

## ECOLOGY, BEHAVIOR AND BIONOMICS

## Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense

DORA A ESTRADA<sup>1</sup>, MAICON D GRELLA<sup>1</sup>, PATRICIA J THYSSEN<sup>2</sup>, ARÍCIO X LINHARES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Parasitologia, Instituto de Biologia, Univ. Estadual de Campinas (UNICAMP), C. postal 6109, 13083-970, Campinas, SP; daes02@yahoo.com.br; grellamd@yahoo.com.br; aricio@unicamp.br; <sup>2</sup>Depto. de Parasitologia, Instituto de Biociências, Univ. Estadual Paulista (UNESP), 18.618-000, Botucatu, SP; thyssenpj@yahoo.com.br

Editado por Álvaro E. Eiras – UFMG

*Neotropical Entomology* 38(2):203-207 (2009)

*Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) Developmental Rate on Artificial Diet with Animal Tissues for Forensic Purpose

**ABSTRACT** - Forensic entomology uses biological and ecological aspects of necrophagous insects to help in criminal investigations to estimate the post-mortem interval (PMI) or to determine the cause of death. Recent papers demonstrated that the presence of toxins in decomposing tissues may alter the insect developmental rate of insects exploiting such tissues as food. Thus, preliminary tests with artificial diets in laboratory are necessary to create a database to investigate and quantify the modifications that can occur with the collected insects from a criminal scene, avoiding any errors on the PMI estimates. The present study aimed to evaluate the developmental rate of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) reared on: a) artificial diets containing animal tissues: bovine liver (D1), raw muscle (D2), stomach (D3), and chicken heart (D4); b) artificial diet without animal tissue (D5); and c) a control group (C), which had only meat. The efficiency of each substrate was assessed by immature weight gain (mg), larval developmental time, larval and pupal survival, emergence interval and adult size. D1 to D4 diets did not restrict *C. albiceps* development; however, larvae reared on D1 and D2 diets presented a lower adult emergence rate. D3 and control group showed similarities regarding the efficiency parameters (rate and emergence interval). Thus, the use of diet D3, artificial diet with stomach, is the most recommended.

**KEY WORDS:** Nutritional source, immature rearing, blowfly, forensic entomology

**RESUMO** - A entomologia forense utiliza dados biológicos e ecológicos de insetos necrófagos com o objetivo de auxiliar as investigações criminais, na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) ou na descoberta da causa da morte. Trabalhos recentes têm demonstrado que a presença de toxinas nos tecidos em decomposição pode alterar a taxa de desenvolvimento de insetos que usam esse recurso. Assim, testes preliminares usando dietas artificiais em laboratório são necessários para a criação de um banco de dados como padrão para investigar e quantificar as possíveis modificações em insetos coletados da cena criminal, para não gerar dados imprecisos sobre o IPM. No presente estudo objetivou-se avaliar a taxa de desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) criados em diferentes substratos: a) dietas artificiais contendo tecido de origem animal: fígado (D1), músculo moído (D2) e rúmen (D3) bovinos, além de coração de frango (D4); b) dieta sem tecido animal (D5) e; c) um grupo controle (C), somente em carne bovina. A eficiência de cada substrato foi observada pelo ganho de massa dos imaturos, tempo de desenvolvimento larval, sobrevivência larval e pupal, intervalo de emergência e tamanho dos adultos. As dietas D1 a D4 não restringiram o desenvolvimento larval de *C. albiceps*, no entanto, D1 e D2 apresentaram baixa emergência de adultos. D3 e o grupo controle foram muito similares em relação a alguns fatores de eficiência (taxa e intervalo de emergência). Assim, o uso da dieta D3, dieta artificial mais rúmen de bovinos é o mais recomendado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fonte nutricional, criação de imaturos, varejeira, entomologia forense

As dietas artificiais para criação e manutenção de insetos em laboratório têm aplicações tanto na pesquisa básica quanto na aplicada. Na literatura são encontrados diferentes tipos de dietas artificiais para mais de 1300 espécies de insetos, sendo que mais de 200 referem-se somente à criação de dípteros de importância agrícola (Singh & Moore 1985). Entretanto, o número de trabalhos destacando o desenvolvimento e o aperfeiçoamento das dietas artificiais é pequeno, principalmente para alguns grupos de insetos que apresentam dificuldade natural para serem mantidos em criação no laboratório (D'Almeida & Oliveira 2002).

*Chrysomya albiceps* (Wiedemann), conhecida popularmente como varejeira, foi introduzida no Brasil a partir da década de 70 (Guimarães et al 1978) e, atualmente, encontra-se distribuída em quase todo o território nacional dada sua considerável habilidade de dispersão e adaptação, e ganhando importância na área econômica por estar associada a quadros de miases (Guimarães et al 1979).

