuição
113 mais restrita e, portanto, de interesse forense à região sob investigação (Mise et al. 2010, Celli et al.
114 2016).

115 O presente estudo objetivou avaliar a composição de coleópteros associados a carcaças suínas
116 expostas em uma área rural na região de Porto Alegre, RS, Brasil, visando analisar como a abundância
117 e riqueza desses insetos pode ser afetada pela atuação, em conjunto, de fatores bióticos (categorias
118 ecológicas e processo de decomposição) e abióticos (temperatura, umidade e precipitação).

119

120

Material e Métodos

121

122 **Área de estudo e desenho experimental.** O estudo foi desenvolvido em área no extremo sul do
123 município de Porto Alegre, Sul do Brasil. As amostragens foram realizadas em duas estações: estação
124 quente-seca (janeiro) e fria-úmida (setembro) de 2014. Em cada experimento foram expostos
125 simultaneamente três suínos domésticos machos (*Sus scrofa* Linnaeus), pesando aproximadamente 12
126 kg cada, eutanasiados no local com disparo de arma de fogo na região occipital. Anestésicos e sedativos
127 não foram utilizados de forma a evitar influência no tempo de decomposição das carcaças (Introna et al.
128 2001) e no desenvolvimento dos insetos no recurso (Goff & Lord 1994). As carcaças foram expostas
129 em decúbito lateral direito em gaiolas metálicas, de forma a restringir o acesso de vertebrados
130 carnívoros. As gaiolas distavam 30 metros uma da outra, permanecendo em condições similares de
131 exposição. Seis armadilhas *pitfall* (copos plásticos de 500 mL) foram dispostas ao redor de cada gaiola
132 para captura passiva e, posicionadas equidistantes entre si. Essas armadilhas continham água e uma gota
133 de detergente para quebrar a tensão superficial da água (Kearns & Inouye 1993), sendo os conteúdos
134 substituídos diariamente após a coleta. Sobre as gaiolas foram colocadas armadilhas do tipo “Shannon”
135 modificadas, consistindo de uma armação de tubos de PVC com uma cobertura de organza. Um espaço
136 de 30 cm, entre o chão e a cobertura, permitiu o acesso dos insetos.

137

138 **Coleta de insetos e identificação.** As coletas foram realizadas diariamente pelo mesmo coletor
139 de forma a minimizar as diferenças no esforço amostral, sendo finalizadas quando as carcaças atingiram
140 o estágio seco de decomposição, restando apenas pelos e ossos, ocasião em que não se observou mais
141 atividade de insetos. Os adultos coletados nas armadilhas foram mortos em frascos mortíferos e

142 armazenados em álcool 90%, sendo transferidos para o laboratório para montagem e identificação e,
143 posteriormente incorporados a seção Entomológica Forense da Coleção de Insetos do Museu de Ciências
144 e Tecnologia (MCT) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). Os espécimes
145 foram identificados utilizando chaves taxonômicas (Almeida & Mise 2009, Vaz-de-Mello et al. 2011),
146 coleções de referências e, quando necessário, com o apoio de especialistas. Dados abióticos
147 (temperatura, umidade relativa e precipitação) foram obtidos da estação do Instituto Nacional de
148 Meteorologia (INMET). A identificação dos estágios de decomposição das carcaças de suínos foi feita
149 através de observações diárias e com base em informações da literatura.

150

151 **Análise de dados.** Realizou-se uma análise exploratória dos dados através de uma análise
152 discriminante com as variáveis abióticas e variáveis bióticas transformadas em dados numéricos, sendo
153 ‘carcaças’ tratadas como fator de agrupamento. Esse enfoque estatístico evidencia até que ponto a fauna
154 de besouros sobre as três carcaças investigadas poderia ser avaliada em conjunto nas análises
155 subsequentes. Para isso, utilizou-se a função *lda* do pacote MASS (Venables & Ripley 2002)
156 empregando uma estimativa de máxima verossimilhança (*maximum likelihood estimate*).

157 De forma a avaliar estatisticamente quais variáveis poderiam afetar a estrutura dos dados,
158 procedeu-se com uma análise de variância multivariada (MANOVA). O teste foi validado por meio de
159 uma matriz de confusão gerada através de predições de Jackknife (“leave-one-out”) seguida por uma
160 validação cruzada (= quantidade de desclassificações). Nesse modelo, esperava-se um baixo poder de
161 discriminação da fauna de besouros entre as carcaças. O modelo de validação cruzada foi testado para a
162 significância empregando a função *MVA.test* com teste de permutação (2,000 replicações) usando o
163 método “*fdr*” do pacote RVAideMemoire (Hervé 2015). Aplicou-se uma análise de correspondência
164 multivariada como um método de exploração adicional a fim de avaliar a correspondência entre uma
165 tabela com dois fatores simples (*simple two-way*), contendo o estágio de decomposição das carcaças nas
166 linhas e a categoria ecológica dos besouros nas colunas. Uma coluna adicional foi provida contendo a
167 informação se as espécies de besouros eram, ou não, de interesse forense, a partir de informações da
168 literatura. Esta análise foi desenvolvida com a função *CA* do pacote “FactoMineR” (Lê et al. 2008). Ao

169 final, avaliou-se até que ponto abundância e riqueza de espécies de besouros poderiam ser afetadas por
170 variáveis registradas ao longo desse estudo. Uma vez que ambas as variáveis respostas (abundância,
171 riqueza) eram discretas e considerando a estrutura longitudinal com medidas repetidas dos dados,
172 ajustaram-se dois modelos lineares generalizados mistos (GLMM, *em inglês*) com família de
173 distribuição de Poisson (link=log). Ambos os GLMMs foram analisados usando a função *glmer* do
174 pacote “lme4” (Bates et al. 2015) e otimizados segundo o algoritmo de *bobyqa* (Bates et al. 2015). Desse
175 modo, no primeiro GLMM, foi avaliado se a abundância de besouros amostrada nas três carcaças
176 poderia ser influenciada pelos fatores fixos: *a* – **estágio de decomposição** (fresco, gasoso, avançado, seco),
177 *b* – **estação** (quente/seca, fria/úmida) e **dias de amostragem**. Os efeitos aleatórios foram assumidos
178 como sendo as **carcaças**, enquanto **família e espécies de besouros** foram inseridas no argumento
179 *contrasts* dessa função. O segundo GLMM testou se a riqueza de besouros era afetada pelos efeitos
180 fixos: (1) **estação**, assim como, a interação entre (2) **temperatura**, (3) **umidade relativa** e (4)
181 **precipitação**. Os efeitos aleatórios foram assumidos como sendo os **dias** e o **método de amostragem**.
182 Todas as análises estatísticas foram conduzidas no programa estatístico R (R Core Team 2016), levando
183 em consideração $p < 0,05$.

184

185

Resultados

186 A classificação que mais se adequou às condições climáticas registradas no estudo foram as
187 descritas por Reed (1958), sendo denominados os estágios como: fresco, gasoso, avançado e seco.

188 Foram coletados 415 indivíduos pertencentes a 18 famílias, sendo dessas, 11 consideradas de
189 potencial importância forense, apresentando hábito alimentar necrófago, onívoro ou predador. As
190 espécies de hábito fitófago, consideradas na categoria acidental, compuseram 26 espécies (tabela 1).

191

192

193

194

195

196 **Tabela 1:** Coleópteros associados a carcaças de suínos expostos na região Sul do Brasil, amostrados em duas
 197 estações (quente/seca e fria/úmida), por estágios de decomposição das carcaças (I: fresco; II: gasoso; III: avançado;
 198 IV: seco), classificados nas categorias ecológicas (acidental, onívoro, predador/parasita, necrófago) propostas por
 199 Smith (1986).

Táxon	Categoria Ecológica	Quente/Seca (janeiro)				Fria/Úmida (setembro)				Total
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Cantharidae										
Cantharidae sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	4	0	4
Carabidae										
<i>Bembidion</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	2	6	0	8
<i>Brachinus</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Carabidae sp.	Predador	0	0	0	1	0	1	1	0	3
<i>Galerita melanarthra</i>	Predador	0	0	0	0	0	1	8	3	12
<i>Galerita</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Mesus</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	3	0	3
<i>Notiobia</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Pheropsophus</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	2	10	0	12
<i>Scarites</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Cerambycidae										
<i>Compsocerus violaceus</i>	Acidental	0	0	0	0	0	0	2	1	3
Chrysomelidae										
Alticipi sp. 1	Acidental	0	0	1	1	0	0	0	0	2
Alticipi sp. 2	Acidental	0	0	0	3	0	0	0	0	3
Alticipi sp. 3	Acidental	0	0	0	4	0	0	0	0	4
Alticipi sp. 4	Acidental	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Cassidini sp.	Acidental	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>Chaetocnema</i> spp.	Acidental	0	0	12	20	0	1	0	0	33
<i>Chalepus sanguinicollis</i>	Acidental	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Chrysomelidae sp.	Acidental	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Colaspis</i> sp.	Acidental	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<i>Cornulactica</i> sp.	Acidental	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Desmogramma bivia</i>	Acidental	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Diabrotica</i> sp.	Acidental	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Diabrotica speciosa</i>	Acidental	0	0	0	0	0	0	1	1	2
<i>Iucetima minor</i>	Acidental	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Kuschelina vigintinitata</i>	Acidental	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Omophoita octoguttata</i>	Acidental	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Cleridae										
<i>Necrobia ruficollis</i>	Necrófago	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>Necrobia rufipes</i>	Necrófago	0	0	0	17	0	0	0	0	17

200

201

202

Continua...

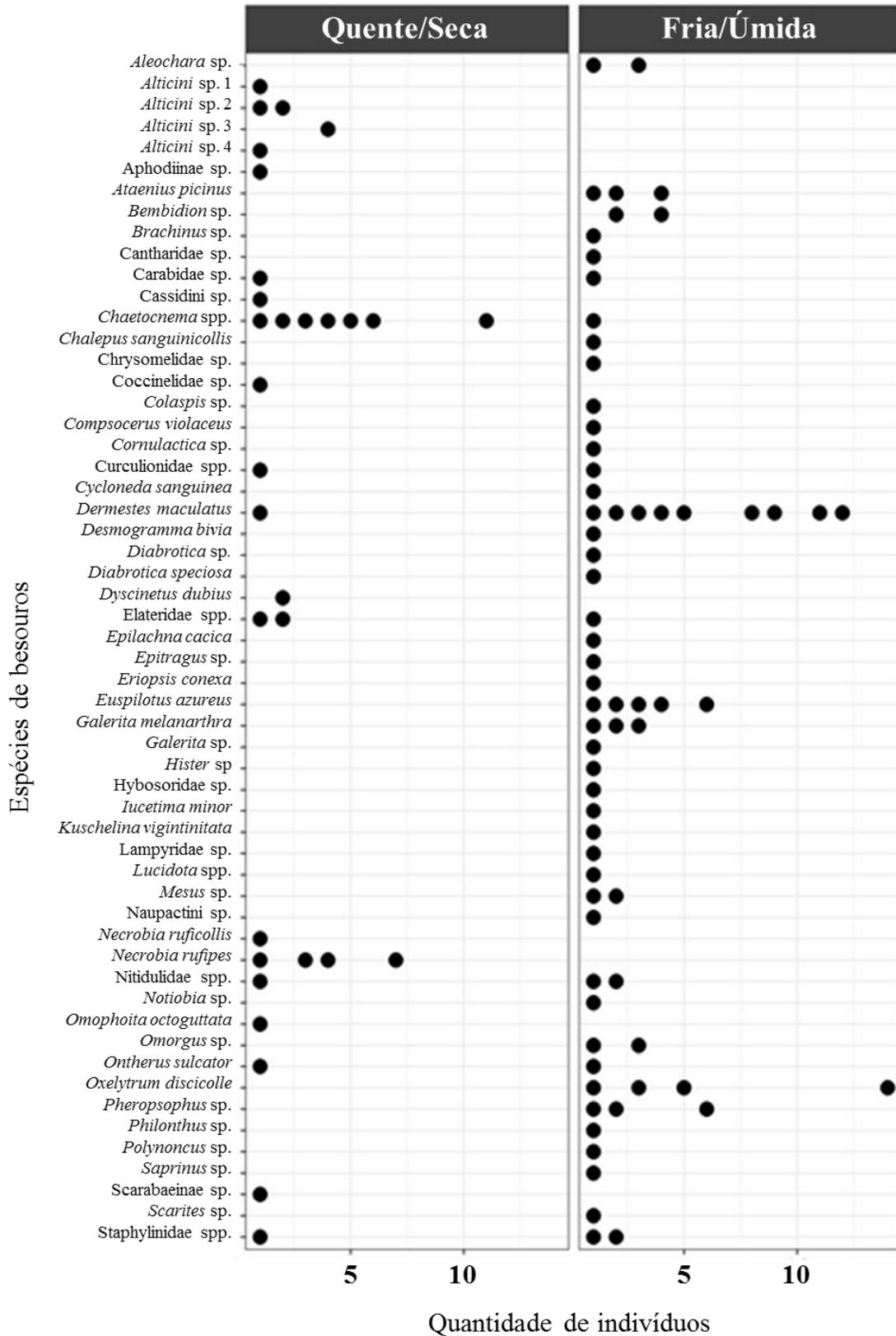
Táxon	Categoria Ecológica	Quente/Seca (janeiro)				Fria/Úmida (setembro)				Total
		I	II	III	IV	I	II	III	IV	
Coccinellidae										
Coccinellidae sp.	Acidental	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Cycloneda sanguinea</i>	Acidental	0	0	0	0	1	2	1	0	4
<i>Epilachna cacica</i>	Acidental	0	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>Eriopis connexa</i>	Acidental	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Curculionidae										
Curculionidae spp.	Acidental	1	0	0	1	0	1	1	0	4
Naupactini sp.	Acidental	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Dermestidae										
<i>Dermestes maculatus</i>	Necrófago	0	0	0	4	0	7	99	1	111
Elatecidae										
Elatecidae spp.	Acidental	0	0	3	2	0	0	1	0	6
Histeridae										
<i>Euspilotus azureus</i>	Predador	0	0	0	0	0	14	29	17	60
<i>Hister</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>Saprinus</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Hybosoridae										
Hybosoridae sp.	Onívoro	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Lampyridae										
Lampyridae sp.	Acidental	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Lucidota</i> spp.	Acidental	0	0	0	0	2	1	1	0	4
Nitidulidae										
Nitidulidae spp.	Necrófago	0	0	1	0	1	2	4	0	8
Scarabaeidae										
Aphodiinae sp.	Onívoro	0	0	1	1	0	0	0	0	2
<i>Ataenius picinus</i>	Onívoro	0	0	0	0	0	4	4	0	8
<i>Dyscinetus dubius</i>	Onívoro	0	0	0	4	0	0	0	0	4
<i>Ontherus sulcator</i>	Onívoro	0	0	1	0	0	0	1	1	3
Scarabaeinae sp.	Onívoro	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Silphidae										
<i>Oxelytrum discicolle</i>	Necrófago	0	0	0	0	0	10	20	1	31
Staphylinidae										
<i>Aleochara</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	1	11	0	12
<i>Philonthus</i> sp.	Predador	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Staphylinidae spp.	Predador				1	2	4	2	0	9
Tenebrionidae										
<i>Epitragus</i> sp.	Onívoro	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Trogidae										
<i>Omorgus</i> sp.	Necrófago	0	0	0	0	0	1	3	4	8
<i>Polynoncus</i> sp.	Necrófago	0	0	0	0	0	0	2	2	4
Total					86				329	415

