

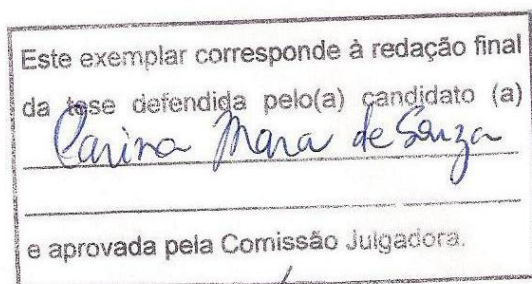
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



CARINA MARA DE SOUZA

**“O EFEITO DE ESTERÓIDES ANABÓLICO-ANDROGÊNICOS NO  
DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE ESPÉCIES DE *CHRYSOMYA* (DIPTERA:  
CALLIPHORIDAE) DE IMPORTÂNCIA FORENSE”**



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Campinas – SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>So89e</b> | <p>Souza, Carina Mara de</p> <p>O efeito de esteróides anabólico-androgênicos no desenvolvimento de imaturos de espécies de <i>Chrysomya</i> (Diptera: Calliphoridae) de importância forense / Carina Mara de Souza. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientador: Arício Xavier Linhares.<br/>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Mosca-varejeira. 2. Hormônios. 3. Intervalo pós-morte. 4. Entomotoxicologia. I. Linhares, Arício Xavier, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**Título em inglês:** The effect of anabolic androgenic steroids on the development of immatures of *Chrysomya* species (Diptera: Calliphoridae) of forensic importance.

**Palavras-chave em inglês:** Blow flies; Hormones; Post mortem interval; Entomotoxicology.

**Área de concentração:** Parasitologia.

**Titulação:** Mestre em Parasitologia.

**Banca examinadora:** Arício Xavier Linhares, José Roberto Postali Parra, Wesley Augusto Conde Godoy.

**Data da defesa:** 28/01/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia.

CAMPINAS, 28 DE JANEIRO DE 2010.

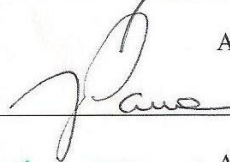
**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. **Arício Xavier Linhares** (Orientador) \_\_\_\_\_



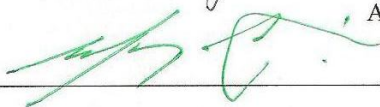
Assinatura

Prof. Dr. **José Roberto Postali Parra** \_\_\_\_\_



Assinatura

Prof. Dr. **Wesley Augusto Conde Godoy** \_\_\_\_\_



Assinatura

Prof. Dr. **Ângelo Pires do Prado** \_\_\_\_\_

Assinatura

Dra. **Carolina Reigada** \_\_\_\_\_

Assinatura

*À minha família,  
força e apoio incondicionais,  
pilar de sustentação de minha formação*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Arício Xavier Linhares pela orientação e singular oportunidade de aprendizado.

Aos Profs. Drs. Ângelo Pires do Prado, Marlene Tiduko Ueta, Selma Giorgio, Wesley Augusto Conde Godoy, Carolina Reigada e José Roberto Postali Parra pelas contribuições nos exames de qualificação, prévio e defesa.

À inestimável Dra. Patricia Jacqueline Thyssen, grande amiga e mestre, uma pessoa de grande sabedoria que, além de excelente professora (*“Posso fazer uma pergunta?”*), mostrou-se uma companheira para todos os momentos dessa minha jornada, um “anjo da guarda” presente em minha vida acadêmica e pessoal.

À, não menos importante, Deus e minha família (principalmente papai Ariozano, mamãe Maria José, irmãos Cassiano e Carolina e vó Aparecida (*in memoriam*)) por permitirem a conclusão de mais esta etapa, por todo o apoio moral, amoroso e financeiro durante minha formação acadêmica e em todas as minhas decisões. Obrigada por serem meus exemplos de conduta, responsabilidade, respeito, honestidade e tantas outras qualidades. Obrigada por acreditarem em mim, pelo apoio incondicional, pela compreensão nos momentos de ausência (que foram muitos...), pelos conselhos e por todas as palavras motivadoras que me consolavam e davam força para continuar a seguir adiante. Vocês foram, são e sempre serão muito importantes na minha vida!

A todos os amigos do Laboratório de Entomologia L2B, incluindo os vários estagiários presentes nesse período, em especial aos companheiros Maicon, Alexandre, Bianca, Fábio, Carol Palanch, Kaynara e Marcos, os quais tiveram grande importância e participação direta neste trabalho. Em especial ao amigo Thiago Moretti pelas correções e relevantes sugestões nos artigos.

Aos estimados amigos da Pós-Graduação em Parasitologia, em especial Aline, Laura, Rodrigo, Luciana e Lincoln, e do departamento, pelos ‘cafés’ científicos, auxílio, companhia e descontração.

Aos amigos distantes, porém sempre presentes, que conviveram com minha ausência em vários momentos, mas que nunca se afastaram ou deixaram de segurar minha mão sempre que o caminho parecia mais longo e os obstáculos maiores do que realmente eram.

Aos professores do Programa e aos técnicos (em especial Rubens e João) pelas contribuições durante o curso das disciplinas e na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas por prover condições necessárias a esta complementação de minha formação acadêmico-profissional e por fornecer subsídios para a realização desta pesquisa.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudos por 12 meses.

*“Who saw him die?  
I, said the fly, with my little eye,  
I saw him die.”*

Anônimo

(Extraído de Greenberg & Kunich, 2002)

## RESUMO

Devido ao aumento no número de mortes relacionadas ao abuso de drogas, o conhecimento da interferência destas substâncias sobre o desenvolvimento de certas espécies de insetos necrófagos torna-se de grande importância, especialmente quando a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) usa como base a idade do inseto. Além disso, esta metodologia é uma valiosa alternativa para determinar a causa da morte, quando o corpo encontra-se em avançado estágio de decomposição. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de diferentes concentrações de esteróides anabólico-androgênicos (EAA), comumente usados para aumento da massa muscular, sobre a taxa de desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Wiedemann), *C. albiceps* (Wiedemann) e *C. megaacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Dois delineamentos experimentais foram feitos: um somente com a substância decanoato de nandrolona (Deca-Durabolin<sup>®</sup>) e outro associando decanoato aos ésteres de testosterona (Durateston<sup>®</sup>). Imaturos obtidos de colônias de moscas adultas estabelecidas em laboratório foram depositados em potes plásticos contendo dieta artificial para montagem dos grupos experimentais, sem (grupo controle) e com adição de esteróides. Cada tratamento foi repetido seis vezes. O ganho de massa foi registrado para grupos de 10 larvas, em intervalos de 12 h, até que atingissem o estágio de pupa. Além disso, foram medidos a viabilidade larval, a taxa e o intervalo de emergência. ANOVA de um critério e teste de comparações múltiplas de Duncan foram feitos para comparar o efeito dos EAA, associados ou não em diferentes e crescentes concentrações, sobre o desenvolvimento larval usando o ganho de massa como variável resposta. Diferenças significativas não foram observadas quanto ao tempo de desenvolvimento e intervalo de emergência para todas espécies tratadas, mas houve nítida heterogeneidade quanto às curvas de desenvolvimento, quando associados os dois EAA para *C. putoria* e *C. albiceps*. A viabilidade larval e a emergência de *C. putoria* foram significativamente afetadas pela associação de EAA, com valores inferiores aos apresentados pelo controle. Frente ao decanoato, *C. putoria* apresentou inicialmente maior ganho de massa, contudo, em idades mais avançadas, os imaturos expostos à droga obtiveram menor média de massa corpórea que o controle. Para *C. albiceps* a maior concentração de decanoato afetou negativamente o ganho de massa durante todo o desenvolvimento larval. A análise do ganho de massa, por hora, indicou diferenças significativas no período compreendido entre 36 e 84 h entre grupos controle e com adição de EAA associados, o que levaria a erro no cálculo do IPM, se esta condição não fosse considerada.

Palavras-chave: moscas-varejeiras; hormônios; intervalo pós-morte; entomotoxicologia.

## ABSTRACT

Due to increase of deaths related to drug abuse, the knowledge of the interference of these substances on the development of certain necrophagous insects species can be very important, especially when the estimative of the postmortem interval (PMI) is based on insect age. Furthermore, they are valuable alternatives to determine the cause of death, when the body is in an advanced stage of decomposition. The present study aimed to evaluate the effect of different concentrations of anabolic-androgenic steroids (AAS), commonly used to increase muscle mass, on the developmental rate of *Chrysomya putoria* (Wiedemann), *C. albiceps* (Wiedemann) and *C. megaacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Two experimental designs were made: one only with nandrolone decanoate (Deca-Durabolin®) and another with decanoate associated to ester of testosterone (Durateston®). Immatures obtained from adult flies colonies established in lab were placed in plastic vials containing an artificial rearing diet for assembly of experimental groups, without (control group) and with addition of steroids. Each treatment was replicated six times. The mass gain was recorded for groups of 10 larvae at 12h-intervals until they reached the pupal stage. In addition, we measured the larval viability, the rate and interval of emergency. ANOVA one way and Duncan's multiple comparison test were made to compare the effect of the EAA, associated or not in different and increased concentrations on the developmental larval using the mass gain as dependent variable. Significant differences were observed regarding the developmental time and interval of emergency for all threatened species, but there was a clear heterogeneity on the developmental curves for *C. putoria* and *C. albiceps* by the EAA association. The larval viability and the emergence rates of *C. putoria* were significantly affected by the EAA association, with rates lower than control group. Initially, *C. putoria* rearing in decanoate showed greater weight gain, however, at older ages, immatures obtained a lower average weight than control. For *C. albiceps* the highest concentration of decanoate negatively affected mass gain during the larval development. The mass gain analysis, per hour, indicated significant differences from 36 to 84 h between control and EAA groups, which could lead to incorrect estimation of the PMI, if this condition was not considered.