Em diversos levantamentos realizados na região de Campinas, SP, utilizando carcaças de animais como iscas (Mendes & Linhares 1993, Souza & Linhares 1997, Carvalho et al 2004) e nas coletas em cadáveres no Instituto Médico Legal (Carvalho et al 2000), ela foi a espécie predominante entre os dípteros coletados, devido à sua abundância e à frequência com que explora esse tipo de recurso. Zumpt (1965) a caracterizou como especialista, por ela utilizar apenas um tipo de substrato para criação de suas larvas, nesse caso, material de origem animal em decomposição. Além disso, é um dos primeiros insetos a colonizar os corpos em decomposição (Carvalho et al 2004), demonstrando o seu grande potencial para uso como vestígio dentro das peças periciais.

Na maioria das vezes, há dificuldade de adaptação dessa espécie a uma dieta específica, o que mostra seu alto grau de especialização. Dada a inexistência de um meio universal, que possibilite a manutenção da maioria dos necrófagos coletados nos corpos em decomposição, juntamente com a necessidade de investigar o tempo ou a causa do óbito em casos de crimes violentos, somente a carne pura é eleita para utilização como substrato de criação e desenvolvimento de imaturos. Porém, um dos grandes problemas acarretados é o odor característico de matéria orgânica em decomposição, bastante desagradável no local em que as amostras são depositadas, além da maior possibilidade de contaminação secundária por insetos atraídos para esses recintos.

A Entomotoxicologia, uma área recente dentro da Entomologia Forense, vem mostrando que certas substâncias, especialmente aquelas ligadas à alimentação, podem afetar a taxa de desenvolvimento de insetos necrófagos, uma vez que ao ingerir os tecidos, essas substâncias são introduzidas no seu organismo (Introna et al 2001). Desse modo, a investigação dos efeitos causados por certas substâncias no desenvolvimento de insetos deve ser levada em conta, visto que, gerando dados imprecisos sobre a sua idade, podem prejudicar a estimativa do intervalo pós-morte (IPM), quando esta é baseada no aspecto biológico, ou seja, no período de desenvolvimento dos insetos.

Não há dúvida de que testes preliminares são cruciais para investigar e quantificar esses efeitos, assim como, a criação de um banco de dados que possa ser útil na prática forense. Por

isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a taxa de desenvolvimento pós-embrionário de *C. albiceps* em dietas artificiais, preparadas com diferentes tecidos animais (fígado, rúmen e músculo bovino ou coração de frango).

## Material e Métodos

**Obtenção dos exemplares para o estudo.** A coleta de espécimes adultos foi realizada em ambiente urbano no município de Campinas, SP, utilizando armadilhas apropriadas e modificadas a partir da proposta por Ferreira (1978). As armadilhas continham como iscas fígado bovino, peixe e vísceras de frango, expostas no ambiente por 24h. Após a coleta, os espécimes foram anestesiados durante 90 segundos a -20 °C, em laboratório, para permitir sua correta identificação (Dear 1985).

Após a identificação, os insetos foram transferidos para gaiolas plásticas transparentes (30 x 30 x 50 cm), mantidas em sala climatizada (27 ± 1°C, fotofase de 12h e 70 ± 10% de UR). Os adultos foram alimentados com solução açucarada, além de fígado bovino cru para maturação de seus folículos ovarianos. Para obtenção dos ovos foram colocados aproximadamente 50 g de carne bovina moída crua.

Os ovos foram retirados cuidadosamente da carne com auxílio de um pincel fino, mantidos em papel de filtro umedecido com água destilada e contados sob microscópio estereoscópico. Após terem sido depositados sobre os diferentes tipos de dietas para evitar dessecação, foi avaliada a porcentagem de eclosão em cada recipiente.

**Descrição das dietas e montagem do experimento.** Foram testados cinco tipos de dietas, com e sem acréscimo de tecidos animais, comparando a eficiência de cada uma para o desenvolvimento dos imaturos em relação a um grupo controle, mantido somente em carne bovina moída (Tabela 1).

O preparo das dietas consistiu em misturar o tecido animal

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

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

<sup>1</sup>Proposta por Leal et al 1982.

<sup>2</sup>A quantidade dos outros componentes (leite, levedo de cerveja e caseína) é semelhante à usada nas demais dietas.

fresco adquirido em mercado varejista a uma parte de água destilada até a completa homogeneização em liquidificador, sendo depois acrescidos os demais componentes básicos à mistura, exceto o agar, que foi preparado com 330 ml de água aquecida a uma temperatura próxima da fervura. Em seguida, o agar preparado foi misturado aos demais componentes, homogeneizando-se o meio pela última vez. Cada tipo de dieta foi usado, no máximo, 30 min após o seu preparo.