205 Dermestidae (111 espécimes) foi a família mais abundante (tabela 1), constituindo 26.8% dos
206 insetos amostrados, sendo *Dermestes maculatus* DeGeer, 1774 a única espécie coletada. Histeridae foi
207 a segunda mais coletada em abundância, com 62 espécimes, representada, principalmente, por
208 *Euspilotus azureus* (Sahlberg, 1823) (figura 1). Outras famílias consideradas de interesse forense, foram
209 Carabidae (n = 43), Cleridae (17), Hybosoridae (01), Nitidulidae (08), Scarabaeidae (18), Silphidae (31),
210 Staphylinidae (22), Tenebrionidae (01) e Trogidae (12), que juntamente com Dermestidae e Histeridae
211 constituíram 78,7% do material coletado.

212

213

214

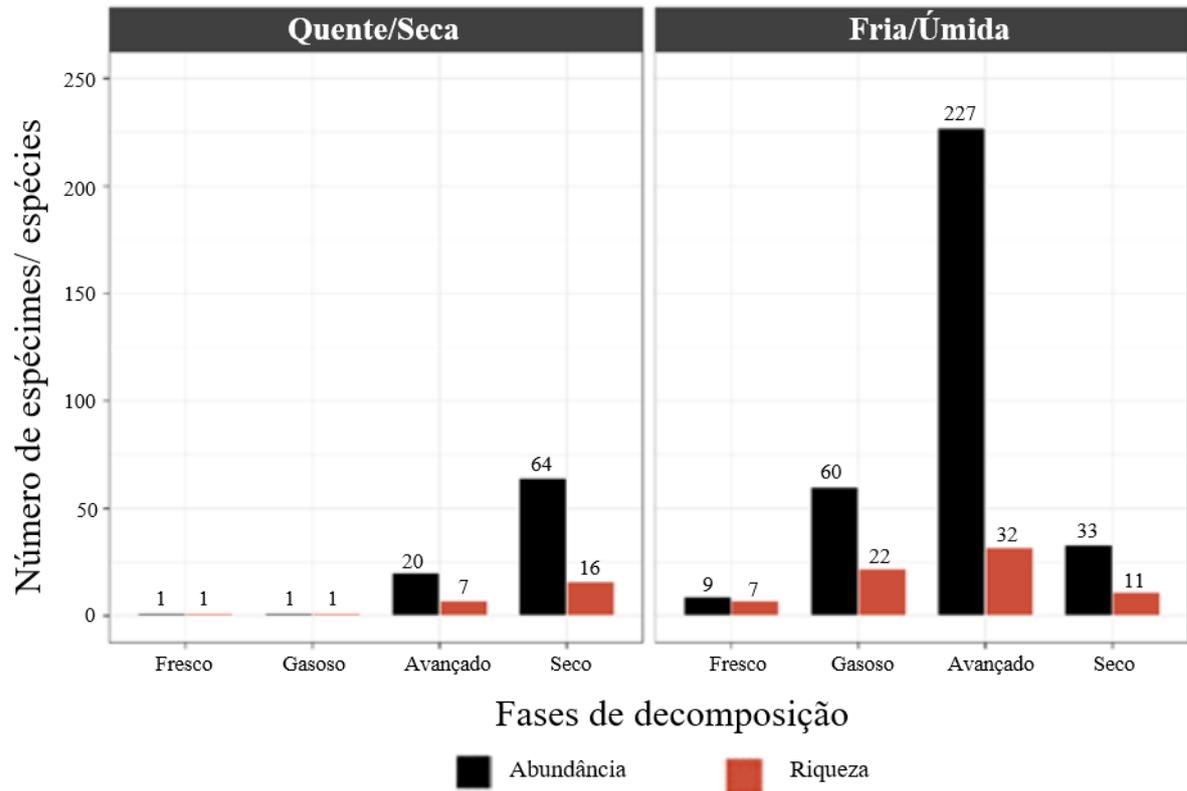


215

216 **Fig. 1:** Abundância e riqueza de besouros associados a carcaças de suínos expostas em ambiente rural no Sul do
 217 Brasil, em dois períodos estacionais (estação quente/seca e fria/úmida).

218 Na estação seca e quente, com temperatura média de 31,3° C (\pm 4,4° C), umidade relativa de
219 55,3% (\pm 14,7%) e precipitação acumulada de 13,1 mm, foi coletado um total de 86 coleópteros,
220 pertencentes a 10 famílias e 20 espécies, sendo o maior número amostrado nas armadilhas *pitfall* (n =
221 54). A família mais representativa foi Chrysomelidae, apresentando 45 indivíduos coletados, sendo 71%
222 desses pertencendo ao gênero *Chaetocnema* (n=32). A segunda família mais abundante foi Cleridae,
223 representada por *Necrobia rufipes* (DeGeer, 1774) (n = 17) e um exemplar de *Necrobia ruficollis*
224 (Fabricius, 1775). Nessa estação a decomposição das carcaças durou 10 dias. O estágio de decomposição
225 final (seco) representou a maior riqueza de coleopterofauna, com 16 espécies amostradas, seguido pelo
226 estágio avançado com sete espécies (figura 2).

227 Na estação caracterizada como fria e úmida (setembro), a temperatura média foi de 19,3° C (\pm
228 1,9° C), umidade relativa de 78,4% (\pm 5,9%) e chuva acumulada no período de 161,4 mm, totalizando
229 34 dias de decomposição das carcaças. Foram coletados 329 indivíduos pertencentes a 17 famílias e 44
230 espécies (figura 2), apresentando elevada abundância relativa (\approx 79%) quando comparado a estação
231 anterior. A espécie com maior abundância foi *Dermestes maculatus* com 107 indivíduos, correspondente
232 a 32,5% da fauna de besouros coletada na estação, seguida por *Euspilotus azureus* (n = 60) e *Oxelytrum*
233 *discicolle* (Brullé, 1840) (n = 31). O estágio avançado representou a fauna mais rica, com 32 espécies.
234



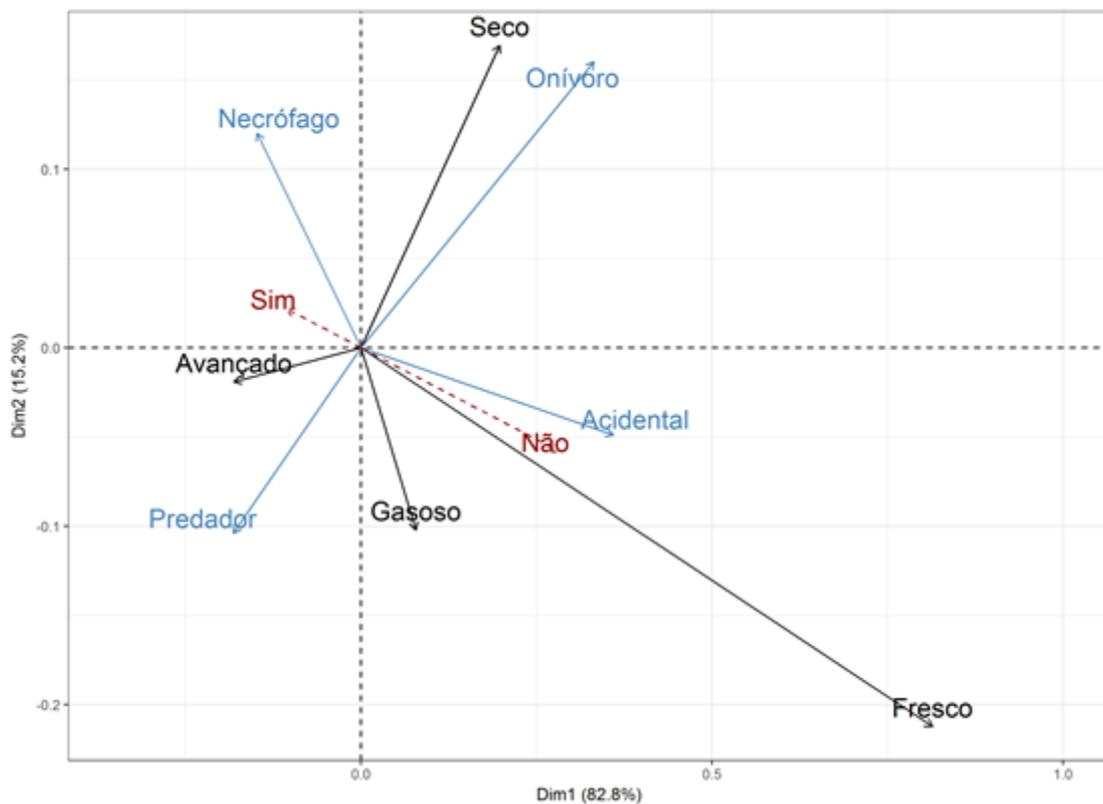
235

236 **Fig. 2.** Variação na composição de espécies de besouros (abundância e riqueza) associados a carcaças de suínos
 237 expostas durante os estágios de decomposição, nas estações amostradas (quente/seca e fria/úmida), em região rural
 238 no Sul do Brasil.

239

240 A análise realizada de forma a comparar a comunidade de besouros nas três carcaças, em cada
 241 estação, indicou que a de composição dos insetos foi similar nas carcaças, possibilitando o agrupamento
 242 dos dados para análises posteriores. Os dados sobre a análise discriminante e a MANOVA são
 243 apresentados no material suplementar.

244 O número de espécies de besouros variou de acordo com os estágios de decomposição,
 245 principalmente quando relacionado às suas categorias ecológicas e interesse forense. A análise de
 246 correspondência multivariada entre esses fatores não apresentou significância quando testada ($\chi^2 =$
 247 15,16; $P = 0,086$), contudo revelou uma preferência de indivíduos onívoros associados a carcaças secas,
 248 enquanto os representantes necrófagos e predadores se associaram a períodos mais ativos da
 249 decomposição (estágio gasoso e avançado). O estágio fresco foi pouco atrativo a coleópteros, tendo sido
 250 registradas espécies acidentais, sem interesse forense (figura 3).



251

252 **Fig. 3:** Análise de correspondência entre estágios de decomposição (em preto), categorias ecológicas (azul) e
 253 interesse forense (vermelho) observada em carcaças suínas expostas no Sul do Brasil (o coseno quadrado e a
 254 contribuição são mostrados na tabela S1 do material suplementar).

255

256 A abundância de besouros associada às carcaças foi positivamente influenciada pelos estágios de
 257 decomposição (GLMM Poisson, $\chi^2 = 8,98$; $P = 0,02$) (tabela 2). Entretanto, as outras variáveis fixas
 258 avaliadas não apresentaram significância estatística (tabela 2). Por outro lado, a riqueza de espécies de
 259 besouros associada a carcaças foi afetada pela estação de amostragem (GLMM Poisson, $\chi^2 = 4,64$; $P =$
 260 $0,03$) e pela temperatura (GLMM Poisson, $\chi^2 = 8,35$; $P = 0,003$), enquanto as outras variáveis ambientais
 261 não apresentaram significância estatística, tampouco a interação entre elas (tabela 3).

262

263

264

265

266 **Tabela 2** – Parâmetros utilizados para análise do modelo linear generalizado misto para abundância de coleópteros
 267 associados a carcaças expostas em duas estações (quente/seca e fria/úmida), em ambiente rural no Sul do Brasil
 268 (Nota: família de distribuição dos erros = binomial negativa.
 269

Efeitos fixos	χ^2	Graus de liberdade	P-value
Estágio de decomposição	8,98	3	0,02*
Estação	0,35	1	0,55
Dias	0,63	1	0,42

Efeitos aleatórios: Número de observações= 212; Grupos: Espécies = 55; Famílias= 18; Carcaças= 3

270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277

Tabela 3 – Efeitos fixos considerados na análise do modelo linear generalizado misto para riqueza de besouros relacionados a carcaças de suínos expostas em duas estações (quente/seca e fria/úmida), em ambiente rural no Sul do Brasil (Nota: família de distribuição dos erros = Poisson).