Key-words: blow flies, hormones, post mortem interval, entomotoxicology.



## LISTA DE FIGURAS

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> | Filogenia atualmente proposta para a ordem Diptera .....                                                                                                                                                                                                                               | 04 |
| <b>Figura 2.</b> | Estrutura química da testosterona (CAS: 58-22-0) .....                                                                                                                                                                                                                                 | 24 |
| <b>Figura 3.</b> | Estrutura química do decanoato de nandrolona (CAS: 360-70-03), princípio ativo do Deca-Durabolin® .....                                                                                                                                                                                | 26 |
| <b>Figura 4.</b> | Estrutura química dos ésteres de testosterona componentes do Durateston®: (A) Propionato de testosterona (CAS: 57-85-2); (B) Fenilpropionato de testosterona (CAS: 1255-49-8); (C) Isocaproato de testosterona (CAS: 15262-86-9); (D) Decanoato de testosterona (CAS: 5721-91-5) ..... | 27 |
| <b>Figura 5.</b> | Development curves (h) of <i>Chrysomya megacephala</i> larvae reared in different concentrations of nandrolone decanoate, relative to the period from hatching until pupariation.....                                                                                                  | 43 |
| <b>Figura 6.</b> | Development curves (h) of <i>Chrysomya albiceps</i> larvae reared in different concentrations of nandrolone decanoate, relative to the period from hatching until pupariation.....                                                                                                     | 44 |
| <b>Figura 7.</b> | Development curves (h) of <i>Chrysomya putoria</i> larvae reared in different concentrations of nandrolone decanoate, relative to the period from hatching until pupariation.....                                                                                                      | 45 |
| <b>Figura 8.</b> | Curvas de desenvolvimento de <i>Chrysomya albiceps</i> submetida à criação em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações da associação de decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona, referente ao período de eclosão a pupariação.....                             | 59 |
| <b>Figura 9.</b> | Curvas de desenvolvimento de <i>Chrysomya putoria</i> submetida à criação em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações da associação de decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona, referente ao período de eclosão a pupariação.....                              | 60 |

## LISTA DE TABELAS

|                   |                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b>  | Mean weights (mg) ( $x \pm SD$ ) over the development time (h) of <i>Chrysomya megacephala</i> immatures in different concentrations of nandrolone decanoate .....                                                                        | 40 |
| <b>Tabela 2.</b>  | Larval viability, emergency and emergency interval (h) rates of <i>Chrysomya megacephala</i> under different nandrolone decanoate concentrations (n=150) ( $x \pm SD$ ) .....                                                             | 40 |
| <b>Tabela 3.</b>  | Mean weights (mg) ( $x \pm SD$ ) over the development time (h) of <i>Chrysomya albiceps</i> immatures in different concentrations of nandrolone decanoate .....                                                                           | 41 |
| <b>Tabela 4.</b>  | Larval viability, emergency and emergency interval (h) rates of <i>Chrysomya albiceps</i> under different nandrolone decanoate concentrations (n=150) ( $x \pm SD$ ) ..                                                                   | 41 |
| <b>Tabela 5.</b>  | Mean weights (mg) ( $x \pm SD$ ) over the development time (h) of <i>Chrysomya putoria</i> immatures in different concentrations of nandrolone decanoate .....                                                                            | 42 |
| <b>Tabela 6.</b>  | Larval viability, emergency rate and emergency interval (h) of <i>Chrysomya putoria</i> under different nandrolone decanoate concentrations (n=150) ( $x \pm SD$ ) ..                                                                     | 42 |
| <b>Tabela 7.</b>  | Média da massa corporal (mg) em relação ao tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya albiceps</i> em diferentes concentrações da associação entre o decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona ( $x \pm DP$ ) ..... | 58 |
| <b>Tabela 8.</b>  | Viabilidade larval, emergência e intervalo de emergência (h) de <i>Chrysomya albiceps</i> submetida a diferentes concentrações da associação do decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona (n=150) ( $x \pm DP$ ) .....            | 58 |
| <b>Tabela 9.</b>  | Média da massa corporal (mg) em relação ao tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de <i>Chrysomya putoria</i> em diferentes concentrações da associação entre o decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona ( $x \pm DP$ ) .....  | 61 |
| <b>Tabela 10.</b> | Viabilidade larval, emergência e intervalo de emergência (h) de <i>Chrysomya putoria</i> submetidas a diferentes concentrações da associação do decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona (n=150) ( $x \pm DP$ ) .....            | 61 |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                                                                                                              |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>- INTRODUÇÃO GERAL .....</b>                                                                                                                                                                              | <b>01</b> |
| 1.1-     | Classe Insecta .....                                                                                                                                                                                         | 02        |
| 1.2-     | Ordem Diptera .....                                                                                                                                                                                          | 03        |
| 1.3-     | Entomologia Forense .....                                                                                                                                                                                    | 07        |
| 1.4-     | Estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) .....                                                                                                                                                                | 11        |
| 1.5-     | Entomotoxicologia .....                                                                                                                                                                                      | 13        |
| 1.6-     | Esteróides Anabólico-Androgênicos .....                                                                                                                                                                      | 23        |
| <b>2</b> | <b>- OBJETIVOS .....</b>                                                                                                                                                                                     | <b>28</b> |
| <b>3</b> | <b>- CAPÍTULO I – The effect of nandrolone decanoate on the development of three species of <i>Chrysomya</i> (Diptera: Calliphoridae), flies of forensic importance from Brazil .....</b>                    | <b>29</b> |
|          | Abstract .....                                                                                                                                                                                               | 29        |
|          | Material and Methods .....                                                                                                                                                                                   | 31        |
|          | Results .....                                                                                                                                                                                                | 32        |
|          | Discussion .....                                                                                                                                                                                             | 33        |
|          | References cited .....                                                                                                                                                                                       | 36        |
| <b>4</b> | <b>- CAPÍTULO II – O efeito do decanoato de nandrolona associado a ésteres de testosterona no desenvolvimento de duas espécies de <i>Chrysomya</i> (Diptera: Calliphoridae) de importância forense .....</b> | <b>46</b> |
|          | Resumo .....                                                                                                                                                                                                 | 46        |
|          | Introdução .....                                                                                                                                                                                             | 47        |
|          | Material e Métodos .....                                                                                                                                                                                     | 48        |
|          | Resultados .....                                                                                                                                                                                             | 50        |
|          | Discussão .....                                                                                                                                                                                              | 51        |
|          | Referências citadas .....                                                                                                                                                                                    | 54        |
| <b>5</b> | <b>- CONCLUSÕES .....</b>                                                                                                                                                                                    | <b>62</b> |
| <b>6</b> | <b>- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                                                                                                                                                    | <b>63</b> |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O número de usuários de drogas ilícitas, fármacos e outras substâncias tóxicas têm aumentado gradativamente com o passar dos anos. Associadas a esse fator, as mortes relacionadas ao consumo abusivo destes tipos de substância acompanham a mesma escala de crescimento, incrementando, por consequência, o interesse em estudos entomotoxicológicos (INTRONA, CAMPOBASSO, GOFF, 2001; UNODC, 2007).

Os esteróides anabólico-androgênicos (EAA), tais como a testosterona natural e a sintética, além dos ésteres derivados deste hormônio, são utilizados indiscriminadamente por atletas, praticantes de atividades físicas, adolescentes e indivíduos interessados em obter aumento rápido de massa muscular, força e diminuição do tempo de recuperação entre exercícios físicos intensos. Na maioria dos casos, a utilização de forma abusiva desses compostos, sem as devidas orientações médicas, pode gerar sérias consequências aos usuários, desde efeitos colaterais indesejáveis (ginecomastia, alteração dos caracteres sexuais secundários e dos fisiológicos de alguns sistemas, dentre outros) até o óbito, em situações de super dosagens (LISE, *et al.* 1999; SILVA, DANIELSKI, CZEPIELEWSKI, 2002).

Mesmo sendo uma área difundida e em estágio avançado de pesquisas aplicadas em alguns países como Estados Unidos da América, Rússia, França, Canadá, Inglaterra e Japão (BENECKE, 2001), a Entomologia Forense no Brasil encontra-se ainda em fase inicial quanto à aplicação prática no cotidiano das rotinas periciais. Devido às dimensões continentais de nosso país, informações básicas obtidas a partir de inventários de insetos necrófagos, biologia, ecologia e taxonomia de muitas espécies ainda são incipientes em certas localidades. No que se refere à Entomotoxicologia, ao menos o conhecimento acerca do efeito de substâncias como diazepam, cocaína, anfepramona, maconha, propionato de testosterona e butilbrometo de escopolamina sobre a taxa de desenvolvimento de dípteros de importância forense presentes em nosso país estão amplamente divulgados (CARVALHO, LINHARES, TRIGO, 2001; CARVALHO, 2004; GRELLA *et al.*, 2007; FERRARI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Como estudos que enfoquem a obtenção de dados diversos sobre a entomofauna necrófaga são de grande importância para a formação de um extenso banco de dados, que auxilie as investigações no âmbito legal (PUJOL-LUZ, ARANTES, CONSTANTINO, 2008), pesquisas com o intuito de verificar a ação de drogas e outras substâncias tóxicas sobre o desenvolvimento

e o comportamento de mais espécies de importância forense devem ser realizadas. Tais pesquisas permitirão que o cálculo da estimativa do intervalo pós-morte (IPM) torne-se mais acurado, evitando erros provenientes da falta de conhecimento acerca das mudanças fisiológicas que podem ocorrer no corpo de um inseto, quando há a presença de substâncias tóxicas nos tecidos cadavéricos que servem de alimento para os necrófagos.