Os testes foram realizados com 450 ovos divididos em três réplicas, mantendo a proporção de 1 g de alimento para cada larva eclodida. Essa proporção foi selecionada a partir do estudo elaborado por Godoy *et al* (2001), os quais observaram que adultos, cujos imaturos foram criados em seis densidades diferentes, tiveram o melhor índice de sobrevivência e fecundidade em densidades entre 100 e 200 larvas por recipiente. Todos os imaturos foram mantidos em câmara BOD, sob temperatura controlada de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , fotofase de 12h e  $70 \pm 10\%$  de UR.

**Parâmetros biológicos.** A eficiência de cada dieta foi observada levando-se em conta o ganho de peso dos imaturos (mg), o tempo de desenvolvimento larval (h), a sobrevivência larval e pupal (%), o intervalo de emergência (h) e o tamanho dos adultos.

O ganho de peso foi determinado em larvas a cada 12h após a eclosão até a transformação em pupas. Os resíduos de dieta foram removidos de todos os espécimes após lavagem e secagem em papel de filtro e o peso determinado em balança analítica. Dez espécimes eram retirados de duas réplicas, entre aqueles que se apresentavam mais na superfície do meio para não alterar a consistência da dieta, pesados individualmente e devolvidos ao substrato.

Para observação dos demais parâmetros descritos anteriormente, uma das réplicas foi mantida sob as mesmas condições que as outras, porém livre de manipulação e da retirada de quaisquer amostras, aguardando apenas o abandono natural das larvas de cada tipo de dieta para efetuar as contagens.

**Análise estatística.** O teste de Duncan para comparações múltiplas foi utilizado para avaliar a ocorrência de diferenças entre as médias observadas para o ganho de peso apenas dos imaturos que se encontravam na fase de pré-pupa (os quais abandonam o recurso espontaneamente) para cada tipo de dieta. A análise foi feita utilizando o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS® (SAS Inc. 2006).

## Resultados e Discussão

Ao desenvolver dietas artificiais em laboratório, deve-se sempre considerar, além dos aspectos nutricionais importantes para o desenvolvimento do inseto, as características que regem as exigências físicas, químicas e biológicas durante a alimentação. Parra (1990) destaca serem importantes para os insetos os aspectos de dureza, textura, homogeneização e conteúdo de água presente nas dietas. Todas as dietas desenvolvidas neste trabalho apresentaram as condições minimamente suficientes para a análise dessas exigências.

A consistência das dietas foi estabelecida com equilíbrio

entre as porcentagens de água presente e as características de cada tecido. As dietas D1 e D2 apresentaram características pastosas, embora D2 tenha sido mais consistente, provavelmente pelo fato de o fígado não apresentar a mesma quantidade de fibras musculares que o músculo bovino. D3 e D4 apresentaram textura de *mousse* e, desta forma, a consistência menos rígida não dificultou a alimentação das larvas.

As dietas de D1 a D4 não restringiram o desenvolvimento larval de *C. albiceps* até a transformação em pupa, sendo que a maioria dos espécimes (Fig 1, Tabela 2) atingiu peso na fase de pré-pupa superior ao peso mínimo necessário (42 mg) para o início da fase de pupa (Queiroz & Milward-de-

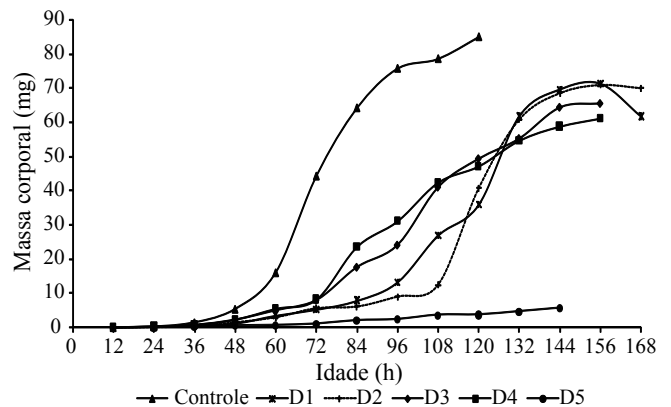


Fig 1 Peso (mg) de imaturos de *Chrysomya albiceps* ao longo de seu desenvolvimento em diferentes dietas artificiais e em carne moída bovina, a partir de 12h pós-eclosão, até o final do terceiro estágio larval.