Efeitos fixos	Estimativa	Erro-padrão	χ^2	P-value
Temperatura	0,164	1,2195	8,35	0,003**
Umidade	0,7545	0,854	0,23	0,627
Precipitação	-1,2382	1,5288	0,71	0,397
Estação	1,0356	0,4808	4,64	0,031*
Temperatura:Umidade	1,6645	2,2416	0,12	0,719
Temperatura:Precipitação	-5,0856	5,1931	0,34	0,555
Umidade: Precipitação	2,0136	3,7683	0,03	0,855
Temperatura:Umidade:Precipitação	7,6279	9,125	0,69	0,403

Efeitos aleatórios: Número de observações = 57; Dias = 29; Método de amostragem = 3

278
 279

280 **Discussão**

281 Estudos prévios se referem à decomposição como um processo contínuo (Moura et al. 2005),
 282 contudo, a classificação desse processo em estágios é adotada para estudos forenses (Zanetti et al. 2015),
 283 sendo esses dependentes das condições sazonais e geográficas (Bornemissza 1956, Reed 1958). O
 284 número de estágios de decomposição observados neste estudo foi semelhante aos já encontrados por
 285 outros autores para a região Neotropical (Monteiro-Filho & Penereiro 1987, Mise et al. 2007, Silva &
 286 dos Santos 2012), contudo alguns utilizem outras classificações. Apesar disso, o processo de
 287 decomposição observado apresentou-se diferente do que é esperado, com uma estação quente e seca
 288 marcada por altas temperaturas e baixas umidades, além da reduzida diversidade de besouros visitando

289 as carcaças. A diversidade de espécies de coleópteros associada com as carcaças suínas em
290 decomposição, observada nesse período, diferiu de outras pesquisas pela elevada abundância de
291 indivíduos acidentais relativamente a outras famílias de interesse forense. Na estação fria e úmida
292 observou-se elevada abundância e riqueza de coleópteros, fato que pode ser atribuído às temperaturas
293 amenas e baixa amplitude térmica, seguida de alta umidade relativa do ar, repercutindo em um longo
294 processo de decomposição e a possibilidade de mais insetos visitarem a carcaça. A elevada abundância
295 relativa observada na estação fria e úmida difere de outros estudos semelhantes, que apontam a elevação
296 da umidade relativa como um fator para redução da atratividade de coleópteros as carcaças (Rosa et al.
297 2011).

298 Ainda, foi observada a influência significativa da estação e dos estágios de decomposição sobre
299 a comunidade de insetos, quando testado estatisticamente. A abundância de besouros, principalmente
300 predadores, na fase de decomposição avançada pode estar relacionada à alta disponibilidade de alimento
301 (larvas de dípteros) (Mise et al. 2010), ao odor emanado das carcaças durante a putrefação (Mise et al.
302 2007, Byrd & Castner 2010) e à preferência dos besouros pelos estágios finais de decomposição (Souza
303 & Linhares 1997, Souza et al. 2008, Faria et al. 2013). Portanto, foi evidenciado que a abundância de
304 besouros sobre as carcaças é significativamente afetada pelo estágio de decomposição das mesmas,
305 assim como a riqueza de besouros está diretamente relacionada às estações e à temperatura. Ambas as
306 variáveis (abundância, riqueza), portanto, são explicadas por fatores bióticos e abióticos.

307 Em setembro observou-se predominância de *Dermestes maculatus*, *Euspilotus azureus* e
308 *Oxelytrum discicolle*, espécies conhecidas por sua importância forense e já relatadas por Mise et al.
309 2007. A presença desses besouros está intimamente associada aos respectivos hábitos de suas categorias
310 ecológicas (necrófagos e predadores de larvas de dípteros). *Dermestes maculatus* já foi anteriormente
311 relatada, por exemplo, em estudos forenses realizados na região sudeste (Carvalho et al. 2000), sul (Mise
312 et al. 2007) e nordeste (Santos et al. 2013) do Brasil, além de trabalhos realizados em outros países,
313 porém em região Neotropical (Centeno et al. 2002, Magaña 2006, Segura et al. 2009, Valdes-Perezgasga
314 et al. 2010, Battán-Horenstein & Linhares, 2011, Aballay et al. 2012). Contudo, a prevalência da espécie
315 durante a estação fria e úmida, contradiz os resultados obtidos por outros pesquisadores (Mise et al.

316 2007; Santos et al. 2014), que afirmam que a espécie tem preferência por ambientes quentes e secos. A
317 espécie está associada aos estágios finais de decomposição, sendo associada ao consumo de músculos e
318 tendões (Rosa et al. 2011), e considerada a espécie de maior importância forense para a região
319 Neotropical (Faria et al. 2013, Santos et al. 2014).

320 O gênero *Euspilotus* (Histeridae) é o terceiro grupo mais abundante em coletas usando carcaças
321 na América do Sul, sendo *E. azureus* uma das espécies mais coletadas (Mise et al. 2010), inclusive em
322 cadáveres humanos (Souza & Linhares 1997, Tabor et al. 2004). Apresenta hábito predador, se
323 alimentando de larvas de outros insetos (Mise et al. 2010). Segundo Mise e colaboradores (2007), a
324 espécie ocorre durante todo ano no Sul do Brasil, principalmente a partir do estágio gasoso do processo
325 de decomposição. Os dados obtidos são similares em relação ao estágio de decomposição, contudo *E.*
326 *azureus* foi observado somente na estação fria e úmida. Santos e colaboradores (2014) também
327 registraram elevada frequência da espécie no período chuvoso.

328 Silphidae, aqui representado por *Oxelytrum discicolle*, e aparecendo como a quarta espécie de
329 maior abundância, foi coletada somente na estação fria e úmida, principalmente a partir da fase gasosa.
330 Os indivíduos da espécie são predadores quando adultos (Smith 1986), provavelmente, estando por isso
331 presentes em grande abundância durante a estação, quando era evidente a alta atividade de imaturos de
332 dípteros (Mise et al. 2007).

333 A expressividade de indivíduos capturados pertencentes as famílias acima citadas deve-se,
334 provavelmente, ao hábito necrófago (Dermestidae) e predador (Histeridae) de seus indivíduos, tendo
335 este último como presas as larvas de dípteros, recurso altamente disponível nas carcaças durante
336 praticamente todo o processo de decomposição (Catts & Goff 1992, Moura 2004, Mise et al. 2007).
337 Outros predadores, como *Galerita* spp., *Pheropsiphus* sp. (Carabidae), além de representantes de
338 Staphylinidae (*Aleochara* sp., principalmente), podem ter sido atraídos para o recurso em função da
339 abundância de presas, tais como imaturos de dípteros. Esses indivíduos foram mais associados às fases
340 iniciais de decomposição, como é possível visualizar na análise de correspondência (figura 3).
341 Estafilinídeos são comumente associados a carcaças no território brasileiro (Mise et al. 2007, Santos et
342 al. 2013), principalmente os gêneros *Aleochara* e *Philonthus*, ambos documentados nas amostragens.

343 Assim como observado por Santos et al. (2013), os representantes de Staphylinidae ocorrem
344 predominantemente na estação fria e úmida.

345 Indivíduos necrófagos e predadores foram dominantes a partir do estágio gasoso de decomposição
346 da carcaça, na estação fria e úmida. Apesar de não terem sido constatadas diferenças significativas (χ^2
347 = 15,16; P = 0,086), é possível observar uma preferência de besouros necrófagos e predadores por
348 períodos intermediários da decomposição, onde há maior disponibilidade de recurso, conforme foi
349 registrado por outros autores (Souza & Linhares, 1997, Byrd & Castner 2010, Faria et al. 2013).

350 Diferindo de outros estudos conduzidos no Brasil (Mise et al. 2007, Mise et al. 2010, Silva & dos
351 Santos 2012, Santos et al. 2013), na estação quente e seca registrou-se maior abundância de insetos
352 acidentais (Chrysomelidae) do que necrófagos, fato atribuído às altas temperaturas registradas na
353 estação, especialmente do solo. Indivíduos necrófagos, e por vezes predadores, muitas vezes constroem
354 galerias sobre o recurso de forma a utilizá-lo para o desenvolvimento de sua prole e, sob condições
355 adversas, como altas temperaturas, esse estabelecimento não ocorre propiciando ausência ou baixa
356 frequência destas espécies. A presença de *Necrobia rufipes* (Cleridae), como segunda espécie
357 dominante, associada ao estágio seco condiz com os achados de outros autores (Centeno et al. 2002;
358 Battán-Horenstein & Linhares 2011; Santos et al. 2014) que observaram a espécie associada a estações
359 quentes e estágios finais da decomposição. Adultos e imaturos da espécie são comumente encontrados
360 associados a carcaças e corpos no Brasil (Souza & Linhares 1997, Mise et al. 2007, Silva & dos Santos
361 2012, Santos et al. 2014).

362 A diversidade da coleopterofauna observada difere de outros estudos na região Neotropical.
363 Comparando as duas estações, nota-se que a comunidade de besouros associada às carcaças expostas foi
364 fortemente influenciada por fatores bióticos e abióticos, assim como pela interação entre eles. Os
365 resultados produzidos indicam diferenças na composição de espécies observadas em outras pesquisas,
366 principalmente devido à estrutura do ambiente e suas características associadas, enfatizando a
367 importância de estudos regionais para a prática forense. A presença de espécies cosmopolitas como
368 *Dermestes maculatus*, *Necrobia rufipes* e *Euspilotus azureus* reforça a relevância para estudos forenses,

369 principalmente no que diz respeito à sua distribuição temporal, dado que foram somente detectadas em
370 relativa abundância associadas a uma estação.

371

372 **Agradecimentos**

373 Os autores agradecem a Luciano de Azevedo Moura (FZB/RS) pela ajuda com as identificações.

374 Agradecemos também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela

375 concessão de bolsa de estudo à Ana Carolina Ries.

376

377 **Aspectos éticos**

378 Os estudos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal que foram

379 aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica do

380 Rio Grande do Sul (PUCRS) sob o registro 13/00369.

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

Referências

396

397 **Aballay, F.H., A.F. Murua, J.C. Acosta and N.D. Centeno. 2012.** Succession of Carrion fauna in the
398 Arid Region of San Juan Province, Argentina and its forensic relevance. *Neotrop. Entomol.* 41: 27-31.

399

400 **Almeida, L.M., and K.M. Mise. 2009.** Diagnosis and key of the main families and species of South
401 American Coleoptera of forensic importance. *Rev. Bras. Entomol.* 53: 227-244.

402

403 **Bates, D., M. Maechler, B. Bolker and S. Walker. 2015.** lme4: Linear mixed-effects models using
404 Eigen and S4. R package version 1.1-10. (<http://CRAN.R-project.org/package=lme4>) [accessed 12
405 november 2015].

406

407 **Battán-Horenstein, M., and A.X. Linhares. 2011.** Seasonal composition and temporal succession of
408 necrophagous and predator beetles on pig carrion in central Argentina. *Med. Vet. Entomol.* 25: 395-401.

409

410 **Bolker, B., and R Core Team. 2016.** Bbmle: Tools for general maximum likelihood estimation.
411 (<http://CRAN.R-project.org/package=bbmle>) [accessed 12 november 2015].

412

413 **Bornemissza, G.F. 1956.** An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its
414 decomposition on the soil fauna. *Aust. J. Zool.* 5: 1-12.

415

416 **Bouchard, P., V. V. Grebennikov, A.B.T. Smith, and H. Douglas. 2009.** Biodiversity of Coleoptera,
417 pp. 265–301. In R.G. Foottit and P. H. Adler (eds.). *Insect biodiversity: Science and society.* Wiley-
418 Blackwell, Chichester, UK.

419

420 **Bouchard, P., Y. Bousquet, A.E. Davies, M.A. Alonso-Zarazaga, J.F. Lawrence, C.H.C. Lyal, A.F.
421 Newnton, C.A.M. Reid, M. Schmitt, S.A. Slipinski, and A.B.T. Smith. 2011.** Family-group names in
422 Coleoptera (Insecta). *ZooKeys* 88: 1-972.

423

424 **Byrd, J.H., and J.L. Castner. 2010.** *Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal
425 Investigations.* Boca Raton, CRC.

426

427 **Carvalho L.M.L., P.J. Thyssen, A.X. Linhares, and F.A.B. Palhares. 2000.** A checklist of arthropods
428 associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95:
429 135-138.

430

431 **Catts, E.P., and M.L. Goff. 1992.** Forensic Entomology in Criminal Investigations. *Annu. Rev.
432 Entomol.* 37: 253-272.

433

434 **Centeno, N., M. Maldonado, and A. Oliva. 2002.** Seasonal patterns of arthropods occurring on
435 sheltered and unsheltered pig carcasses in Buenos Aires Province (Argentina). *Forensic Sci. Int.* 126:
436 63–70.

437

438 **Celli, N.G.R., F.W.T. Leivas, M.F.C Caneparo, and L.M. Almeida. 2016.** Chave de identificação e
439 diagnose dos Histeridae (Insecta: Coleoptera) de interesse forense do Brasil. *Iheringia Zool.* 105: 461-
440 473.

441

442 **Domínguez, D., D. Marín-Armijos, and C. Ruiz. 2015.** Structure of dung beetle communities in na
443 antitudinal gradiente of Neotropical Dry Forest. *Neotrop. Entomol.* 44: 40-46.