Dentro do contexto exposto, no presente estudo objetivou-se avaliar a taxa de desenvolvimento de imaturos de espécies do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), submetidas a diferentes concentrações de esteróides anabólico-androgênicos (decanoato de nandrolona, testosterona e associando os dois esteróides mencionados), adicionados em dieta artificial oferecida como fonte exclusiva de alimentação. Dessa forma, espera-se contribuir com o avanço no conhecimento das variáveis envolvidas na aplicação dos insetos em questões médico-legais.

### **1.1- Classe Insecta**

Mais de 900.000 espécies já foram descritas dentro da classe Insecta (filo Arthropoda, subfilo Hexapoda) e o grande sucesso evolutivo deste grupo é devido, em grande parte, à ampla diversidade de suas estruturas e funções (BORROR, DeLONG, 1969; GALLO et al., 2002; BRUSCA, BRUSCA, 2003). As principais características que permitiram a irradiação adaptativa dos insetos são a presença de um exoesqueleto com epicutícula cérea, que reduz a perda de água para o meio; as asas, que permitem acesso aos mais variados recursos alimentares e facilitam a fuga, no caso de ataque de predadores, e o encontro de parceiros para fins reprodutivos; o dobramento das asas quando o inseto encontra-se em repouso, possibilitando a ocupação de microhabitats com espaço restrito; a presença de uma casca resistente no ovo, que aumenta as chances de sobrevivência diante de condições adversas do meio ambiente; o desenvolvimento em estágios larvais, ou seja, a metamorfose completa, que possibilita aos imaturos explorar recursos alimentares e habitats diferentes daqueles dos indivíduos adultos; ciclo de vida mais curto; e uma alta taxa reprodutiva (RUPPERT, BARNES, 1996; BUZZI, 2002).

Os indivíduos adultos ocupam os mais variados habitats presentes em diversos ecossistemas, incluindo o ambiente aquático, exceto os oceanos profundos (BORROR, DeLONG, 1969; GALLO et al., 2002; KLOWDEN, 2002; MARQUARDT, KONDRATIEFF, MOORE, 2004). Os dípteros, por exemplo, exibem uma variedade de modificações das peças bucais que

está mais associada ao método de obtenção do recurso alimentar explorado do que à dieta propriamente dita (RUPPERT, BARNES, 1996; CHAPMAN, 2006).

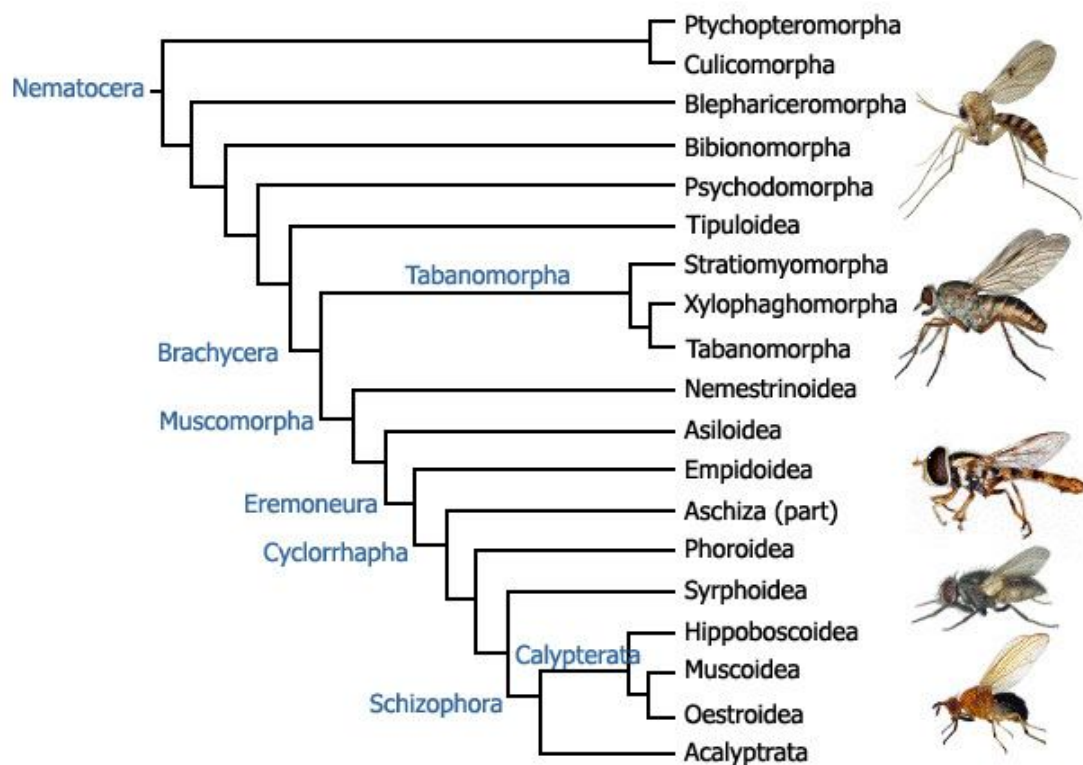
Algumas espécies de insetos são de relevância para a saúde animal, humana ou para a economia, uma vez que podem ser veiculadores de patógenos, causando enfermidades, ou ao tornarem-se pragas agrícolas (GUIMARÃES, PAPAVERO, 1999; BUZZI, 2002; GALLO et al., 2002). Assim, a entomologia é a ciência que estuda os insetos sob todos os seus aspectos e as relações que estes estabelecem entre eles próprios, as plantas, os seres humanos e os demais animais (GALLO et al., 2002).

## **1.2- Ordem Diptera**

Dentre outras ordens de insetos é uma das mais ricas em número de espécies, além de ser anatomicamente variada e possuir grupos com inovações ecológicas. Os dípteros estão distribuídos em cerca de 100 gêneros, 150 famílias, 22-32 superfamílias, 8-10 infra-ordens, 2 subordens, cerca de 3.900 espécies fósseis e 190.000 espécies descritas (YEATS, WIEGMANN, 2005; THOMPSON, 2008). Dípteros de interesse médico ou veterinário constituem uma pequena fração dentro do grupo, mas se destacam pela diversidade que varia de mosquitos, ectoparasitas alados e sem asas, larvas causadoras de miíases até espécies que participam do processo de decomposição de carcaças e fezes (HALL, GERHARDT, 2002).

Complexas modificações morfológicas, como a transformação do segundo par de asas em halteres e o desenvolvimento de peças bucais adaptadas ao hábito de sugar substâncias líquidas, apresentam-se como sinapomorfias dentro da ordem Diptera, mas o monofiletismo é bem estabelecido (Fig. 1) (YEATS, WIEGMANN, 2005).

Os dípteros são divididos em duas subordens: Nematocera, composta por espécimes que possuem mais de 8 artículos nas antenas e Brachycera, que compreende aqueles cujas antenas têm até 8 artículos. Brachycera, grupo de maior interesse em relação a este estudo, está subdividido nas seguintes infra-ordens: Asilomorpha, Stratiomyomorpha, Xylophagomorpha, Tabanomorpha e Muscomorpha, sendo que as duas últimas incluem famílias de braquíceros que ganham destaque nas áreas médica, veterinária e forense (YEATS, WIEGMANN, 2005).



**Figura 1.** Filogenia atualmente proposta para a ordem Diptera (<http://www.inhs.uiuc.edu/research/FLYTREE/flyphylogeny.html>).

Os dípteros da antiga subordem Cyclorrhapha, agora inclusos na infra-ordem Muscomorpha, também são monofiléticos, condição assegurada por apresentarem características reconhecidas como marcos evolutivos dos dípteros, tais como a invaginação da cabeça na cápsula larval, modificações de peças bucais das larvas e a pupariação dentro do tegumento do último estágio larval. Com duas divisões, Aschiza e Schizophora, considerando, respectivamente, a presença ou ausência da sutura ptilineal, decorrente do processo de emergência dos adultos que inflam um “saco”, o ptilíneo ou lúnula, na cabeça para empurrar a extremidade anterior do pupário para sair. Alguns estudos moleculares têm sido concluídos apontando para o parafiletismo de Aschiza em relação a Schizophora, apesar deste último ser considerado um dos mais complexos grupos em termos de taxonomia (HALL, GERHARDT, 2002; YEATS, WIEGMANN, 2005; LINHARES, THYSEN, 2007).