Azevedo 1991). As moscas adultas foram maiores quando provenientes de pupas mais pesadas, evidenciando que essas dietas podem ser apropriadas para o desenvolvimento e continuação da manutenção de colônias em laboratório, visto que o grau de desenvolvimento ovariano e a fecundidade são fatores dependentes, sobretudo do tamanho das moscas adultas (Lopes 1941).

O alto ganho de peso dos espécimes alimentados com as dietas D1 e D2 em relação aos demais pode ter resultado do acréscimo de fígado e músculo bovino, respectivamente, os quais contêm proteína animal de alto valor nutritivo, suplementando as proteínas já presentes no leite em pó. Porém, a alta quantidade de glicídios, proteínas, vitaminas e hormônios no fígado, além de sua ação como filtro de impurezas e de diversas toxinas transportadas via sanguínea ou transformadas em subprodutos, podem ter acelerado a taxa de desenvolvimento e afetado a assimilação dos nutrientes mais importantes para o desenvolvimento do inseto, reduzindo a sobrevivência pupal (50%) (Fig 1, Tabelas 2 e 3).

O músculo bovino, acrescido à dieta D2, não apresenta as mesmas desvantagens citadas acima. Contudo, a alta quantidade de tecido gorduroso que entremeia a carne dificultou obter um bom grau de homogeneização da dieta, prejudicando sua utilização em bioensaios, especialmente na

Tabela 2 Tempo médio de desenvolvimento (h) e peso (mg) ao final de cada estágio larval de *Chrysomya albiceps* considerando as diferentes dietas artificiais testadas.

Dietas	2° estágio		3° estágio		Pré-pupa		Tempo total de desenvolvimento (h)
	Tempo	Peso	Tempo	Peso	Tempo	Peso	
D1	84	7,9 ± 1,50	84	61,9 ± 5,30 A <sup>1</sup>	12	54,6 ± 5,30	180
D2	84	6,2 ± 0,87	84	69,8 ± 7,95 B	24	55,8 ± 3,53	192
D3	72	8,1 ± 0,54	84	65,6 ± 5,52 A	48	46,8 ± 4,16	204
D4	72	8,2 ± 0,78	84	61,1 ± 4,62 A	48	39,7 ± 4,72	204
D5	120	3,8 ± 0,99	— <sup>2</sup>	—	—	—	—
C	60	16,1 ± 3,24	60	84,9 ± 10,22 C	12	65,0 ± 4,35	132

<sup>1</sup>Teste de Duncan: médias com a mesma letra não são significativamente diferentes; <sup>2</sup>Os dados não foram avaliados ou estão incompletos em decorrência da mortalidade de 100% dos indivíduos.

Tabela 3 Sobrevivência pupal e intervalo de emergência de *Chrysomya albiceps* em diferentes tipos de dieta comparados ao grupo controle. (n = 150)

Grupo	Sobrevivência pupal total (%)	Intervalo de emergência (h)
Dieta D1	75 (50)	108
Dieta D2	51 (34)	96
Dieta D3	139 (92,6)	93
Dieta D4	102 (68)	60
Dieta D5	-	-
Controle	134 (89,3)	96

área de entomotoxicologia, que exige um substrato padrão e uniforme para a adição de drogas ou outras substâncias a serem testadas.

A falta de uniformidade da dieta também pode ter contribuído para o prolongamento da fase larval como estratégia para compensar a queda na qualidade nutricional do alimento consumido, uma vez que parte dos nutrientes estavam indisponíveis pela insolubilidade da gordura (Ulyett 1950). O reflexo disso pode ser observado na baixa sobrevivência pupal (34%), revelando que a dieta é inadequada para a criação e manutenção de colônias em laboratório (Tabela 3).

A dieta D4 apresentou sobrevivência pupal adequada (próximo a 70%) e bom grau de homogeneização (Tabela 3). Porém, é importante considerar que coração de frango proveniente de aves não-alimentadas com hormônios não é facilmente encontrado no mercado, além de ter custo mais elevado.

Na dieta D5, proposta por Leal *et al* (1982), sem acréscimo de tecido animal, foi registrada mortalidade de 100% dos imaturos após 144h de desenvolvimento, quando eles se encontravam no início do terceiro estágio larval, embora uma parcela dos espécimes tenha morrido no primeiro e segundo estágios larvais (Fig 1, Tabela 2). Isso sugere que os ingredientes dessa dieta são insuficientes ou inadequados para o completo desenvolvimento pós-embrionário de *C. albiceps*.