444

445 **Faria L.S., M.L. Paseto, F.T. Franco, V.C. Perdigão, G. Capel, and J. Mendes. 2013.** Insects
446 breeding in pig carrion in two environments of a rural 63rêm of the state of Minas Gerais, Brazil.
447 Neotrop. Entomol. 42: 216-222.
448

449 **Goff, M.L., and W.D. Lord. 1994.** Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. Am. J.
450 Foren. Med. Path. 15: 51-57.
451

452 **Hervé, M. 2015.** RVAideMemoire: Diverse basic statistical and graphical functions.R package version
453 0.9-45-2. (<http://CRAN.R-project.org/package=RVAideMemoire>) [accessed 12 november 2016].
454

455 **Introna, F., C.P. Campobasso, and M.L. Goff. 2001.** Entomotoxicology. Forensic Sci. Int. 120: 42-
456 47.
457

458 **(INMET) Instituto Nacional de Meteorologia. 2012.** Dados Climatológicos.
459 (<http://www.inmet.gov.br/portal/>) [accessed 04 December 2014].
460

461 **Kearns, C.A., and D.W. Inouye. 1993.** Techniques for pollination biologists. Niwot, University Press
462 of Colorado.
463

464 **Kulshrestra, P., and D.K. Satpathy. 2001.** Use of beetles in forensic entomology. Forensic Sci. Int.
465 120: 15-17.
466

467 **Lê, S., J. Josse, and F. Husson. 2008.** FactoMineR: An R package for multivariate analysis. J. Stat.
468 Softw. 25: 1-18.
469

470 **Magaña, C., C. Andara, M.J. Contreras, A. Coronado, E. Guerrero, D. Hernández, M. Herrera,
471 M. Jiménez, C. Liendo, J. Limongi, J. Liria, M. Mavárez, M. Oviedo, J. Piñango, I. Rodriguez, A.
472 Soto, M. F. Sandoval, J. Sánchez, N. Seijas, Z. Tiape, and Y. Velásquez. 2006.** Estudio preliminar
473 de la fauna de insectos asociada a cadáveres em Maracay, Venezuela. Entomotropica 20: 53-59.
474

475 **Medeiros, R. S., F. S. Ramalho, J. E. Serrão, and J. C. Zanuncio. 2004.** Estimative of *Podisus*
476 *nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae) development time with non linear models. Neotrop.
477 Entomol. 33: 141-148.
478

479 **Mise, K.M., A.S.B. de Souza, and C.M. Campos. 2010.** Coleptera associated with pig carcass exposed
480 in a forest reserve, Manaus, Amazonas, Brazil. Biota Neotrop. 10: 321-324.
481

482 **Mise, K.M., L.M. Almeida, and M.O. Moura. 2007.** Levantamento da fauna de Coleoptera que habita
483 a carcaça de *Sus scrofa* L., em Curitiba, Paraná. Rev. Bras. Entomol. 51: 358-368.
484

485 **Monteiro-Filho, E.L.A. and J.L. Penereiro. 1987.** Estudo de decomposição e sucessão sobra uma
486 carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. Rev. Bras. Biol. 47: 289-295.
487

488 **Moretti, T.C., O.B. Ribeiro, P.J. Thyssen and D. R. Solis. 2008.** Insects decomposing carcasses of
489 small rodents in a secondary forest in Southeastern Brazil. Eur. J. Entomol. 105: 691-696.
490

491 **Moura, M. O. 2004.** Variação espacial como mecanismo promotor da coexistência em comunidades de
492 insetos necrófagos. Rev. Bras. Zool. 21:409-419.
493

494 **Moura, M. O, C.J.B. de Carvalho, and E. L. A Monteiro-Filho. 1997.** A Preliminary Analysis of
495 Insects Of Medico-Legal Importance In Curitiba, State Of Paraná. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92: 269–
496 274.
497

498 **Moura, M. O., E.L.A. Monteiro-Filho, and C. J. B. de Carvalho. 2005.** Heterotrophic succession in
499 carrion arthropod assemblages. Braz. Arch. Biol. Technol. 48: 477-486.
500

501 **R Core Team. 2016.** R: A language and environment for statistical computing. The R Foundation for
502 Statistical Computing, Vienna, Austria.
503

504 **Reed, H.B. 1958.** A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the
505 insects. Am. Midl. Nat. 56: 213-245.
506

507 **Rosa, T.A., M.L.Y. Babata, C.M. de Souza, D. de Sousa, C.A. Mello-Patiu, F.Z. Vaz-de-Mello and**
508 **J. Mendes. 2011.** Arthropods associated with pig carrion in two vegetation profiles of Cerrado in the
509 State of Minas Gerais, Brazil. Rev. Bras. Entomol. 55: 424-434.
510

511 **Santos, W.E., A.C.F. Alves, R.C.A.P. Farias, and A.J. Creão-Duarte. 2013.** Ecological Roles of
512 Coleoptera Associated with Carcasses in Caatinga. EntomoBrasilis 6: 248-250.
513

514 **Santos, W.E., A.C.F. Alves, and A.J. Creão-Duarte. 2014.** Beetles (Insecta, Coleoptera) associated
515 with pig carcasses exposed in a Caating área, Northeastern Brazil. Braz. J. Biol. 74: 649-655.
516

517 **Segura, N., W. Usaquen, M. Sanchez, L. Chuaire, and F. Bello. 2009.** Succession pattern of
518 cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogota, Colombia. Forensic Sci. Int. 187: 66–72
519

520 **Silva, R.C., and W. E. dos Santos. 2012.** Fauna de Coleoptera Associada a Carcaças de Coelho
521 Expostas em uma Área Urbana no Sul do Brasil. EntomoBrasilis 5: 185-189.
522

523 **Silveira-Neto, S., O. Nakano, D. Barbin, and N.A. Vilanova. 1976.** Manual de ecologia dos insetos.
524 São Paulo, Ed. Agronômica Ceres.
525

526 **Smith, K.G.V. 1986.** A manual of forensic entomology. London, British Museum.
527 **Souza A.M., and A.X. Linhares. 1997.** Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in
528 southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. Med. Vet. Entomol. 11: 8-12.
529

530 **Souza A. S. B., F. D. Kirst, and R. F. Krüger. 2008.** Insects of forensic importance from Rio Grande
531 do Sul state in southern Brazil. Rev. Bras. Entomol. 52: 641-646.
532

533 **Tabor K.L., C.C. Brewster, and R.D. Fell. 2004.** Analysis of the Successional Patterns of Insects on
534 Carrion in Southwest Virginia. J. Med. Entomol. 41: 785-795.
535

536 **Thomanzini, M.J., and A.P.B.W. Thomanzini. 2000.** A fragmentação florestal e a diversidade de
537 insetos nas florestas tropicais úmidas. Rio Branco, Embrapa Acre.
538

539 **Valdes-Perezgasga, T., F. J. Sanchez-Ramos, O. Garcia-Martinez and G.S. Anderson. 2010.**
540 Arthropods of forensic importance on pig Carrion in the Coahuilan Semidesert, Mexico. J. Forensic Sci.
541 55: 1098 – 1101.
542

543 **Vaz-de-Mello, F.Z., W.D. Edmonds, F. Ocampo, and P Schoolmeesters. 2011.** A multilingual key
544 to the genera and subgenera of the subfamily Scarabaeinae of the New World. *Zootaxa* 2854: 1-73.
545
546 **Venables, W. N., and B. D. Ripley. 2002.** Modern applied statistics with S, 4th ed. New York, Springer
547 New York.
548
549 **Zanetti, N.I., E.C. Visciarelli, and N.D. Centeno. 2015.** Associational patterns of scavenger beetles to
550 decomposition stages. *J. Forensic Sci.* 60: 919-927.
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593

594 MATERIAL SUPLEMENTAR

595

Material e Métodos

596 A análise discriminante foi aplicada a fim de verificar se a fauna de besouros e outras variáveis
597 citadas abaixo sofreriam influência com o agrupamento das três carcaças em uma amostra global. Esse
598 enfoque foi relevante a fim de controlar variâncias subjacentes a cada tratamento (carcaças) que
599 poderiam comprometer comparações futuras entre elas. Desse modo, foi utilizada a função *lda* do pacote
600 “MASS” (Venables and Ripley 2002) empregando o método de estimativa por máxima verossimilhança.
601 As seguintes variáveis foram adicionadas à fórmula como discriminadoras: estágio, dias, estágio de
602 decomposição, abundância, espécies, famílias, método de amostragem, categoria ecológica, interesse
603 forense, temperatura, umidade relativa e precipitação (tabela S2). Dados categóricos foram
604 transformados em dados discretos (não-fatores) a fim de permitir conduzir esta análise. Após isso, foi
605 procedida uma análise de variância multivariada (MANOVA) com teste de Wilk’s *lambda* a fim de
606 avaliar quais variáveis poderiam apresentar diferença significativa entre as carcaças. Essa análise foi
607 conduzida utilizando a função *manova* e seus parâmetros foram extraídos com a função *summary.aov*
608 no R (R Core Team 2016). Por fim, a análise discriminante foi checada por meio de validação cruzada
609 usando uma matriz de confusão. Essa análise avalia a quantidade de desclassificações dentro da função
610 *lda* (argumento *CV=TRUE*) permitindo, assim, a validação cruzada por meio do método de Jackknife
611 (leave-one-out) (Venables and Ripley 2002). Posteriormente, foi feito um teste de significância com
612 permutação baseado no modelo de validação cruzada. Essa última análise utilizou a função *MVA.test*
613 (critério preditivo) do pacote *RVAideMemoire* (Hervé 2015). O argumento *cmv* (cross model validation
614 = *TRUE*) dentro dessa função, portanto, gerou a proporção de indivíduos desclassificados após 2,000
615 replicações. O valor de *P* foi ajustado de acordo com o método “*fdr*” a fim de controlar a taxa de falsas
616 descobertas. Os histogramas para múltiplos grupos foram gerados por meio da função *ldahist* do pacote
617 “MASS” (Venables and Ripley 2002).

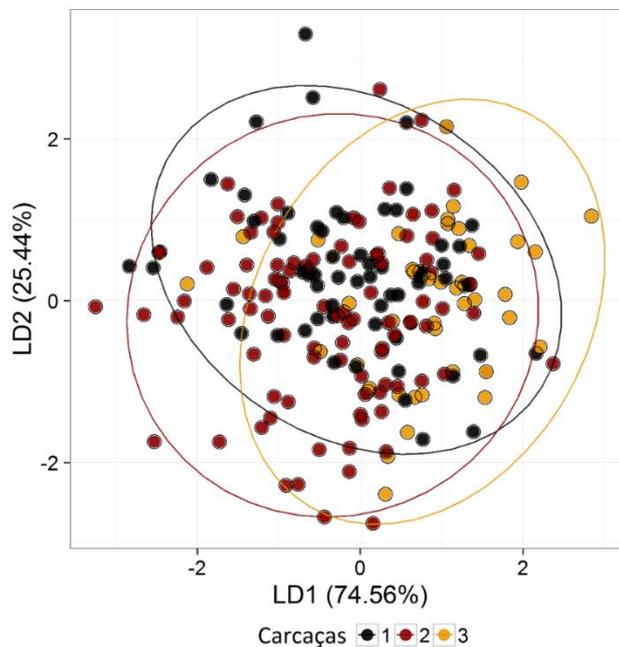
618

619

620

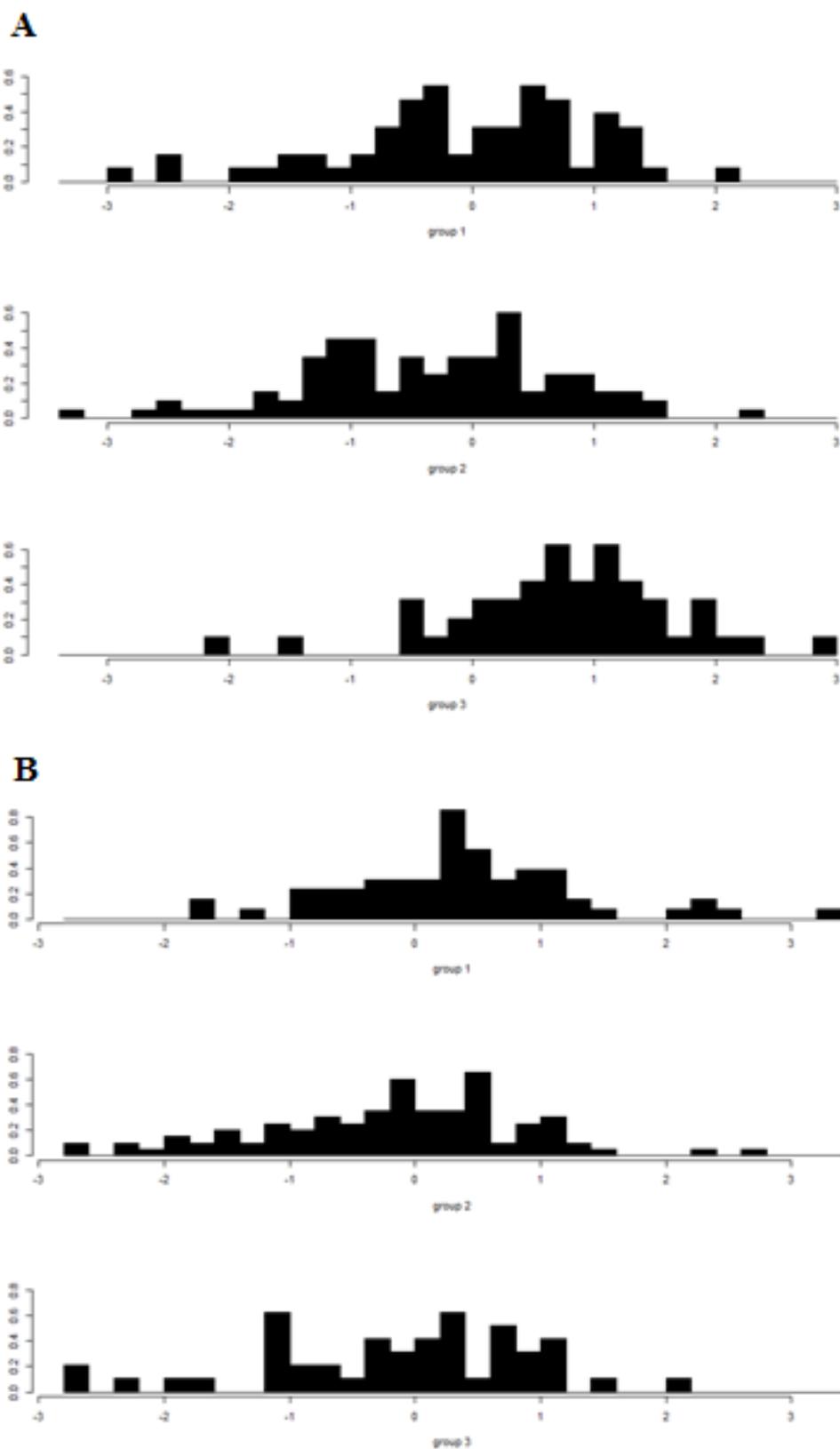
Resultados

621 As duas primeiras dimensões da análise discriminante explicaram 99% da estrutura dos dados
622 (LDA 1 = 74%, LDA 2 = 25%) (figuras S1-S2). Contudo, os resultados da MANOVA apontaram que
623 das 12 variáveis investigadas, somente a variável ‘Dias’ apresentou significância entre as carcaças
624 estudadas (MANOVA, $F_{(2, 209)}=9,70$; $P < 0,001$, tabela S2). Por outro lado, a riqueza de espécies de
625 besouros e suas famílias não apresentaram significância (MANOVA, $F_{(2, 209)}=21,8$; $17,0$; $P > 0,05$, tabela
626 S2) demonstrando que a estrutura da comunidade de besouros era muito similar entre as carcaças. A
627 análise de validação cruzada por meio da matriz de confusão demonstrou uma acuidade geral muito
628 baixa (45%) indicando grande possibilidade de indivíduos amostrados sobre uma certa carcaça
629 (*observada*) ser igualmente representado em outras carcaças (*preditas*) (tabela S3). Por fim, o teste de
630 permutação mostrou diferenças não-significativas entre as carcaças, ou seja, a proporção de indivíduos
631 erroneamente classificados foi considerada alta (0,546; $P = 0,486$).