A divisão Schizophora alberga duas seções baseadas na presença ou ausência de lóbulos alares posterobasais, chamados caliptras. Em Acalyptratae as caliptras são ausentes ou pouco

desenvolvidas e em Calyptratae são bem desenvolvidas. A primeira seção possui mais de 50% de sua diversidade inclusa em seis famílias (Tephritidae, Lauxaniidae, Agromyzidae, Chloropidae, Drosophilidae e Ephydriidae). Já Calyptratae inclui algumas das mais diversas e bem sucedidas famílias de moscas como Calliphoridae, Sarcophagidae, Tachinidae, Anthomyiidae e Muscidae, além das mais especializadas como Streblidae, Nycteribiidae, Hippoboscidae, Glossinidae e Oestridae. As outras famílias pertencentes a essa última seção são Scathophagidae, Faniidae, Mystacinobiidae e Rhinophoridae (HALL, GERHARDT, 2002; YEATS, WIEGMANN, 2005).

Muscomorpha é um grupo de grande importância, tanto do ponto de vista ecológico como do médico-veterinário. Muitas moscas podem ser úteis quando são polinizadoras, decompositoras de matéria orgânica, fonte de alimentos para vários animais e também predadoras de larvas de outros artrópodes (representando, neste caso, uma alternativa para controle biológico). Sob o ponto de vista médico-veterinário, os dípteros muscóideos possuem sua importância relacionada com fatores como a alta sinantropia de algumas espécies, característica que permite que tais moscas freqüentem ambientes diversificados, como rural, silvestre e urbano, e, após visitarem dejetos, carcaças e matéria orgânica em decomposição, veiculem mecanicamente patógenos como cistos de protozoários, bactérias, vírus e ovos de helmintos; com a importação de homens e animais pela deambulação e pela hematofagia, às vezes intensa e dolorosa; e por alguns indivíduos serem agentes causadores de miíases (MARCONDES, 2001; HALL, GERHARDT, 2002).

A grande maioria das espécies de Muscomorpha é ovípara, colocando os ovos diretamente no ambiente. Algumas espécies podem reter os ovos em uma dilatação do canal vaginal, considerada uma espécie de útero, onde ocorre a eclosão e, posteriormente, a liberação de larvas para o meio. Os imaturos sofrem metamorfose completa, passam por três fases de desenvolvimento: ovo, larva (com três estádios) e pupa. Os ovos diferem muito pouco entre as espécies, geralmente são esbranquiçados e elipsóides (MARCONDES, 2001; LINHARES, THYSSEN, 2007; REY, 2008).

As larvas dos dípteros muscóideos são ápodas, vermiformes e desprovidas de uma cabeça esclerotizada. A locomoção ocorre através de movimentos ondulatórios. Na porção anterior, fortemente reduzida, há o esqueleto cefalofaríngeo, composto por placas esclerotizadas que sustentam dois ganchos bucais usados na alimentação da larva e como auxílio na movimentação. Quanto aos hábitos alimentares, as larvas podem ser saprófagas, fitófagas, predadoras ou



adaptadas ao parasitismo de tecidos animais. Placas respiratórias ou estigmáticas podem ser encontradas tanto nos segmentos anteriores como no final do corpo, sendo denominadas espiráculos anteriores e posteriores, respectivamente. Os espiráculos anteriores aparecem em grande parte das espécies a partir do segundo estágio e há pouca divergência morfológica entre as diferentes espécies. Já os espiráculos posteriores, com base na morfologia do peritrema e das fendas estigmáticas, além do esqueleto cefalofaríngeo, podem ser usados como importante ferramenta de identificação de família ou até espécie da mosca. Os segmentos do corpo das larvas, geralmente em número de 12, podem apresentar estruturas que variam de setas a grandes protuberâncias e espinhos (MARCONDES, 2001; HALL, GERHARDT, 2002; LINHARES, THYSSEN, 2007).

A fase de pupa desenvolve-se no interior da pele larval do terceiro estágio que enrijece e se contrai formando o pupário. Após metamorfose, forma-se o adulto que deixa este invólucro empurrando o opérculo com o ptilíneo. Forma-se, então, na cabeça da mosca, a cicatriz ptilínea (formato de U invertido), proveniente da retração do saco ou ampola ptilínea após a emergência do adulto do pupário (MARCONDES, 2001; HALL, GERHARDT, 2002; LINHARES, THYSSEN, 2007).

Os muscóideos adultos podem ocupar vários ambientes, dependendo da espécie e das condições do meio. Na maioria das vezes, a forma adulta apresenta-se robusta e a antena possui três segmentos sendo o primeiro o menor de todos e o último muito delgado denominado arista, que pode ser nua ou pilosa. A maioria das espécies possui olho composto e dimorfismo sexual. Os machos são holópticos, possuem olhos que se tocam na linha dorsal da cabeça, ao passo que as fêmeas possuem olhos bem separados, por isso, chamadas de dicópticas. O abdômen dos adultos é formado por cinco segmentos aparentes, sendo os segmentos finais modificados em ovipositor nas fêmeas e em genitália ou terminália nos machos. O aparelho bucal da maioria das espécies é bem desenvolvido, sendo do tipo lambedor-sugador; os muscóideos que se alimentam de sangue possuem o tipo picador-sugador; há ainda algumas espécies que apresentam as peças bucais atrofiadas, não se alimentando na fase adulta. Apresentam palpos maxilares de tamanho variado com apenas um artigo; as maxilas e mandíbulas estão ausentes. O corpo é composto por muitas placas. As asas são usualmente bem desenvolvidas conferindo a maioria das espécies uma boa capacidade de vôo (8 a 10 km para algumas espécies). Na extremidade distal das pernas há os púvilos com o empódio em forma de cerda no meio, além de duas garras laterais. Em geral, os

dípteros muscóideos apresentam atividade diurna, alimentam-se, copulam e põem algumas centenas de ovos (MARCONDES, 2001; HALL, GERHARDT, 2002; LINHARES, THYSSEN, 2007).

As glândulas salivares lubrificam as peças bucais e a saliva, por já conter enzimas digestivas, realiza a pré-digestão dos alimentos. O trato digestivo dos dípteros, assim como na maioria dos insetos, consiste em um tubo de células epiteliais e pode ser dividido, segundo critérios embriológicos e fisiológicos, em três grandes regiões: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Dessa forma, uma importante característica desse sistema é a compartimentalização espacial. No intestino médio há a presença de vários tipos celulares (células colunares, regenerativas, caliciformes e endócrinas) responsáveis pela absorção e secreção de vários nutrientes e substâncias como os hormônios. Um anel formado por essas células na região anterior do intestino médio é responsável pela produção da membrana peritrófica, que corresponde a uma rede de miofibrilas quitinosas com uma matriz de carboidratos e proteínas, formando um tubo que se move em sentido contrário para envolver o conteúdo intestinal, protegendo, dessa forma, o intestino contra a abrasão causada pela passagem dos alimentos (KLOWDEN, 2002).

### **1.3- Entomologia Forense**

A Entomologia Forense, um ramo específico do estudo de artrópodes, aplica informações sobre a biologia e o desenvolvimento dos insetos necrófagos que utilizam matéria em decomposição como fonte de proteínas, além de outros não-necrófagos, a fim de obter elementos relevantes para investigações criminais, contra pessoas físicas ou contra o ambiente. Adultos, lavas, pupas, pupários e/ou exúvias podem ser empregados como evidências entomológicas (AMENDT, KRETTEK, ZEHNER, 2004; TURCHETTO, VANIN, 2004; OLIVEIRA-COSTA, 2007).

O primeiro relato do uso de insetos para associar um suspeito com a cena criminal foi registrado na China, no século XIII, quando o investigador de um homicídio pediu que camponeses suspeitos colocassem suas ferramentas de trabalho no chão e resquícios imperceptíveis de sangue presentes em uma das foices atraíram as moscas, indicando a possível arma do crime, e, dessa forma, apontando seu dono, que posteriormente confessou, como possível culpado. Porém, a primeira aplicação intencional dos insetos para fins forenses é

creditada a Bergeret, em 1855, em um caso no qual a estimativa do intervalo pós-morte de uma criança encontrada sob o gesso de uma residência foi realizada com base nos insetos encontrados junto ao corpo, indicando a associação dos antigos moradores ao crime. Outras aplicações intencionais são documentadas a partir do término de 1880, na França e Alemanha, em exumações em massa. A utilização de artrópodes no campo da medicina legal foi difundida mundialmente com a publicação do livro “*La faune des cadavres*” em 1894 por Mégnin na França, descrevendo a ocorrência de ondas sucessionais de artrópodes de acordo com a evolução do processo de decomposição de um cadáver (BENECKE, 2001; GREENBERG, KUNICH, 2002; OLIVEIRA-COSTA, 2007; PUJOL-LUZ, ARANTES, CONSTANTINO, 2008).

No Brasil, o primeiro estudo relacionado à Entomologia Forense data de 1908, realizado por Edgard Roquette-Pinto no Rio de Janeiro. Neste trabalho, nota-se a preocupação na adequação dos parâmetros de estudo às condições brasileiras, uma vez que os trabalhos desenvolvidos até então estavam restritos ao ambiente europeu (ROQUETTE-PINTO, 1908). Em 1914, Oscar Freire na Bahia realizou o levantamento da entomofauna necrófaga, também atentando para a discrepância entre os dados registrados e os presentes na literatura. Após este período, entre as décadas de 40 e 80, houve uma escassez de trabalhos voltados a este assunto no país, sendo o trabalho de Monteiro-Filho e Penereiro, de 1987, considerado o marco na retomada das pesquisas (PUJOL-LUZ, ARANTES, CONSTANTINO, 2008).