A dieta D3 foi mais eficiente e bastante similar ao grupo controle em dois parâmetros importantes, na sobrevivência pupal e no intervalo de emergência, sendo este último um dos mais eficientes na avaliação das dietas artificiais (D'Almeida *et al* 2001). No entanto, no que diz respeito a outros fatores, foi observado um aumento de 36h no tempo que as larvas levaram para atingir o final do terceiro estágio entre a dieta (156h) e o controle (120h), além de uma redução de peso, em média, de 19 mg no primeiro grupo (Fig 1, Tabela 2).

Obviamente, como observado por D'Almeida *et al* (2000), o grupo controle sempre terá maior eficiência, já que em condições naturais o desenvolvimento pós-embrionário ocorre em substrato rico em proteína animal, como carcaças de animais em decomposição. Contudo, as dietas trazem uma gama de vantagens, desde a grande redução do odor putrido e da contaminação secundária por outros insetos eventualmente atraídos pelos odores desagradáveis da carne que se decompõe no ambiente de trabalho, além de poder dispensar o uso de cobaias em análises toxicológicas, diminuindo o custo da pesquisa e priorizando ao máximo a ética experimental. Com base nesse contexto e na comparação dos parâmetros acima mostrados, sugerimos o uso da dieta D3, dieta artificial com rúmen de bovinos, na manutenção de colônias de dípteros muscóides em laboratório, em especial *C. albiceps*.

## Agradecimentos

Este trabalho contou com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com auxílio financeiro vinculado a um Projeto Temático (processo n° 04/08544-0), sob forma de concessão de bolsa (IC com processo n° 06/55206-9 e PD com processo n° 05/5448-0), além do apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) sob forma de concessão de bolsa.

## Referências

Carvalho L M L, Thyssen P J, Goff M L, Linhares A X (2004) Observations on the succession patterns of necrophagous insects

- onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Int J Forensic Med Toxicol* 5: 33-39.
- Carvalho L M L, Thyssen P J, Linhares A X, Palhares F B (2000) A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 135-138.
- D'Almeida J M, Ferro C L, Fraga M B (2001) Desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria* em dietas artificiais. *Acta Biol Leopold* 23: 25-30.
- D'Almeida J M, Fraga M B, Ferro C L (2000) Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae), em dietas artificiais. *Entomol Vect* 7: 155-162.
- D'Almeida J M, Oliveira V C (2002) Dietas artificiais para a criação, em laboratório, de *Chrysomya* (*C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. putoria*) (Diptera: Calliphoridae). *Entomol Vect* 9: 79-91.
- Dear J P (1985) A revision of the New World Chrysomyini (Diptera) (Calliphoridae). USA, Joyce Print Shop, 182p.
- Ferreira M J M (1978) Sinantropia de dípteros muscoídeos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. *Rev Bras Biol* 38: 445-54.
- Godoy W A C, Von Zuben F J, Von Zuben C J, Reis S F (2001) Spatio-temporal dynamics and transition from asymptotic equilibrium to bounded oscillations in *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 627-634.
- Guimarães J H, Prado A P, Buralli G M (1979) Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 23: 245-255.
- Guimarães J H, Prado A P, Linhares A X (1978) Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 22: 53-60.
- Introna F, Campobasso C P, Goff M L (2001) Entomotoxicology. *Forensic Sci Int* 120: 42-47.
- Leal T T, Prado A P, Antunes J A (1982) Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. *Rev Bras Zool* 1: 41-44.
- Lopes H S (1941) Sobre o aparelho genital dos Sarcophagidae (Diptera) e sua importância na classificação. *Rev Bras Biol* 1: 215-221.
- Mendes J, Linhares A X (1993) Atratividade por iscas e estágios de desenvolvimento ovariano em fêmeas de várias espécies sinantrópicas de Calliphoridae (Diptera). *Rev Bras Entomol* 37: 157-166.
- Parra J R (1990) Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. Piracicaba, ESALQ, 125p.
- Queiroz M M C, Milward-de-Azevedo W M V (1991) Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Rev Bras Zool* 8: 75-84.
- SAS Inc (2006) SAS for Microsoft Windows Professional. Versão 9.1. Cary, NC, 1028p.
- Singh P, Moore R F (1985) Handbook of insects rearing. Elsevier Science Publishing, Amsterdam, 600p.
- Souza A M, Linhares A X (1997) Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in Southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Med Vet Entomol* 11: 8-12.
- Ullyet G C (1950) Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Phill Trans R Soc Lond* 234: 77-174.
- Zumpt F (1965) Myiasis in man and animals in the old world. Butherworths, London, 267p.

Received 25/X/07. Accepted 07/XII/08.

---