632

633 **Fig. S1.** Análise discriminante. *Biplot* mostrando os *scores* de cada uma das três carcaças estudadas. Nota:
634 Proporção de desclassificações (i.e., indivíduos erroneamente classificados) foi de 54%; Teste de permutação por
635 validação cruzada, $P = 0,486$.



636

637 **Fig. S2.** Análise discriminante. Histogramas dos três grupos que representam as carcaças de suínos. A – Dimensão
 638 1 (LD1); B – Dimensão 2 (LD2).

639 **Tabela S1** - Análise de correspondência entre os estágios de decomposição e categorias ecológicas das espécies
 640 de besouros associadas as carcaças de suínos em duas estações (quente/seca e fria/úmida), em ambiente rural no
 641 Sul do Brasil.

		Inércia	Dimensão 1	Contribuição	Cosseno Quadrado	Dimensão 2	Contribuição	Cosseno Quadrado
Linhas								
	Fresco	33,57	0,81	52,80	0,93	-0,21	19,54	0,06
	Gasoso	3,91	0,08	1,89	0,28	-0,10	17,58	0,49
	Avançado	18,15	-0,18	30,11	0,98	-0,02	1,83	0,01
	Seco	15,58	0,20	15,19	0,58	0,17	61,04	0,42
Colunas								
	Acidental	33,57	0,36	55,59	0,98	-0,05	5,60	0,02
	Onívoro	9,87	0,33	12,28	0,73	0,16	15,58	0,17
	Necrófago	11,99	-0,15	12,10	0,59	0,12	43,24	0,39
	Predador	15,78	-0,18	20,02	0,75	-0,10	35,57	0,24
Colunas suplementares								
	Sim		-0,11		0,92	0,02		0,04
	Não		0,28		0,92	-0,06		0,04

643

644 **Tabela S2** - Parâmetros da análise de variância multivariada de variáveis ambientais e ecológicas após a execução
 645 de uma análise discriminante entre três carcaças de suínos em duas estações (quente/seca e fria/úmida), em
 646 ambiente rural no Sul do Brasil.

	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média	F	P
Temperatura	2	229,8	114,879	27,914	0,0636
Umidade	2	1259	629,44	28,735	0,0587
Precipitação	2	309,7	154,87	15,012	0,2252
Dias	2	1161,9	580,96	97,075	< 0,001***
Método de amostragem	2	0,008	0,004127	0,0261	0,9743
Interesse forense	2	0,063	0,031454	0,1563	0,8554
Abundância	2	2,82	14,092	0,3503	0,7049
Estágio de decomposição	2	1,075	0,53754	0,8962	0,4097
Categoria ecológica	2	1,579	0,78931	0,5836	0,5588
Riqueza (espécies)	2	974	486,75	21,811	0,1155
Famílias	2	85	42,494	17,082	0,1837

647

648

649 **Tabela S3** – Matriz de confusão da análise discriminante. Quantidade absoluta e porcentagem de besouros
650 erroneamente atribuídos a carcaças diferentes daquelas de origem.

	Predito		
Original	Carcaça 1	Carcaça 2	Carcaça 3
Carcaça 1	12 (12%)	43 (70%)	9 (17%)
Carcaça 2	11 (15%)	80 (74%)	9 (11%)
Carcaça 3	6 (16%)	23 (54%)	19 (29%)
651	Acurácia global (45%)		

CAPÍTULO III

O uso de DNA barcode como alternativa para identificação de espécies de sarcófagídeos de importância forense do Sul do Brasil

Manuscrito redigido conforme as normas estabelecidas pelo periódico *Medical and Veterinary Entomology*

Ries et al.:

DNA barcode para Sarcophagidae do Sul do Brasil

Medical and Veterinary Entomology

Original Articles

A. C. Ries

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Av. Ipiranga, 6681

CEP: 90619-900

Porto Alegre – RS – Brasil

Fone: 55 51 33534376

Email: anacarolinaries@hotmail.com

O uso de DNA barcode como alternativa para identificação de espécies de sarcófagídeos de importância forense do Sul do Brasil

A. C. Ries, T. Madeira, B. Blochtein and P. J. Thyssen

O uso de DNA barcode como alternativa para identificação de espécies de sarcófagídeos de importância forense do Sul do Brasil

Ana Carolina Reimann Ries ¹; Taís Madeira ²; Betina Blochtein ¹; Patrícia Jacqueline Thyssen ³

(1) Departamento de Biodiversidade e Ecologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Rio Grande do Sul

(2) Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Rio Grande do Sul

(3) Departamento de Biologia Animal, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo

Resumo. Moscas associadas à matéria orgânica em decomposição podem trazer informações importantes em investigações criminais. Por isso, a correta identificação dos espécimes é fundamental, embora um número reduzido de variações interespecíficas possa ser um obstáculo para um correto diagnóstico de espécie, inclusive para especialistas. Nesse sentido, as análises moleculares podem ser úteis na determinação específica acurada. Nesse estudo objetivou-se analisar o potencial de uso do *DNA Barcode* para identificação de espécies de sarcófagídeos de importância forense para a região Sul do Brasil. Foram utilizados 40 indivíduos adultos das espécies *Helicobia aurescens*, *Oxysarcodexia culmiforceps*, *O. parva*, *Peckia (Pattonella) resona*, *Ravinia advena*, *R. belforti* e *Tricharea (Sarcophagula) occidua*, amostrados em experimento de campo utilizando suínos expostos na região de Porto Alegre, RS, Brasil. Foram obtidos fragmentos da região COI (citocromo oxidase I) do DNA mitocondrial de aproximadamente 595 pb. As divergências entre os nucleotídeos foram calculadas utilizando um modelo de distância K2P e um fenograma foi gerado pelo algoritmo de Neighbour-Joining. A divergência intraespecífica variou de 0 a 1,8% e a interespecífica entre 6,6 – 15,6%, estando dentro dos limiares propostos. Todos os espécimes/espécies examinados agruparam-se aos seus correspondentes táxons. Dessa forma, o uso de *DNA barcode* mostrou-se seguro para a identificação de sarcófagídeos de interesse forense para o Sul do Brasil, podendo ser, além disso, uma excelente alternativa para identificar fêmeas e imaturos, cujo diagnóstico pode ser mais laborioso levando em conta que alguns imaturos nem se encontram descritos na literatura.

Palavras-chave: moscas da carne, COI, entomologia forense, necrófagos, intervalo pós-morte.

Abstract. Flies associated with decaying organic matter can bring important information in criminal investigations. Therefore, the correct identification of specimens is essential, although a small number of interspecific variation may be an obstacle to correct species diagnosis, including for specialists. In this way, molecular analyses can be very useful in precise determinations. This study aimed to analyze the potential use of DNA barcodes to identify species of Sarcophagidae of forensic importance to the southern region of Brazil. We used 40 adult individuals of the species *Helicobia aurescens*, *Oxysarcodexia culmiforceps*, *O. parva*, *Peckia (Pattonella) resona*, *Ravinia advena*, *R. belforti* and *Tricharea (Sarcophagula) Occidua*, sampled in a field experiment using pigs exposed in the Porto Alegre region, RS, Brazil. Fragments of the COI (cytochrome c oxidase subunit I) region of mitochondrial DNA of approximately 595bp length were obtained. The differences between the nucleotides were calculated using a K2P distance model and a phenogram was generated by the Neighbor-Joining algorithm. The intraspecific divergence ranged from zero to 1.8% and the interspecific divergence varied between 6.6 and 15.6%, being within the proposed thresholds. All specimens/species examined were grouped into their corresponding taxa. Thus, the use of DNA was reliable for the identification of flesh flies of forensic interest in the south of Brazil, being also an excellent alternative for identifying females and immature specimens, whose diagnosis can be more laborious considering that some of the latter specimens are yet to be described in the literature.

Key-words: fleshflies, COI, forensic entomology, necrophagous, post mortem interval

INTRODUÇÃO

A entomologia forense tem como principal objetivo prover informações relevantes para investigações criminais de forma a auxiliar na determinação de dados como tempo de morte, local, identidade da vítima e de suspeitos (Smith, 1986). Para isso, são utilizadas informações obtidas de análises da fauna cadavérica, principalmente de insetos necrófagos, que colonizam o indivíduo imediatamente após a sua morte (Catts & Goff, 1992). A identificação dessas espécies é o primeiro passo para obtenção de dados confiáveis que possam ser utilizados pelas autoridades policiais (Smith, 1986; Amorim *et al.*, 2014).

Sarcophagidae (Diptera) compreende mais de 3.000 espécies pertencentes a aproximadamente 173 gêneros, distribuídas mundialmente, sendo a maioria presente em regiões continentais quentes (Pape, 1996; Pape *et al.*, 2011). Muitas espécies de sarcófagídeos são necrófagas e seus ciclos de vida estão relacionados ao consumo de matéria orgânica em decomposição. Além disso, esses dípteros estão associados a todas as fases de decomposição e possuem a viviparidade como vantagem na competição pelo recurso, reforçando a importância forense deste grupo (Catts & Goff, 1992; Wells *et al.*, 2001; Byrd & Castner, 2009).

Contudo, a utilização de sarcófagídeos no âmbito forense é dificultada pela identificação morfológica das espécies, que se limita à observação da genitália masculina de indivíduos adultos (Carvalho & Mello-Patiu, 2008), que apresenta alta similaridade. Isso significa que a identificação de fêmeas e indivíduos em fases imaturas, que estão associados às carcaças, é comprometida. O uso de larvas exige a criação das formas imaturas até a emergência do adulto para a possibilidade de uma identificação taxonômica, e muitas vezes, em casos criminais, a rápida determinação é crucial para a investigação. Dessa forma, o uso dessas espécies para determinação de questões relacionadas a mortes violentas, como o intervalo pós-morte (IPM), torna-se limitado. Uma das alternativas encontradas é a utilização da caracterização molecular, tendo como objetivo eliminar problemas relacionados a determinação acurada a nível específico desses indivíduos baseado somente na taxonomia (Meiklejohn *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que o uso de sequências de DNA mitocondrial (DNAMt) pode ser utilizado com sucesso na distinção de espécies de Sarcophagidae (Wells *et al.*, 2001; Zehner *et al.*, 2004). A metodologia de *DNA barcode* utiliza uma pequena porção (658pb) da citocromo c oxidase subunidade I (COI) visando à identificação de espécies.

Nesse estudo foi analisado o potencial da aplicabilidade da metodologia de *DNA barcode* para identificação de espécies de sarcófagídeos associadas a carcaças suínas em decomposição em Porto Alegre, RS, Brasil, de forma a ampliar a base de dados existente facilitando a identificação de espécies crípticas de interesse forense.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Sarcofagídeos adultos foram coletados com frascos mortíferos em carcaças suínas expostas no município de Porto Alegre, sul do Brasil. Imediatamente após a coleta, os indivíduos foram armazenados em frascos com álcool 90%. Posteriormente, os espécimes machos foram identificados até nível específico por meio do uso de chaves taxonômicas (Carvalho e Mello-Patiu, 2008; Vairo *et al.*, 2011), e depositados na Coleção de Insetos de interesse forense do Museu de Ciências e Tecnologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Os indivíduos de sarcófagídeos foram acondicionados em álcool absoluto a uma temperatura de -20° C até que fossem procedidas as análises moleculares.

Extração, amplificação e sequenciamento do DNA

A extração do DNA foi conduzida utilizando o Kit *Dneasy Blood and Tissue* (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acordo com as instruções do protocolo do fabricante. Somente o tecido torácico dos espécimes machos identificados morfológicamente foram utilizados para extração do DNA. As partes remanescentes do corpo dos insetos foram armazenadas em etanol absoluto como *vouchers* e depositadas na seção Entomológica Forense da Coleção de Insetos do Museu de Ciências e Tecnologia (MCT) da PUCRS. A sequência parcial de COI foi amplificada utilizando os *primers* universais LCO1490/HCO2198 descritos por Folmer *et al.* (1994). As amplificações foram feitas em volumes finais de reação de 25µl, contendo 1 X PCR buffer, 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM de cada *primer*, 1U de Taq DNA polymerase (todos reagentes da Life Technologies, CA, USA). A concentração de todas as amostras de DNA foi aferida com Qubit Fluorometric Quantitation (Invitrogen); aproximadamente 25ng de DNA foram usados em cada reação de PCR. O ciclo de reação consistia em um passo inicial de 3 minutos a 95° C, seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 48° C e 1.5 minutos a 72° C. O último ciclo incluiu um passo de alongamento prolongado de 5 minutos a 72° C.