Atualmente, os estudos relacionados à Entomologia Forense têm sido realizados em vários locais do mundo, como Venezuela (VELÁSQUEZ, 2008), Nova Zelândia (EBERHARDT, ELLIOT, 2008), Europa Central (AMENDT, ZEHNER, RECKEL, 2008; MATUSZEWSKI et al, 2008), Sudeste da Europa (VANIN et al, 2008), Turquia (ÖZDEMIR, SERT, 2009), África do Sul (RICHARDS, PATERSON, VILLET, 2008), Portugal (CAINÉ et al, 2009), Espanha (ARNALDOS et al, 2005), Canadá (SHARANOWSKI, WALKER, ANDERSON, 2008; MICHAUD, MOREAU, 2009), China (SONG, WANG, LIANG, 2008; WANG et al, 2008), Colômbia (SEGURA et al, 2009), Peru (IANNACONE, 2003), Costa Rica (CALDERÓN-ARGUEDAS, TROYO, SOLANO, 2005), Austrália (VOSS, FORBES, DADOUR, 2008), Argentina (CENTENO, ALMORZA, ARNILLAS, 2004; HORENSTEIN et al, 2007), Estados Unidos (DE JONG, HOBACK, 2006), Brasil (LINHARES, 1981; MONTEIRO-FILHO, PENEREIRO, 1987; LINHARES, 1988; VON ZUBEN et al, 1996; BASSANEZI et al, 1997; BOLDRINI et al, 1997; MOURA et al, 1997; SOUZA, LINHARES, 1997; CARVALHO et al,

2000; AMORIM, RIBEIRO, 2001; CARVALHO, LINHARES, 2001; CARVALHO et al, 2004; THYSSEN et al, 2005; PUJOL-LUZ et al, 2006; THYSSEN, LINHARES, 2007; CARVALHO, MELLO-PATIU, 2008; MORETTI et al, 2008a; MORETTI et al, 2008b; SOUZA, KIRST, KRÜGER, 2008), dentre outros países. Os trabalhos são voltados para levantamentos das espécies de importância forense, descrição de comportamento, biologia e taxonomia de algumas espécies, avaliação de fatores interferentes no estabelecimento e desenvolvimento desses insetos e até mesmo a descrição de casos criminais elucidados com o auxílio da Entomologia Forense.

A Entomologia Forense pode ser dividida em três categorias: a urbana, que trata de ações cívicas devido à presença de insetos, principalmente com relação à venda de imóveis, como a colonização deste tipo de bem por cupins; a de produtos estocados, a qual considera a contaminação causada por insetos em produtos alimentícios *in natura*, processados ou estocados, como a presença de partes de insetos em biscoitos recheados, por exemplo; e a médico-legal que analisa os insetos associados a cenas criminais, como mortes suspeitas, a fim de obter informações relevantes ao processo investigativo (LORD, STEVESSON, 1986). Esta última categoria tem sido mais explorada, tanto na área acadêmica com a realização de pesquisas, quanto no âmbito legal com a aplicação do conhecimento da entomofauna necrófaga em investigações criminais. O estudo dos insetos pode, então, ser aplicado em investigações de tráfico de entorpecentes (estabelecendo rotas a partir da presença de insetos endêmicos), maus tratos e negligência a crianças e incapazes (observando o desenvolvimento de insetos para inferir o período de privação de cuidados) e morte violenta, sendo esta última aplicação a mais frequente (OLIVEIRA-COSTA, 2007).

Por meio da análise dos insetos ou vestígios da presença deles em um cadáver, assim como o estágio de desenvolvimento nos quais são encontrados, inferências sobre alguns fatores relacionados às circunstâncias da morte podem ser realizadas. É possível identificar o cadáver por meio da análise do conteúdo estomacal dos insetos que tenham se alimentado de tecidos cadavéricos (por identificação do DNA da vítima); indicar a causa da morte, uma vez que diferentes circunstâncias, como afogamento, carbonização, envenenamento, influenciam na velocidade de decomposição, na diversidade e/ou na sucessão da entomofauna; indicar o local onde a morte ocorreu e se houve movimentação do cadáver; detectar a presença de entorpecentes e toxinas, extraíndo tais substâncias em larvas, pupas, pupários ou mesmo em insetos adultos que tenham se alimentado dos tecidos de uma vítima que tenha morrido em decorrência de *overdose*

ou intoxicação; e, o mais utilizado, estimar o intervalo pós-morte (IPM), que consiste no espaço de tempo decorrido entre a morte e a data em que o corpo foi encontrado (MARCHENKO, 2001; BENECKE, 2004; OLIVEIRA-COSTA, 2007).

Os insetos associados ao processo de decomposição podem ser divididos em quatro grupos principais: necrófagos, que se alimentam da matéria orgânica animal em decomposição; predadores e parasitos de necrófagos, cujo recurso alimentar são os imaturos e até mesmos os adultos das espécies necrófagas; onívoros, que utilizam tanto a carcaça como algumas das espécies presentes neste substrato para sua alimentação; e acidentais os quais consideram o corpo como uma extensão de seu habitat natural (CATTS, GOFF, 1992; KOČÁREK, 2003; OLIVEIRA-COSTA, 2007). A decomposição da carcaça é afetada fundamentalmente pelas espécies necrófagas representadas principalmente pelos dípteros (famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae) e coleópteros (famílias Silphidae, Cleridae e Dermestidae) (CARVALHO, LINHARES, 2001; TURCHETTO, VANIN, 2004; OLIVEIRA-COSTA, 2007).

Membros das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae são considerados os principais invertebrados responsáveis pela remoção/consumo da biomassa de carcaças em decomposição (REED, 1958; OLIVEIRA-COSTA, 2007). Tais moscas podem ser atraídas a grandes distâncias pelo cheiro da carcaça, devido à presença de estruturas altamente especializadas para a detecção dos odores provenientes do processo putrefativo, chegando pouco tempo após a morte e, em alguns casos, permanecendo neste substrato durante todos os estágios de decomposição (CATTS, GOFF, 1992; CAMPOBASSO, VELLA, INTRONA, 2001). Tal fato revela o importante papel destas famílias, justificando a utilização de algumas espécies inclusas nessas categorias como modelos biológicos em pesquisas direcionadas à Entomologia Forense. No caso de corpos enterrados, a colonização por dípteros é limitada, pois a detecção dos odores da decomposição é dificultada e as moscas, exceto algumas espécies de Phoridae, não são capazes de se estabelecerem no corpo enterrado em uma profundidade superior a 30 cm (CAMPOBASSO, VELLA, INTRONA, 2001).

Espécies do gênero *Chrysomya* (Calliphoridae), têm sido coletadas em grande número em diversos trabalhos de Entomologia Forense realizados na região do estado de São Paulo e no Brasil (SOUZA, LINHARES, 1997; MARCHIORI et al., 2000; CARVALHO et al., 2000; THYSSEN, 2000; CARVALHO; LINHARES, 2001; RIBEIRO, 2003; TAVARES, 2003; CARVALHO et al., 2004; ROSA, 2007; MORETTI et al, 2008a) indicando a relevância de tais

espécies para estudos forenses. O gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) é originário do Velho Mundo e a hipótese explicativa para a introdução das espécies *C. megacephala* (Fabricius), *C. albiceps* (Wiedemann) e *C. putoria* (Wiedemann) (= *C. chloropyga*) nas Américas é que estas tenham entrado juntamente com navios de tráfico de escravos provenientes do continente africano (GUIMARÃES, PRADO, LINHARES, 1978).

#### **1.4- Estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM)**

Para a determinação do IPM vários parâmetros podem ser analisados, contudo este cálculo se torna impreciso quanto maior for o tempo decorrido da morte, devido a uma série de mudanças ocorridas no corpo. Dentre os métodos mais usuais podem ser mencionados: a razão da perda de água através da superfície tegumentar, também conhecido por evaporação cutânea, mais evidente em fetos e crianças, que necessita de um conhecimento prévio da massa corpórea do cadáver; a rigidez cadavérica (*rigor mortis*), ocasionada pela desidratação muscular e glicólise anaeróbica, que gera o endurecimento das fibras musculares; a diminuição da temperatura corporal, altamente dependente de fatores como a temperatura do ambiente, as vestimentas, a posição, o estado de nutrição do corpo ou o local; os livores cadavéricos, que são manchas formadas pelo depósito de sangue em regiões de declive do corpo; os fenômenos transformadores ou cadavéricos; a liberação de gases provenientes da putrefação; a formação de cristais de Westenhöffer-Rocha-Valverde no sangue putrefeito; e as análises do conteúdo estomacal (permitindo estimar a hora da última refeição da vítima) e de fundo de olho (formação do anel isquêmico perivascular na retina devido à paralisação da circulação) (FRANÇA, 2008).

As modificações sofridas por um cadáver em decomposição fazem parte de um processo contínuo que segue uma ordem constante e freqüente. Essas modificações podem ser divididas em estágios para facilitar o estudo, sendo que o tempo de duração de cada etapa não é fixo e imutável, podendo diferir. Isto porque o tempo de decomposição sofre interferência de fatores inerentes à matéria (idade, causa da morte, constituição e integridade do corpo) e ao ambiente (temperatura, umidade do ar, precipitação, incidência luminosa) no qual o cadáver se encontra (BORNEMISSZA, 1957; CARRERA, 1991; CAMPOBASSO, VELLA, INTRONA, 2001). Segundo Bornemissza (1957), o cadáver/carcaça passa por cinco estágios de decomposição descritos da seguinte maneira:

I. *Decomposição inicial (ou carcaça recente)*: carcaça apresenta-se fresca externamente e em decomposição internamente; propicia a atividade de microrganismos, como bactérias, protozoários e nematódeos, presentes no animal antes de sua morte;

II. *Putrefação (ou inchaço)*: acúmulo de gases produzidos internamente, acompanhado da liberação de odores de putrefação fresca;

III. *Putrefação escura (decomposição ativa)*: rompimento do corpo com escape de gases, consistência cremosa com partes expostas negras e odor de putrefação muito forte;

IV. *Fermentação (decomposição avançada)*: carcaça secando por fora com alguns restos frescos; superfície ventral do corpo embolorando devido à fermentação;

V. *Estágio final ou seco (restos de esqueleto)*: a carcaça encontra-se quase seca, diminuindo a velocidade de decomposição.

Quando os procedimentos tradicionais tornam-se inespecíficos, comprometendo a acurácia da estimativa do IPM, a Entomologia Forense apresenta-se com uma alternativa de maior precisão para o cálculo da cronotanatognose, especialmente nos casos nos quais o tempo decorrido do óbito ultrapassa três dias (CATTS; HASKELL, 1990). Para as análises entomológicas torna-se imprescindível a identificação taxonômica correta dos espécimes coletados, além do conhecimento de quais espécies de insetos estão associadas ao material em decomposição, sua biologia, ecologia e das condições intrínsecas e extrínsecas na progressão do processo putrefativo que possam interferir no desenvolvimento de tais espécies (CARRERA, 1991; SIEGEL, KNUPFER, SAUKKO, 2000). Isto porque o tempo de decomposição sofre interferência de fatores inerentes à matéria (idade, causa da morte, constituição e integridade do corpo) e ao ambiente (temperatura, umidade do ar, precipitação pluviométrica, incidência luminosa) no qual o cadáver se encontra, e até mesmo da massa larval presente (BORNEMISSZA, 1957; CARRERA, 1991; BYRD; CASTNER, 2001; CAMPOBASSO, VELLA, INTRONA, 2001).

Em geral, duas formas podem ser utilizadas para estimar o IPM quando este cálculo é fundamentado em evidências entomológicas. A primeira baseia-se no estudo da taxa de desenvolvimento de ovos, larvas e/ou pupas encontradas na matéria orgânica em decomposição. Neste caso, os imaturos de estádios mais adiantados são coletados, sendo que parte da amostra é fixada e a outra parte, criada até a formação de adultos para fins de identificação taxonômica e comparação com bancos de dados sobre biologia e ecologia pré-existentes (restritos a algumas

espécies), fornecendo um intervalo mínimo de exposição do corpo. Nesta maneira, o IPM pode ainda ser estimado calculando-se o padrão de dependência da temperatura (metodologia conhecida por graus-dia acumulados ou graus-hora acumulados); a regressão linear em função da temperatura ou do ganho de massa dos imaturos; ou por um modelo matemático de crescimento larval que utiliza uma constante de alometria para correlacionar massa e gasto energético, dentre outros procedimentos menos usuais. O segundo modo analisa a sucessão da entomofauna que coloniza o cadáver, associando o aparecimento de determinadas espécies à fase de decomposição na qual são encontradas, uma vez que estas espécies apresentam preferência por determinados estágios de putrefação dos tecidos de acordo com a progressão do processo (CATTS; HASKELL, 1990; BYRD; CASTNER, 2001; MARCHENKO, 2001; OLIVEIRA-COSTA, 2007).

### **1.5- Entomotoxicologia**

Quando análises convencionais não podem ser realizadas, a utilização da artropodofauna necrófaga mostra-se como uma valiosa alternativa para a investigação, por exemplo, de substâncias tóxicas de uso contínuo, freqüente ou esporádico (neste último caso, associada à causa da morte ou utilizada momentos antes do óbito), assim como seus metabólitos presentes no cadáver, demonstrando que estas podem retardar ou acelerar o desenvolvimento de algumas formas imaturas de certas espécies, principalmente de moscas (GOFF et al., 1991; BOUREL et al., 1999; BOUREL, et al., 2001b; CARVALHO; LINHARES; TRIGO, 2001; CARVALHO, 2004; GUPTA; SETIA, 2004). Isto aponta para a necessidade de se fazer observações considerando este parâmetro para inferir o IPM, uma vez que, ao interferirem no ciclo de desenvolvimento dos insetos, a presença de substâncias tóxicas pode induzir ao erro da estimativa (INTRONA, CAMPOBASSO, DIFAZIO, 1998; GREENBERG, KUNICH, 2002).

A Entomotoxicologia define-se, então, como a ciência que aplica análises toxicológicas a insetos que se alimentam de tecidos em decomposição a fim de identificar qualitativa e, em alguns casos, quantitativamente, drogas e toxinas presentes neste substrato, além de estudar como estas substâncias podem influenciar o ciclo de desenvolvimento destes organismos ou alterar a atratividade destes pela carcaça/cadáver (BEYER, ENOS, STAJIC, 1980; INTRONA, CAMPOBASSO, GOFF, 2001). Esta ramificação da Entomologia Forense obteve denotado desenvolvimento no final de 1970, período no qual a detecção de várias drogas e seus metabólitos em amostras entomológicas tornou-se possível (GUPTA, SETIA, 2004).



O encontro de cadáveres em fases bem avançadas de decomposição ou esqueletização não é incomum. Em certos casos, em consequência da causa ou pelo tempo decorrido da morte, pode haver, devido aos processos naturais da decomposição, inviabilização de amostras usadas em análises toxicológicas, como sangue, urina e órgãos, tornando os insetos uma alternativa adequada para este fim (BEYER, ENOS, SATJIC, 1980; KINTZ et al., 1990b; KINTZ, TRACQUI, MANGIN, 1990; BYRD, CASTNER, 2001). Outro fator a ser considerado é que a utilização de tecidos vivos é sempre mais indicada a esses testes, sendo que a forma de assimilação da droga pelo inseto ocorre exclusivamente por meio da alimentação no substrato contaminado (KINTZ et al., 1990b; KINTZ, TRACQUI, MANGIN, 1990).

Poucos estudos têm sido desenvolvidos para avaliar os efeitos de contaminantes de tecidos animais, como toxinas e poluentes ambientais, no desenvolvimento e comportamento de insetos necrófagos. Por isso, tais questões, assim como o aprofundamento nas técnicas de análise dessas substâncias por meio do exame dos insetos têm se apresentado como campos promissores da Entomotoxicologia (BYRD, CASTNER, 2001). As drogas e seus metabólitos podem ser detectados nas larvas quando a taxa de acumulação excede a de eliminação, entretanto este mecanismo de bioacumulação nos imaturos e como esta atividade interfere no desenvolvimento dos espécimes ainda não são bem esclarecidos (OLIVEIRA-COSTA, 2007).

A quantificação da droga por meio dos artrópodes torna-se mais complexa devido ao tropismo dos fármacos e toxinas por determinados órgãos. Isto faz com que a concentração dessas substâncias nas larvas seja dependente do tecido fonte de alimentação desse imaturo, causando interferências nessa observação. Em rotina laboratorial, ocorre a maceração e homogeneização das larvas para formar um *pool* que é submetido ao teste analítico, não considerando o local do corpo do qual a amostra foi retirada (BEYER, ENOS, SATJIC, 1980; KINTZ et al., 1990a; KINTZ et al., 1990b).

A correlação entre a concentração de drogas presentes nos tecidos dos quais as larvas se alimentam e nos tecidos dos insetos é bastante controverso. Alguns estudos (GOFF, OMORI, GOODBROD, 1989; INTRONA et al., 1990; KINTZ et al., 1990b) apontam para a existência dessa correlação, apesar de considerarem a diminuição dos níveis da droga nos imaturos em comparação à concentração observada nos tecidos usados como recurso alimentar. Contrariamente, outros trabalhos (KINTZ et al., 1990a; NOLTE, PINDER, LORD, 1992; SADLER, SENEVIRATNE, POUNDER 1997) indicam não haver a existência de tal relação em

decorrência do processo de acumulação e eliminação de substâncias pelas larvas que pode variar conforme a droga e a espécie em questão e ainda não estão esclarecidos, tornando este tipo de análise imprecisa. Além disso, para a aplicabilidade da entomotoxicologia fatores como a correta determinação da espécie necrófaga, a possível redistribuição ou estabilização da droga após o óbito, a farmacocinética e farmacodinâmica dos compostos em questão, a interação de várias substâncias no caso de uso associado de várias drogas, devem ser considerados para que as inferências provenientes desta metodologia não sejam invalidadas (TRACQUI et al., 2004).

A análise de fármacos, drogas e substâncias tóxicas presentes em insetos (imaturos, adultos, pupários ou exúvias) que se alimentaram da matéria orgânica contaminada ocorre por meio de procedimentos analíticos que incluem o radioimunoensaio (RIA), a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GC/MS), a cromatografia de placa ou camada delgada (TLC) ou a cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (HPLC/MS) (BYRD, CASTNER, 2001; OLIVEIRA-COSTA, 2007). Os insetos frequentemente utilizados nessas análises são espécimes das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae (Diptera) e também Dermestidae (Coleoptera) (GAGLIANO-CANDELA, AVENTAGGIATO, 2001).