Os amplicons de PCR foram separados por eletroforese a concentração de 1% de gel agarose em solução tampão 1x TAE, corado com UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience) e visualizado sob luz ultravioleta. 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) foi utilizado para estimar o tamanho dos amplicons. O sequenciamento dos fragmentos amplificados por PCR utilizando o método de Sanger foi realizado pela empresa ACTGene (Porto Alegre, Brasil).

Análises de bioinformática

As sequências obtidas por meio do sequenciamento foram editadas com o uso do software Staden Package Gap4 (Staden, 1996), e comparadas com sequências homólogas de *COI* constadas no banco de

dados GenBank, através do BLASTn. Todas as sequências de sarcófagídeos resultantes desse estudo foram depositadas nos bancos de dados GenBank e *Barcode of Life Database System* (BOLD).

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o algoritmo ClustalW, inserido no programa Mega6 (Tamura *et al.*, 2013). Visto que a amplificação de pseudogenes mitocondriais de regiões de *DNA* nuclear (NUMTs) tem sido reportada em estudos com eucariotos, e sua presença causaria um viés nas análises de identificação de espécies, foram realizadas análises buscando a presença desses pseudogenes. Para isso, o protocolo descrito por Robe (2012) foi utilizado, sendo as análises realizadas no programa Mega6. A presença de *stop-codons* e mudanças na fase de leitura foram detectados. Possíveis condições de neutralidade das sequências foram identificadas a partir da razão entre o número de substituições não sinônimas e o número de substituições sinônimas, usando o método Nei-Gojobori (Nei & Gojobori, 1986). Em seguida, um teste Z baseado em códons foi realizado para rejeitar ou aceitar a hipótese de neutralidade ($dN=dS$) e, conseqüentemente, aceitar ou rejeitar a hipótese alternativa de seleção purificadora ($dN<dS$), com variância calculada por meio do teste de *bootstrap* (1000 réplicas).

A delimitação de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) para identificação de espécies foi realizada por meio de análises de monofilia e análises de divergência genéticas, como proposto por Hebert e colaboradores (2003a, b). O fenograma para a identificação das OTUs foi realizado no programa Mega6, seguindo o algoritmo Neighbour-Joining, e modelo de evolução de sequências Kimura-2-parâmetros (K2P) (Kimura, 1980), com 1000 réplicas de *bootstrap*. Valores de suporte inferiores a 50% não foram representados no fenograma. Sequências de *Chrysomya albiceps* e *Musca domestica* foram obtidas do GenBank e utilizadas como grupo externo. Já as distâncias genéticas pareadas foram analisadas através de comparações entre os valores de divergências genéticas interespecíficas e intraespecíficas. Esses cálculos também foram realizados no Mega6, seguindo o modelo K2P.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies analisadas nesse estudo são abundantes na região Neotropical e consideradas de interesse forense pela sua associação com carcaças expostas (Moura *et al.*, 1997; Barbosa *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2009; Vasconcelos *et al.*, 2015). As amostras foram previamente determinadas por entomologistas em sete diferentes espécies (*Helicobia aurescens*, *Oxysarcodexia culmiforceps*, *O. parva*, *Peckia (Pattonela) ressona*, *Ravinia advena*, *R. belforti* e *Tricharaea (Sarcophagula) occidua*) com uso de caracteres morfológicos para identificação. Um fragmento de 595pb do gene mitocondrial citocromo oxidase subunidade I (COI) foi sequenciado de 40 indivíduos pertencentes às sete espécies (tabela 1). O eletroferograma apresentou picos bem definidos e as sequências não apresentaram evidências de NUMTs a partir das análises realizadas. A composição de nucleotídeos apresentou uma frequência muito

maior de timinas e adeninas, sendo o conteúdo A+T do conjunto das sequências obtidas de 66,6%, enquanto citosinas e guaninas compuseram 17,7% e 15,7%, respectivamente. Essa composição é considerada típica para o DNAm de sarcófagídeos e outros dípteros (Nelson *et al.*, 2007; Meiklejohn *et al.*, 2011; Madeira *et al.*, 2016).

Tabela 1: Espécies e *vouchers* de indivíduos de sarcófagídeos utilizados no estudo, provenientes de amostragem com carcaças de suínos em ambiente rural no Sul do Brasil.

Espécies	Voucher	
<i>Helicobia aurescens</i> (Townsend, 1927)	Haurescens 19	
	Haurescens 20	
	Haurescens 21	
	Oculmiforceps 59	
	Oculmiforceps 116	
	Oculmiforceps 218	
	Oculmiforceps 309	
	Oculmiforceps 441	
	Oculmiforceps 515	
	Oculmiforceps 593	
<i>Oxysarcodexia culmiforceps</i> Dodge, 1966	Oculmiforceps 635	
	Oculmiforceps 704	
	<i>Oxysarcodexia parva</i> Lopes, 1946	Oparva 85
		Oparva435
	<i>Peckia (Pattonella) resona</i> Lopes, 1935	Presona 214
		Presona 280
		Presona 368
		Radvena 40
		Radvena 72
		Radvena 84
Radvena 126		
<i>Ravinia advena</i> Walker, 1853	Radvena 237	
	Radvena 243	
	Radvena 308	
	Radvena 536	
	Radvena 622	
	Radvena 637	
	Rbelforti 12	
	Rbelforti 60	
	Rbelforti 118	
	Rbelforti 242	
	Rbelforti 304	
	Rbelforti 378	
	Rbelforti 445	
Rbelforti 550		
Rbelforti 651		
Rbelforti 692		
<i>Ravinia belforti</i> (Prado & Fonseca, 1932)	Toccidua 31	
	Toccidua 32	
	Toccidua 124	
<i>Tricharaea (Sarcophagula) occidua</i> (Fabricius, 1794)		
<i>Chrysomya albiceps</i> (Wiedemann, 1819)	<i>Chrysomya albiceps</i> (JQ246659) ^{*, †, 1}	
<i>Musca domestica</i> Linnaeus, 1758	<i>Musca domestica</i> (JQ246703) ^{*, †, 1}	

* Sequência obtida do GenBank

† Grupo externo

¹ Marinho, M.A.T., Junqueira, A.C.M., Paulo, D.F., Esposito, M.C., Villet, M.H. & Azeeredo-Espin, A.M.L. (2012) Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calliphoridae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **65**, 840-854.

O fenograma obtido através do método de Neighbour-Joining (NJ) demonstrou que todas as sequências tiveram uma identificação molecular positiva em relação ao que já fora determinado morfológicamente (figura 1). As sequências formaram agrupamentos entre as espécies com valores suportados por *bootstrap* de 77 a 100% (figura 1), corroborando com as identificações morfológicas e demonstrando que o *barcode* provem informações suficientes para separar as espécies, mesmo as mais intimamente relacionadas como *Oxysarcodexia culmiforceps* e *O. parva*. Cabe ainda salientar que o objetivo do método não é a reconstrução de relação filogenéticas das espécies analisadas, e sim a delimitação dessas em agrupamentos através da similaridade obtida entre as sequências nucleotídicas.

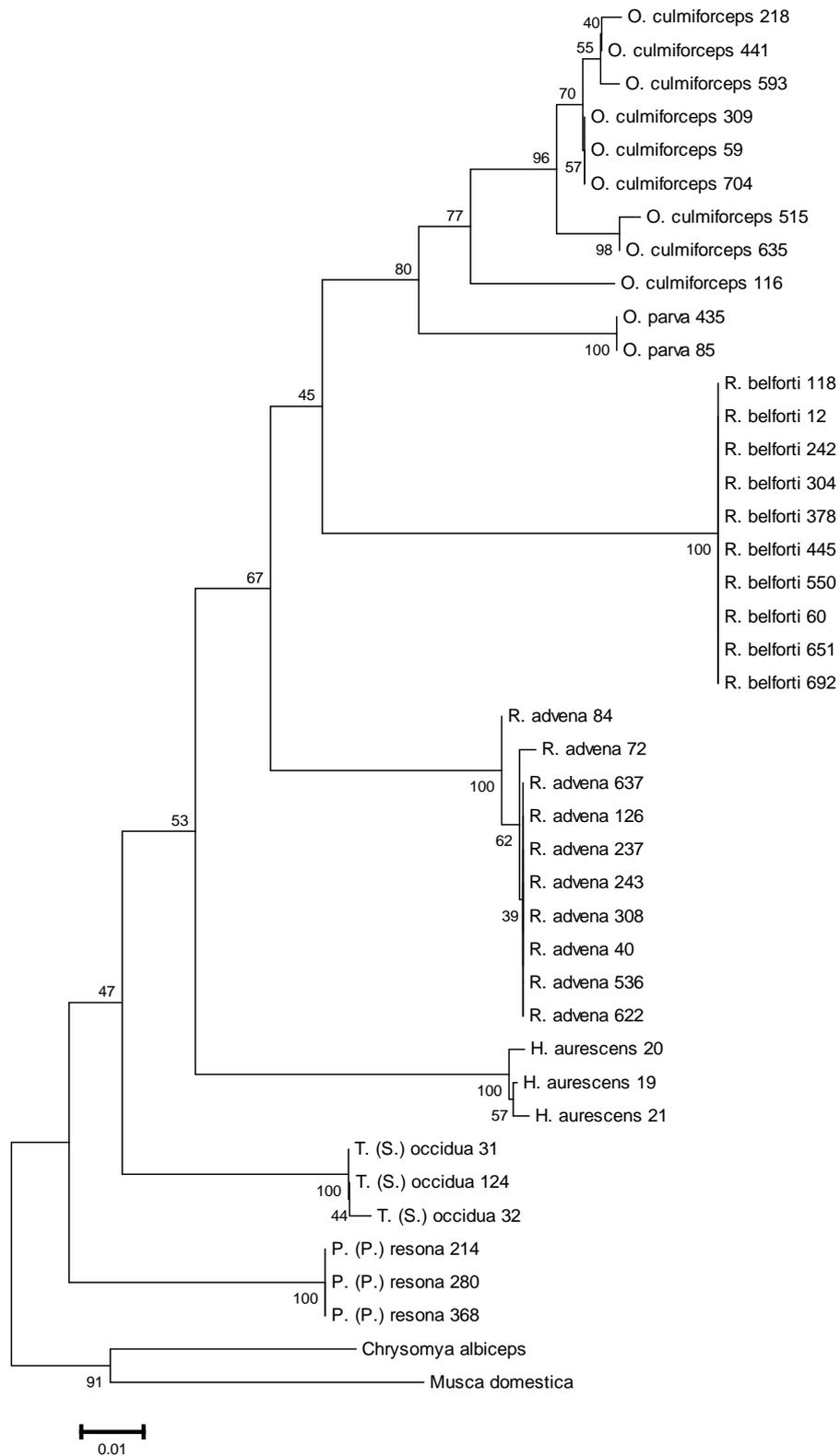


Figura 1: Fenograma obtido através do método Neighbour-Joining (NJ) utilizando dados de COI de espécies de Sarcophagidae de importância forense do Sul do Brasil. *Chrysomya albiceps* e *Musca domestica* foram tratadas como grupo externo. Os números dos ramos referem-se a suporte de nó (*bootstrap* de 1000 repetições). Valores de suporte abaixo de 50% não foram representados no fenograma.

A nível de espécie uma resolução bem sucedida para o *barcode* é obtida quando as divergências intraespecíficas (dentro da espécie) são menores que 3%, enquanto a variação interespecífica (entre espécies) deve ser maior que 3% (Hebert *et al.*, 2003a). Baixas divergências genéticas podem resultar em haplótipos similares, causando falhas de determinação nas espécies e consequentes erros na estimativa do tempo de morte em estudos forenses. As informações que foram obtidas para as espécies de interesse forense do Sul do Brasil propostas nesse trabalho encontram-se dentro desses limiares (figura 2), demonstrando a formação de um *barcode gap*, ou seja, uma clara delimitação entre as divergências intra e interespecíficas entre as sequências. Analisando a divergência genética dentro das espécies os valores variaram de 0 a 1,8%, sendo a média entre esses valores de 0,4% (tabela S1 do material suplementar). De forma geral, a média obtida e os baixos valores de divergência da maioria das espécies observadas confirmam que os agrupamentos de espécies estão bem definidos. Apesar do valor de referência para espécies do gênero *Oxysarcodexia* estabelecido pelo BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007) ser próximo de 1%, e da literatura apoiar a baixa variação genética do grupo (Meiklejohn *et al.*, 2012), *O. culmiforceps* apresentou uma divergência intraespecífica relativamente maior do que as demais espécies (1,8%). Ainda assim, pode-se afirmar que os indivíduos analisados pertencem à mesma espécie, visto que o valor de divergência observado para o grupo nesse estudo é inferior ao proposto pelo método *barcode* (3%), e por sua alta diversidade genética em comparação às demais espécies já ter sido observada em estudos anteriores (Madeira *et al.*, 2016).