Em 1890, Webster observou a presença de forídeos (*Conicera* sp.) (Diptera: Phoridae) associados a um cadáver em decomposição com toxinas, neste caso arsênico, contudo sem acreditar no valor forense dessa observação (GREENBERG, KUNICH, 2002). A primeira proposição do uso de espécimes entomológicos para análises toxicológicas, precisamente larvas, ocorreu em 1980, com o trabalho no qual, devido à ausência de tecidos íntegros do cadáver encontrado já em avançado estágio de putrefação, larvas de *Cochlimoyia macellaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) foram coletadas e submetidas a análises toxicológicas (TLC e HPLC/MS), confirmando suspeita da presença de fenobarbital gerada por informações anteriores que apontavam suicídio por *overdose* desse fármaco (BEYER, ENOS, SATJIC, 1980).

Posterior a esse estudo, outros foram realizados corroborando o emprego dos insetos em análises toxicológicas realizadas exclusivamente com estas ‘matérias-prima’ ou simultaneamente com amostras do próprio cadáver, afirmando a aplicabilidade de tal ferramenta em processos criminais. As principais substâncias estudadas são as comumente usadas de forma abusiva e apontadas como as mais recorrentes em casos de suicídios e mortes por intoxicação, como os antidepressivos (barbitúricos), opióides (morfina), narcóticos (cocaína) (GOFF, OMORI,

GOODBROD, 1989; SADLER et al, 1995; GOFF et al., 1997; GAGLIANO-CANDELA, AVENTAGGIATO, 2001; INTRONA, CAMPOBASSO, GOFF, 2001; CAMPOBASSO et al., 2004).

Para verificar a bioacumulação de mercúrio em insetos sarcosaprófagos, larvas de califorídeos, coleópteros adultos predadores e seus imaturos foram avaliados. Foi observado que os califorídeos, assim como os coleópteros predadores, possuem alta tolerância e capacidade de bioacumular mercúrio, principalmente quando esta substância apresenta-se na forma de metilmercúrio, além de apresentarem mecanismos para excreção deste composto, especialmente na fase adulta. Tal fato indicou a existência de ao menos dois níveis tróficos para a bioacumulação de mercúrio abaixo dos predadores vertebrados (NUORTEVA, NUORTEVA, 1982).

Sohal e Lamb (1977; 1979) investigaram a deposição e excreção de metais em adultos de *Musca domestica* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae). Nesses estudos, foram oferecidas dietas contendo minerais (sulfato de cobre e gluconato de ferro) aos imaturos de moscas-domésticas que, após a emergência dos adultos, foram submetidas a procedimentos analíticos, imunohistoquímicos e de microscopia eletrônica de varredura. Observou-se que esse díptero apresenta tolerância a estes compostos e que a concentração destas substâncias aumenta proporcionalmente à idade da mosca, apesar de não serem visíveis efeitos tóxicos na sobrevivência do adulto. Foi constatado também que o zinco e o cálcio são primariamente depositados nos túbulos de Malpighi, ao passo que o cobre é armazenado no intestino médio.

Malathion, um pesticida organofosforado, foi recuperado em larvas de *C. megacephala* e *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) provenientes de um caso de suicídio por envenenamento. Esse composto foi detectado por meio de GC e mostrou ser também interferente na taxa de desenvolvimento desses dípteros, além de adiar a oviposição por vários dias, contribuindo para uma subestimativa do IPM (GUNATILAKE, GOFF, 1989).

*Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) foi criada utilizando músculos de cadáveres provenientes de casos de suicídio por amitriptilina, temazepam e uma combinação de trazodone e trimipramina, antidepressivos, exceto temazepam, um benzodiazepínico. As análises toxicológicas demonstraram que estes compostos foram incorporados nos tecidos larvais. Contudo, com a transferência dos imaturos para substratos sem a presença das drogas para a conclusão dos estágios de alimentação e pupariação, foi possível

observar que essa espécie é capaz de eliminar tais substâncias rapidamente, inclusive durante o estágio de pupa. Além disso, a identificação desses componentes na pupa foi considerada insuficiente, pois em concentrações muito baixas (menores que 0,01 µg droga/g de larva) os testes toxicológicos tornam-se insensíveis (SADLER et al, 1995). Por isso, recomenda-se que apenas larvas que se alimentam ativamente no substrato sejam coletadas e utilizadas em investigações toxicológicas (SADLER et al, 1995; SADLER, SENEVIRATNE, POUNDER, 1997).

Larvas de *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) foram criadas em fígados provenientes de cadáveres humanos, previamente analisados por GC/MS e positivos para a presença de opióides, cocaína, barbitúricos e antidepressivos como clomipramina, amitriptilina, nortriptilina, levomeprazina e tioridazina, a fim de se estabelecer a existência ou não de correlação entre a presença de drogas em tecidos humanos e das larvas necrófagas. Para os opióides e cocaína, tanto larvas que se alimentam ativamente quanto pré-pupas apresentam-se como amostras adequadas a análises toxicológicas. No entanto, as propriedades químicas dos antidepressivos e barbitúricos devem ser consideradas por interferirem diretamente no desenvolvimento das larvas, afetando a detecção analítica dessas substâncias (CAMPOBASSO et al., 2004).

O acúmulo de drogas em larvas também pode ser determinado com o uso de técnicas histopatológicas, por meio da reação de imunohistoquímica. Essa técnica permitiu identificar, por exemplo, uma rápida absorção de morfina pelo epitélio intestinal de larvas de terceiro estágio de *Calliphora vomitoria* (Linnaeus) ao observar a deposição desta droga em uma área situada entre a endocutícula e a exocutícula (BOUREL et al., 2001a). Esse tipo de análise pode ser estendido inclusive aos pupários, na ausência de outras amostras, pois o tegumento da pré-pupa é destacado para formar esta estrutura em dípteros muscóideos, como já foi visto anteriormente.

Tecidos e fluidos (coração, fígado, pulmão, baço, rim e bile), assim como larvas de califórídeos recolhidas de um corpo foram submetidos a testes toxicológicos (HPLC) revelando, em todos os ensaios, a presença de triazolam, oxazepam, fenobarbital, alimemazina, clomipramina, compostos usuais em casos de suicídio (KINTZ et al., 1990a). Bromazepam e levomeprazina foram identificados, por meio de HPLC, em larvas de Piophilidae (Diptera) coletadas de um corpo completamente deteriorado (KINTZ et al., 1990b).

A recuperação de cocaína e seu metabólito benzoilecgonina, por meio de RIA seguido de GC/MS, em larvas de *C. vicina* coletadas já mortas sobre um cadáver, associada à análise toxicológica de amostras de músculo esquelético e ao conhecimento da meia-vida da cocaína *in vivo*, possibilitou apontar *overdose* por cocaína como a causa da morte (NOLTE, PINDER, LORD, 1992). Em condições experimentais, a presença dessa droga e seu metabólito mostraram-se interferentes no desenvolvimento de *Boettcherisca peregrina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Sarcophagidae), submetidos às maiores concentrações da droga, acelerando o tempo requerido para atingir a fase de pupa e emergência dos adultos, o que pode gerar uma super estimativa de 24 horas no cálculo do IPM (GOFF, OMORI, GOODBROD, 1989).

O desenvolvimento das técnicas de extração de compostos presentes em fios de cabelo proporcionou a obtenção de informações toxicológicas a partir de resquícios quitinosos dos insetos como pupários, exúvias e até mesmo fragmentos do exoesqueleto, artefatos comumente recuperados em restos mortais mumificados ou esqueletizados (BYRD, CASTNER, 2001). A primeira utilização de tecidos quitinizados (pupários de forídeos, exoesqueletos e fezes de coleópteros dermestídeos) para a detecção de drogas foi realizada em um corpo mumificado encontrado em uma residência em 1991 (MILLER et al., 1994).

Vários estudos experimentais foram desenvolvidos utilizando modelos animais. O efeito do antidepressivo tricíclico amitriptilina em *Parasarcophaga ruficornis* (Fabricius) (Diptera: Sarcophagidae) foi avaliado mediante a utilização de coelhos submetidos a diferentes concentrações dessa droga. Além da identificação desse composto nas larvas por meio do HPLC, foi observada maior mortalidade das larvas exposta à droga, se comparadas ao grupo controle, e a alteração do tempo de desenvolvimento larval, com um retardo de cerca de 77 horas para os espécimes criados com os tecidos contendo as maiores concentrações deste fármaco, fato que, se desconsiderado, pode gerar subestimativa do IPM (GOFF et al., 1993).

O efeito da metanfetamina e de um composto derivado, o 3,4 metilenedioximetanfetamina (MDMA), também foram estudados para *Parasarcophaga (Liopygia) ruficornis* (Fabricius) (Diptera: Sarcophagidae). No primeiro caso, o tempo requerido para pupariação foi maior para os grupos expostos à droga, indicando um aumento de 18 horas no tempo de desenvolvimento larval e 48 horas na fase de pupa, alterando significativamente o IPM se o parâmetro para cálculo forem tais estágios. Apesar disso, a droga não foi detectada pela técnica do RIA devido à ocorrência de reações inespecíficas que geraram falsos positivos (GOFF, BROWN, OMORI, 1992). Para o

MDMA foi verificada uma diminuição no tempo de desenvolvimento larval do grupo exposto à maior concentração dessa substância, assim como a menor taxa de mortalidade. A técnica de HPLC/MS permitiu a recuperação da droga nas larvas e pupários em quantidades diretamente relacionadas às concentrações presentes nas amostras biológicas dos coelhos que, depois de mortos, forneceram o substrato alimentar para a criação desses imaturos (GOFF et al., 1997).