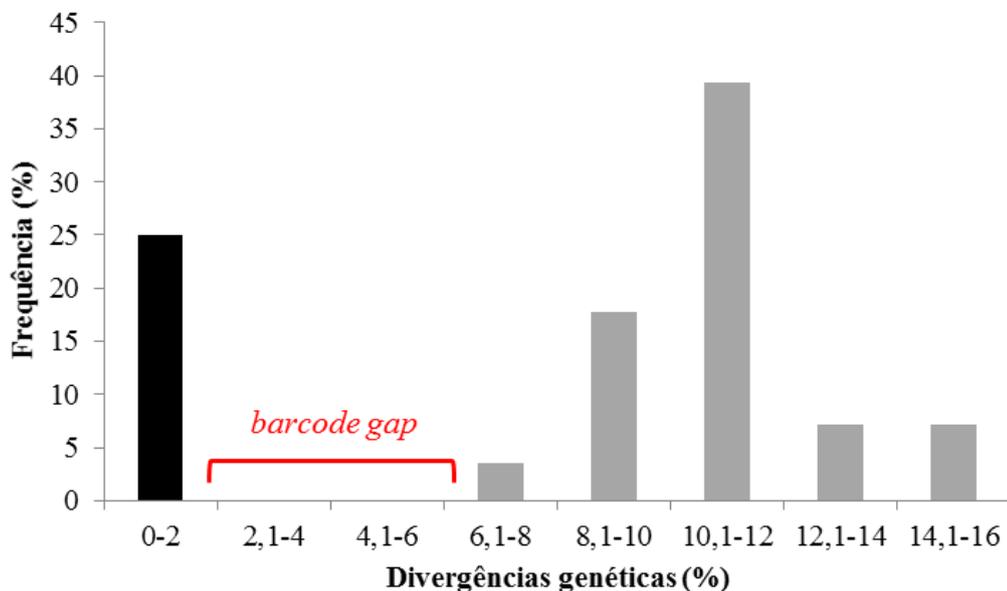


Figura 2: Histograma de distâncias genéticas intraespecíficas (preto) e interespecíficas (cinza) de sete espécies de sarcófagídeos. O erro padrão foi estimado através de 1000 réplicas de *bootstrap*.

Os valores observados para a divergência interespecífica variaram de 6,6 a 15,6% (média de 11%) (tabela S2 do material suplementar). O valor mais baixo encontrado refere-se à diferença genética entre as duas espécies de *Oxysarcodexia* abordadas no estudo, e mesmo assim mostra-se como um valor efetivo na separação dessas espécies. A maior divergência observada foi entre as espécies *Helicobia aurescens* e *Ravinia belforti*. Dessa forma, as variações observadas em *O. culmiforceps* sugerem maior diversidade (variabilidade genética) dentro do táxon, enquanto espécies de *H. aurescens* e *R. belforti* parecem taxonomicamente bem estabelecidas.

Dessa forma, o uso do COI mostrou-se eficaz para a identificação de sarcófagídeos de interesse forense no Sul do Brasil, assim como já observado em pesquisas semelhantes (Saigusa *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2012), apresentando potencial similar ao método morfológico que exige conhecimento aprofundado na taxonomia do grupo. O uso desse fragmento é rápido, fácil e econômico, apresentando-se como uma ferramenta eficaz para pesquisadores forenses nas suas rotinas de estudo. A diversidade de espécies coletadas junto a corpos em decomposição é um obstáculo para a determinação de questões relacionadas ao âmbito legal devido às limitações na identificação taxonômica (Nelson *et al.*, 2007). O uso da identificação molecular para diferenciação de espécies de todas as fases de vida, ou ainda insetos fragmentados, pode facilitar o uso das evidências entomológicas na prática forense.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Adriana Giongo e Letícia Marconatto do Instituto do Petróleo e Recursos Naturais (IPR) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e à Bárbara B. Calegari, pesquisadora colaboradora do Laboratório de Ictiologia do Museu de Ciências e Tecnologia (MCT) da PUCRS pelo auxílio técnico. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudo a primeira autora.

REFERÊNCIAS

- Amorim, J.A., Souza, C.M. & Thyssen, P.J. (2014) Molecular characterization of *Peckia* (*Pattonella*) *intermutans* (Walker, 1861) (Diptera: Sarcophagidae) based on the partial sequences of the mitochondrial cytochrome oxidase I Gene. *Journal of Forensic Research*, **5**, 227.
- Barbosa, R.R., Mello-Patiu, C.A., Mello, R.P. & Queiroz, M.M.C. (2009) New records of calyptrate dipterans (Fanniidae, Muscidae and Sarcophagidae) associated with the decomposition of domestic pigs in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **104**, 923-926.
- Byrd, J.H. & Castner, J.L. (2009) Insects of forensic importance. *Forensic Entomology – The Utility of Arthropods in Legal Investigations*, pp. 39—127. CRC Press, Boca Raton.
- Carvalho, C.J.B. & Mello-Patiu, C.A. (2008) Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, **52**, 390-406.
- Catts, E.P. & Goff, M.L. (1992) Forensic entomology in criminal investigations. *Annual Review of Entomology*, **37**, 253-272.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijgenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294-299.
- Guo, Y.D., Cai, J.F., Meng, F.M., Chang, Y.F., Gu, Y, Lan, L.M., Liang, L. & wen, J.F. (2012) Identification of forensically important flesh flies based on a shorter fragment of the cytochrome oxidase subunit I gene in China. *Medical and Veterinary Entomology*, **26**, 307-313.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & Waard, J.R. (2003a) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B Biology Sciences*, **270**, 313-322.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. & Waard, J.R. (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society: Biology letters*, **270**, S96-S99.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.

- Madeira, T., Souza, C.M., Cordeiro, J. & Thyssen, P.J. (2016) The use of DNA barcode for identifying species of *Oxysarcodexia* Townsend (Diptera: Sarcophagidae): a preliminary survey. *Acta Tropica*, **161**, 73-78.
- Meiklejohn, K.A., Wallman, J.F., Cameron, S.L. & Dowton, M. (2012) Comprehensive evaluation of DNA barcoding for the molecular species identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *Invertebrate Systematics*, **26**, 515-525.
- Meiklejohn, K.A., Wallman, J.F. & Dowton, M. (2011) DNA-based identification of forensically important Australian Sarcophagidae (Diptera). *International Journal of Legal Medicine*, **125**, 27-32.
- Moura, M.O., Carvalho, C.J.B. & Monteiro-Filho, E.L.A. (1997) A preliminary analysis of insects of Medico-Legal importance in Curitiba, State of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **92**, 269-274.
- Nei, M. & Gojobori, T. (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular biology and evolution*, **3**, 418-426.
- Nelson, L.A., Wallman, J.F. & Dowton, M. (2007) Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*, **21**, 44-52.
- Pape, T., Blagoderov, V. & Mostovski, M.B. (2011) Order Diptera Linnaeus, 1758 *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. pp. 222–229. Zootaxa, 3148.
- Pape, T. (1996) *Catalogue of the Sarcophagidae of the World (Insecta: Diptera)*. Associated Publishers, Gainesville.
- Ratnasingham, S., Hebert, P.D.N., (2007). BOLD: the barcode of life data system. *Mol.Ecol. Notes* 7, 355–364 <http://www.barcodinglife.org>
- Robe, L.J., Machado, S. & Bartholomei-Santos, M.L. (2012) The DNA Barcoding and the caveats with respect to its application to some species of Palaemonidae (Crustacea, Decapoda). *Zoological Science*, **29**, 714-724.
- Rosa, T.A., Babata, M.L.Y., Souza, C.M., Sousa, D., Mello-Patiu, C.A., Vaz-de-Mello, F.Z. & Mendes, J. (2009) Arthropods associated with pig carrion in two vegetation profiles of Cerrado in the State of Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **55**, 424-434.

- Saigusa, K., Takamiya, M. & Aoky, Y. (2005) Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. *Legal Medicine*, **7**, 175-178.
- Smith, K.G.V. (1986) *A Manual of Forensic Entomology*. British Museum, London.
- Staden, R. (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular biotechnology*, **5**, 233-241.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725-2729.
- Vairo, K.P., Mello-Patiu, C.A. & Carvalho, C.J.B. (2011) Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, **55**, 333-347.
- Vasconcelos, S.D., Barbosa, T.M. & Oliveira, T.P.B. (2015) Diversity of forensically-important Dipteran species in different environments in Northeastern Brazil, with notes on the attractiveness of animal baits. *Florida Entomologist*, **98**, 770-775.
- Wells, J.D., Pape, T. & Sperling, F.A.H. (2001) DNA-based identification and molecular systematics of forensically important Sarcophagidae (Diptera). *Journal of Forensic Science*, **46**, 1098-1102.
- Zehner, R., Amendt, J., Schütt, S., Sauer, J., Krettek, R. & Povolný, D. (2004) Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *International Journal of Legal Medicine*, **118**, 245-247.

Tabela S1: Divergências genéticas intraespecíficas (d em %) e erro padrão para espécies de interesse forense de Sarcophagidae do Sul do Brasil, obtidos através de uma comparação pareada, utilizando o modelo de evolução de sequências K2P (Kimura, 1980)

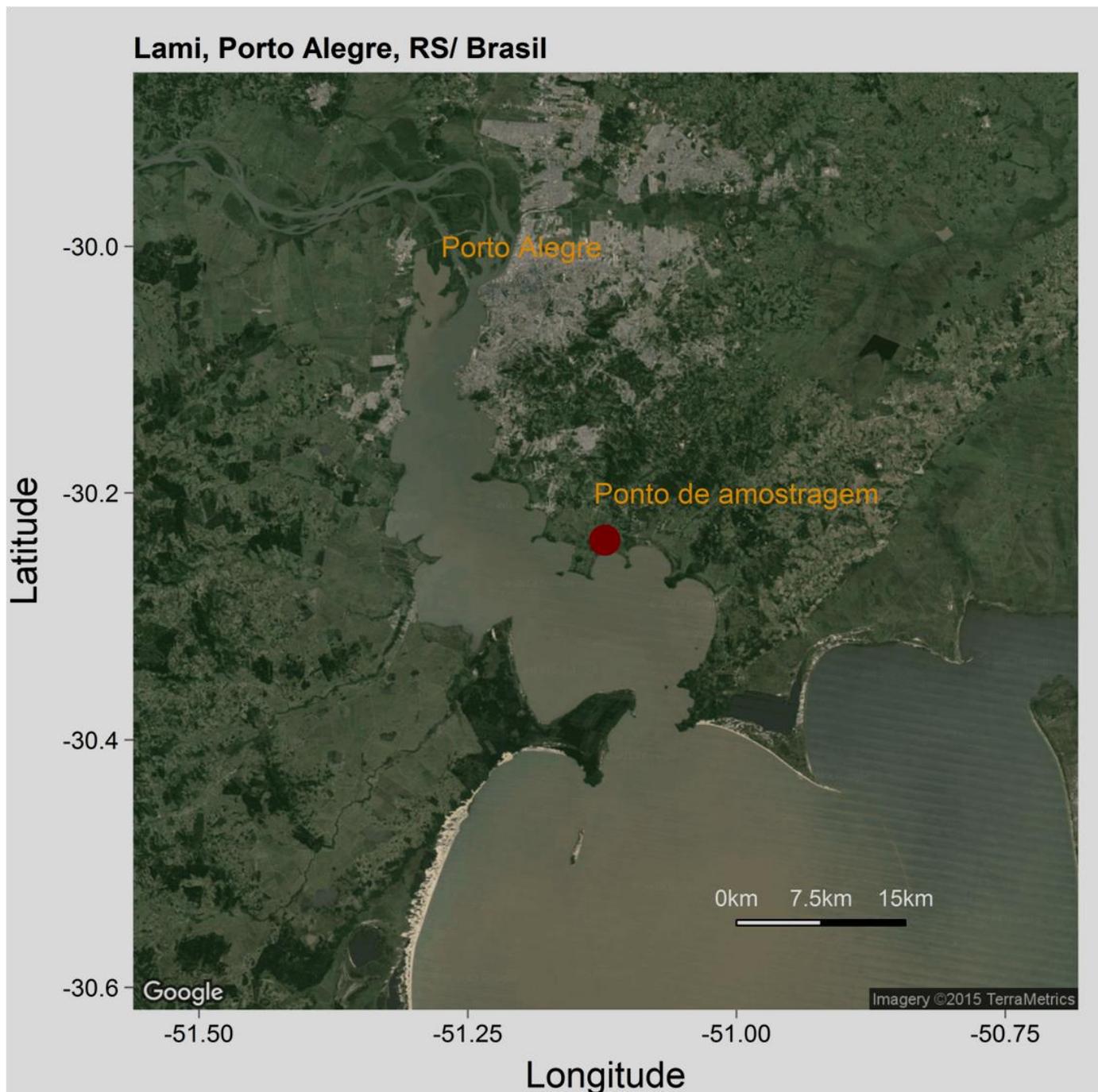
Espécies	d	Erro Padrão
<i>Helicobia aurescens</i>	0,4	0,3
<i>Oxysarcodexia culmiforceps</i>	1,8	0,4
<i>Oxysarcodexia parva</i>	0,0	0,0
<i>Peckia (Pattonella) resona</i>	0,0	0,0
<i>Ravinia advena</i>	0,1	0,1
<i>Ravinia belforti</i>	0,0	0,0
<i>Tricharaea (Sarcophagula) occidua</i>	0,2	0,2

Tabela S2: Divergências interespecíficas de espécies de Sarcophagidae de interesse forense do Sul do Brasil (%), obtidos através de uma comparação pareada, utilizando o modelo de evolução de sequências K2P (Kimura, 1980). As estimativas de erro padrão (%) são mostradas acima da diagonal. A análise envolveu 40 sequências nucleotídicas. Todas as posições que continham *gaps* ou dados faltantes foram eliminadas. Houve um total de 319 posições no conjunto de dados final. As análises foram realizadas no MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013).

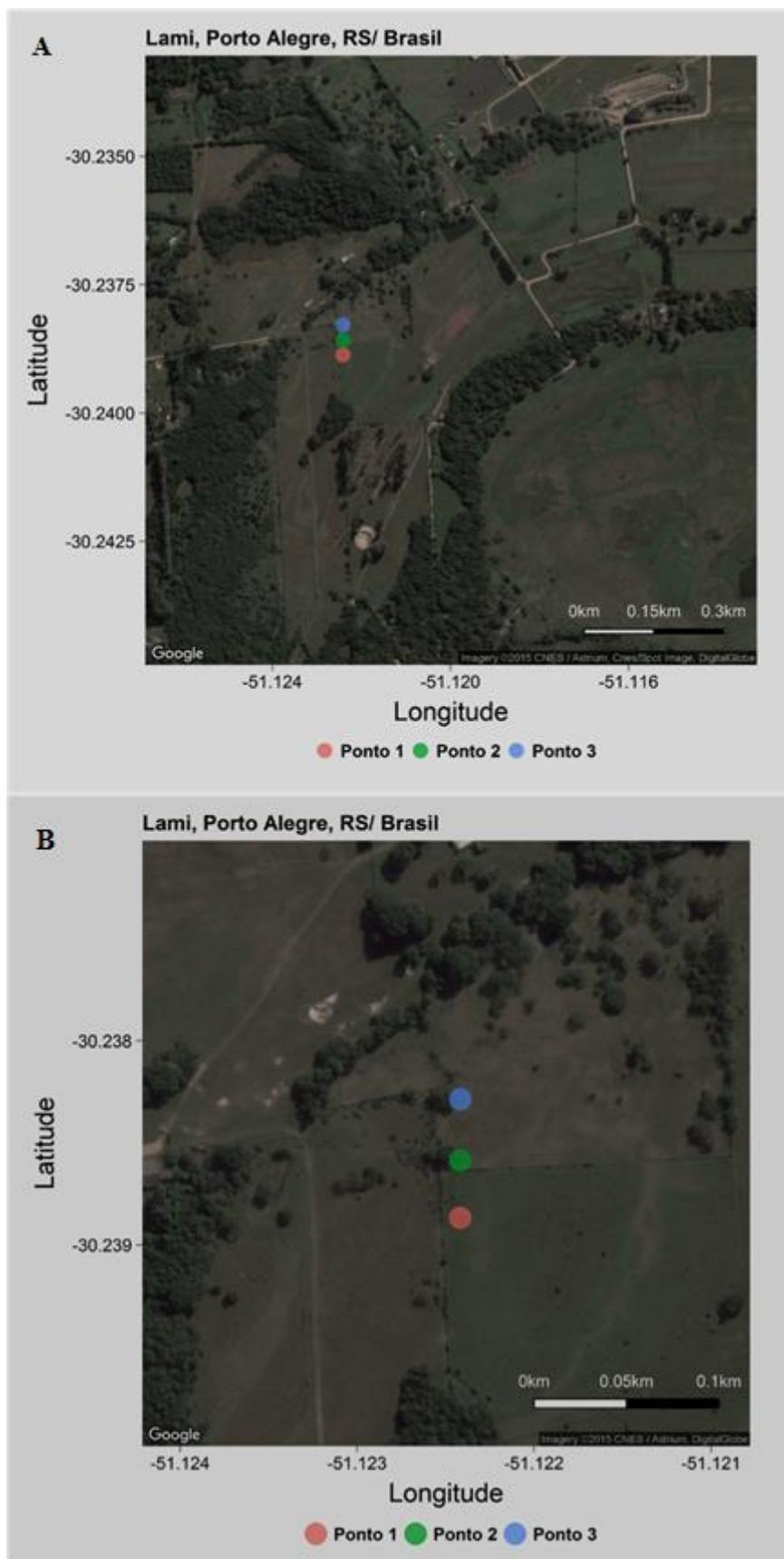
Espécies	01	02	03	04	05	06	07
01 <i>Helicobia aurescens</i>		2,1	2,0	1,9	1,8	2,3	1,9
02 <i>Oxysarcodexia culmiforceps</i>	12,9		1,4	2,0	1,7	1,7	1,8
03 <i>Oxysarcodexia parva</i>	11,8	6,6		2,0	1,9	2,0	1,8
04 <i>Peckia (Pattonella) resona</i>	11,0	11,5	11,5		1,9	2,0	1,8
05 <i>Ravinia advena</i>	10,3	9,5	9,7	11,5		1,9	1,8
06 <i>Ravinia belforti</i>	15,6	10,3	11,3	12,3	11,2		2,2
07 <i>Tricharaea (Sarcophagula) occidua</i>	10,9	9,9	9,9	9,5	10,2	14,6	

APÊNDICES

Apêndice I – Localização geográfica do local de amostragem, no bairro Lami, extremo sul do município de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.



Apêndice II – Pontos de localização (em cores) das carcaças de suínos expostos no campo (A), e detalhe do distanciamento das armadilhas/carcaças (B).



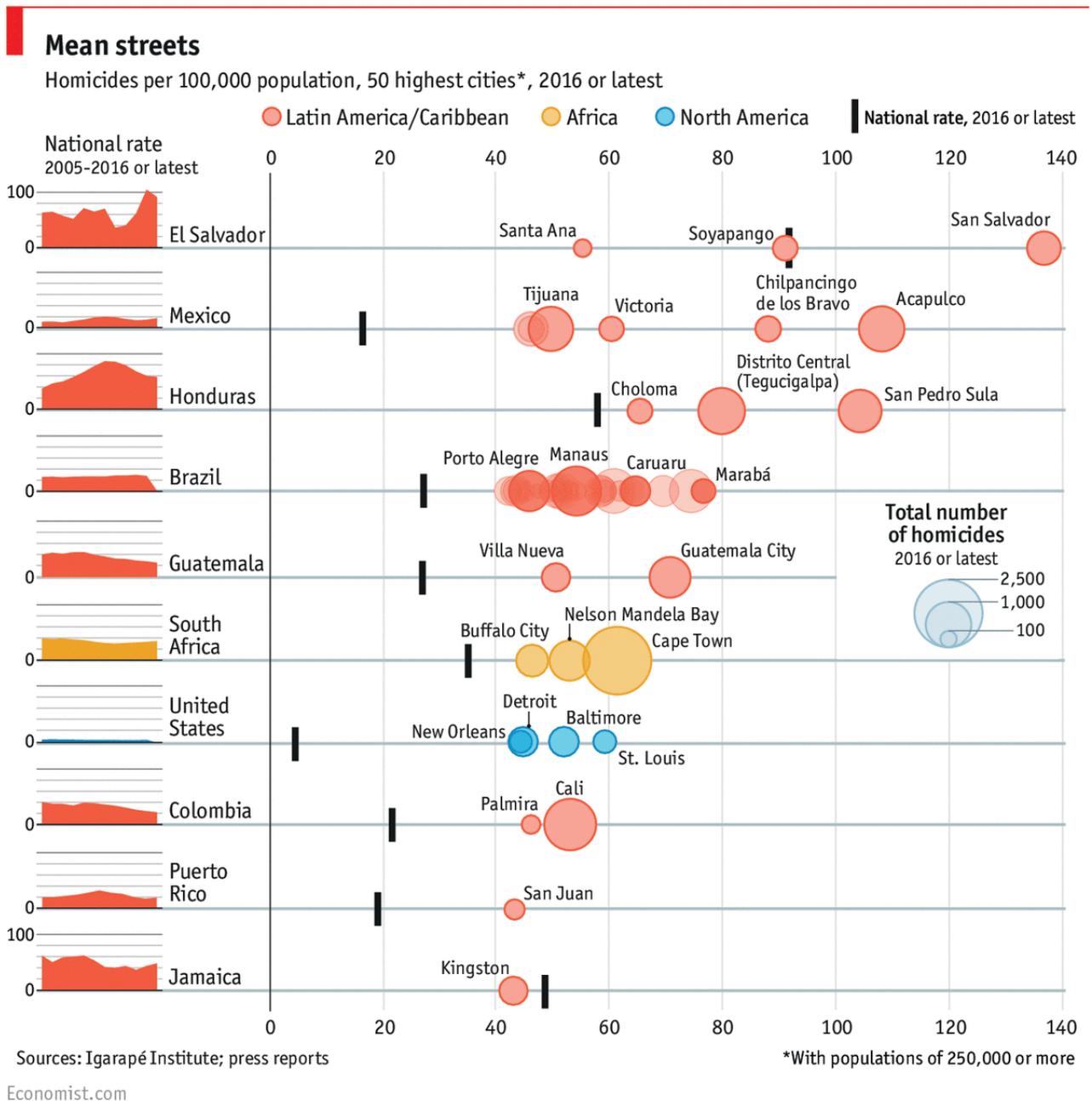
Apêndice III – Dados meteorológicos médios obtidos da estação do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) na estação quente e seca (janeiro), na região de Porto Alegre, Sul do Brasil.

Dia (n)	Data	Estágio	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
1	14.01	Fresco	26,5	71	1,3
2	15.01	Gasoso	22,1	93	8,3
3	16.01	Gasoso	27	69	3,5
4	17.01	Avançado	28,3	62	0
5	18.01	Avançado	30	54	0
6	19.01	Avançado	29,9	45	0
7	20.01	Seco	36,9	31	0
8	21.01	Seco	37,1	35	0
9	22.01	Seco	36,4	45	0
10	23.01	Seco	36,1	48	0

Apêndice IV – Dados meteorológicos médios obtidos da estação do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) na estação fria e úmida (setembro/outubro), na região de Porto Alegre, Sul do Brasil.

Dia (n)	Data	Estágio	Temperatura (°C)	Umidade (%)	Precipitação (mm)
1	01.09	Fresco	20,2	82	0
2	02.09	Fresco	15,2	92	0
3	03.09	Fresco	18,4	82	27,6
4	04.09	Gasoso	18,5	77	0
5	05.09	Gasoso	18,9	74	0
6	06.09	Gasoso	18,2	81	0
7	07.09	Gasoso	17	88	14,1
8	08.09	Gasoso	20	81	0
9	09.09	Gasoso	25,8	70	0
10	10.09	Avançado	19,3	85	0
11	11.09	Avançado	14,1	90	36,8
12	12.09	Avançado	15,7	90	19,7
13	13.09	Avançado	21,4	83	8,3
14	14.09	Avançado	25,4	65	0
15	15.09	Avançado	20,3	85	16,6
16	16.09	Avançado	17,5	76	1
17	17.09	Avançado	17,5	75	0
18	18.09	Avançado	18,5	76	0
19	19.09	Avançado	21,7	78	0
20	20.09	Avançado	21,9	78	0,4
21	21.09	Avançado	17,1	82	0
22	22.09	Avançado	18,4	74	0,6
23	23.09	Avançado	21,7	63	0
24	24.09	Avançado	21,2	78	0,9
25	25.09	Avançado	21,6	74	0
26	26.09	Avançado	20,4	80	21,3
27	27.09	Seco	17,7	70	0
28	28.09	Seco	18,5	78	0
29	29.09	Seco	21,9	90	6,8
30	30.09	Seco	19,1	86	0,1
31	01.10	Seco	19,3	80	7,2
32	02.10	Seco	17,6	71	0
33	03.10	Seco	18,5	67	0
34	04.10	Seco	19,5	67	0

Apêndice V – Dados publicados pela revista britânica The Economist. Porto Alegre figura entre as 50 cidades com maior número de homicídios do mundo em 2016, segundo pesquisa do Instituto Igarapé.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Quatro estágios de decomposição foram observados nas carcaças nas duas estações. Sendo a rápida decomposição observada na estação quente e seca típica de biomas tropicais, onde as altas temperaturas e baixa umidade contribuem para acelerar o processo químico e físico, mediado por insetos e microorganismos.
- Os fatores bióticos (fases de decomposição, dias de exposição, competição) e abióticos (temperatura, umidade, precipitação) demonstraram ter influência sobre a decomposição da carcaça, como também na composição e abundância da entomofauna decompositora. Dessa forma, a ocorrência das espécies envolvidas de cada família, tanto de dípteros quanto de coleópteros, dependeu da estação e condições ambientais relacionadas.
- Os dípteros apresentaram preferências pelo estágio de decomposição gasoso (II) e avançado (III), em ambas as estações. Enquanto coleópteros aumentaram sua ocorrência a partir do estágio avançado da decomposição.
- Apesar da elevada diversidade de moscas necrófagas observada visitando a carcaça, nem todas a utilizaram para seu desenvolvimento, ou seja, criaram-se na carcaça. Evidenciando que cada espécie possui uma habilidade para exploração do recurso, fato relacionado a sua categoria ecológica na maioria das vezes.
- A composição de dípteros necrófagos difere entre os períodos estacionais estudados, sendo observada a ocorrência de espécies sazonais, com preferência por uma estação.
- As espécies invasoras de Calliphoridae (*Chrysomya albiceps*, *C. megacephala* e *C. putoria*) foram dominantes sobre as demais (*Hemilucilia segmentaria* e *H. semidiaphana*). Contudo observaram-se espécies de ambas se criando na carcaça, com clara prevalência de *C. albiceps*, resultado que provavelmente pode estar relacionado ao seu hábito predador durante a fase larval.
- Em Muscidae, somente *Ophyra aenescens* pode ser considerada uma boa indicadora forense para estações frias e úmidas, uma vez que foi a única espécie da família que se criou em carcaças de suínos. Já em Sarcophagidae, podemos indicar *Microcerella halli*, tendo se criado também na estação fria e úmida.
- Relativo a coleopterofauna amostrada, na estação quente e seca houve a prevalência de indivíduos de Chrysomelidae. Esse fato diverge dos demais estudos, e a hipótese aventada para tal resultado tem a ver com as altas temperaturas do solo, que impossibilitam o estabelecimento de outros besouros necrófagos.
- Já na estação seguinte (fria e úmida) os resultados corroboram com demais estudos na região Neotropical, evidenciando a dominância de *Dermestes maculatus*, *Euspilotus azureus* e *Oxelytrum discicolle* associados às carcaças, reforçando sua relevância para estudos forenses.

- O método Barcode mostrou-se eficiente na identificação molecular das sete espécies relatadas no trabalho. A divergência intraespecífica está dentro dos limiares propostos e todas as espécies identificadas morfologicamente tiveram sua identificação molecular nos mesmos agrupamentos.