Ainda utilizando *P. (L.) ruficornis*, foi avaliado o efeito de fenciclidina, um tranqüilizante animal considerado droga de abuso, administrado em coelhos utilizados como substrato alimentar para os imaturos deste díptero. A taxa de desenvolvimento larval não sofreu alteração, embora o estágio de pré-pupa tenha sido menor e a fase de pupa maior para os grupos submetidos ao fármaco. Já a taxa de mortalidade foi proporcional ao aumento da concentração da droga. A análise toxicológica de tecidos provenientes do coelho assim como das larvas, pela GC/MS, permitiram a identificação da fenciclidina, apesar de não ser possível a correlação concentração da droga/tecido em ambas as fontes de amostras (GOFF et al., 1994).

A fim de se padronizar protocolos para estudos entomotoxicológicos, a utilização de coelhos como modelos animais foi avaliada por meio da perfusão de morfina, que permitiu elucidar também as vias de distribuição dessa substância após administração intravenosa, possibilitando a realização de inferências em casos reais a partir de observações experimentais. Houve rápida absorção e lenta eliminação deste composto e, também, diferença de concentração da droga de acordo com o órgão em questão (HÉDOUIN et al., 1999a).

Posteriormente, a detecção de níveis de morfina em larvas e pupários de *L. sericata* (HÉDOUIN et al., 1999b), *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) e *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (HÉDOUIN et al., 2001) (Diptera: Calliphoridae) criadas em carcaças de coelhos previamente tratados com diferentes concentrações deste opióide foi realizada. As concentrações da droga nos tecidos do coelho foram similares às encontradas em humanos em casos de *overdose*. Contudo a existência de correlação entre este valor e as amostras entomológicas foi observada apenas para larvas de terceiro estágio. Para *L. sericata*, também há registro de que a presença de morfina pode gerar uma subestimativa de 24 horas no cálculo do IPM, por ocorrer um retardo na taxa de desenvolvimento larval dessa espécie (BOUREL et al., 1999). A recuperação de morfina em pupários e adultos dissecados de *L. sericata* e em pupários de *Dermestes frischii* Kugelmann (Dermestidae) também foi possível por meio de RIA, contudo apenas em altas concentrações (BOUREL et al., 2001b). Assim como as espécies de moscas

citadas anteriormente, os coleópteros *D. frischi* e *Thanatophilus sinuatus* (Fallen) (Coleoptera: Silphidae) também podem ser utilizados para detecção de morfina. Larvas, pupas e adultos de *D. frischi* mostraram-se positivos para a presença de morfina, observação feita por meio da aplicação da técnica de RIA, sendo possível uma correlação da concentração desta droga nas amostras entomológicas e nos tecidos do coelho utilizados como recurso alimentar. Para *T. sinuatus*, essa correlação apresentou melhores parâmetros nos segundo e terceiro estádios larvais, sendo que nas pupas a morfina não foi detectada (BOUREL et al., 2001c).

A heroína, droga derivada da morfina, foi recuperada na forma de metabólitos (codeína e morfina) por RIA em tecidos de coelho, assim como larvas de *B. peregrina* foram positivas para a presença de opióide em idades específicas. Similarmente às observações feitas para a morfina, a heroína pode alterar o IPM em 29 horas ou de 18 a 38 horas quando o cálculo é realizado com base nos desenvolvimentos larval e da pupa, respectivamente, devido ao ganho de massa mais rápido ocasionado pela exposição à droga (GOFF et al., 1991).

Por *L. sericata* poder ser empregada em bioterapia (utilização de larvas necrófagas para debridamento de feridas), a ação de sete antibióticos (ampicilina, cefazolina, ceftizoxima, clindamicina, gentamicina, mezlocilina e vancomicina) no desenvolvimento desta espécie foi avaliada, demonstrando resultados aplicáveis também a Entomotoxicologia. Gentamicina e cefazolina causaram uma diminuição significativa na taxa de sobrevivência larval, os demais antibióticos não interferiram nas taxas de sobrevivência, formação de pupas ou ganho de massa dos imaturos (SHERMAN, WYLE, THRUPP, 1995).

A ação de analgésicos e barbitúricos presentes nos recursos alimentares utilizados por larvas de *C. vicina* foi avaliada. Não foi possível estabelecer um padrão geral para a ação de analgésicos e barbitúricos no desenvolvimento deste díptero, com base nas estruturas químicas semelhantes. Apesar disso, a ausência de drogas nas larvas não indica necessariamente a ausência de drogas nos tecidos dos quais as larvas tenham se alimentado (SADLER et al., 1997). Os efeitos causados pelo paracetamol em larvas de *C. vicina* que consumiram fígado contaminado com este analgésico foram avaliados também por O'Brien e Turner (2004). Os autores observaram que este fármaco afeta ligeiramente o desenvolvimento desse califórideo, por ter sido visível uma diferença de cerca de 12 horas entre o segundo e quarto dias de desenvolvimento dos imaturos se comparados ao grupo criado na ausência desse composto. Todavia, foi constatado

anteriormente que o paracetamol é eficientemente eliminado por esta espécie, não sendo detectado posteriormente a esse período (SADLER et al., 1997).

Nordiazepam, um benzodiazepínico de longa duração, e seu metabólito, oxazepam presentes em larvas e pupários de *C. vicina* foram detectados e quantificados por meio da LC-MS/MS. Para as larvas criadas em concentrações próximas à terapêutica, picos de nordiazepam foram registrados no quarto dia, sendo que a partir do sétimo até oitavo dias apenas oxazepam foi detectado. No pupário, tanto a droga quanto seu metabólito foram recuperados, indicando haver metabolização e bioacumulação destas substâncias. Apesar de serem detectados, a droga e seu metabólito não alteraram significativamente o desenvolvimento dos imaturos (PIEN et al., 2004).

Diazepam, também da classe dos benzodiazepínicos, foi detectado por meio da GC-MS em tecidos de coelho e em larvas de *C. albiceps* e *C. putoria*, oriundos de um experimento usando este modelo animal previamente injetado com tal droga como modelo e substrato de criação para este califórídeo. Foi possível observar, ao contrário do nordiazepam, que o desenvolvimento dos imaturos foi alterado por este composto, sendo mais acelerado no período de 18 a 54 horas em comparação ao grupo criado sem a presença desse benzodiazepínico (CARVALHO, LINHARES, TRIGO, 2001).

*Sarcophaga (Curranella) tibialis* (Macquart) (Diptera: Sarcophagidae) também foi avaliada quanto a alterações mediante a presença de drogas no recurso alimentar utilizado pelos imaturos. Frente a metohexital de sódio, um barbitúrico depressor do metabolismo, e o esteróide hidrocortisona estimulante do metabolismo, ambos adicionados a fígado de galinha, posteriormente oferecido às larvas de *S. tibialis*, não foram observadas diferenças significativas nas taxas de sobrevivência tanto das larvas quanto das pupas e dos adultos emergidos. Ambas as drogas retardaram o desenvolvimento larval dessa espécie, sobretudo quando em baixas concentrações, e para o barbitúrico foi observada uma diminuição no tempo requerido para alcançar o estágio de pupa em comparação ao grupo controle. Contudo, o tempo total de desenvolvimento não foi alterado para os diferentes tratamentos, inclusive com relação aos grupos mantidos sem a presença dessas substâncias (MUSVASVA et al., 2001).

Para a análise rápida e detecção quantitativa de barbitúricos em larvas e pupários de *C. vicina*, Wood e colaboradores (2003) propuseram a utilização de LC-MS-MS. Os testes realizados para avaliar a aplicabilidade desta metodologia a amostras entomológicas mostraram a alta sensibilidade deste tipo de análise, sendo possível a detecção de nordiazepam e oxazepam em



uma única larva ou pupário, com limites de detecção variando de 1,88 a 5,13 pg/mg para larva e de 6,28 a 19,03 pg/mg para o pupário.

A ação de escopolamina, droga depressora do sistema nervoso central, utilizada como analgésico foi avaliada para o desenvolvimento do califórideo *C. putoria*. Foram observados efeitos significativos de acordo com a concentração dessa droga nos imaturos. O grupo controle e o de menor concentração obtiveram maior ganho de massa, o grupo com a concentração intermediária de escopolamina apresentou desenvolvimento mais lento e as larvas submetidas a maior concentração da droga apresentaram 100% de mortalidade. A taxa de sobrevivência na fase de pupa foi decrescente considerando o controle e o aumento da concentração da droga (GRELLA et al., 2007). Um outro composto também depressor do sistema nervoso central, o brometo de butilescopolamina, foi investigado para uma outra espécie de califórideo, a *C. megacephala*. Os resultados observados foram semelhantes aos encontrados no estudo anterior, com o retardo no desenvolvimento para os espécimes expostos a concentrações intermediárias da droga, morte dos imaturos para a maior concentração, além de ter sido avaliado o tamanho das larvas que foi menor para aquelas submetidas ao fármaco (OLIVEIRA et al., 2009).

A influência de testosterona de uso veterinário no desenvolvimento larval de *C. albiceps* foi investigada por meio da realização de um estudo experimental, a partir da exposição de ovos desta espécie a diferentes concentrações do referido hormônio acrescido em dietas artificiais de criação. Não foi observada alteração no tempo de desenvolvimento dessa mosca, contudo, as larvas expostas à testosterona apresentaram um ganho de massa cinco vezes superior ao alcançado pelos imaturos do grupo criado sem a adição desta substância (FERRARI et al., 2008).

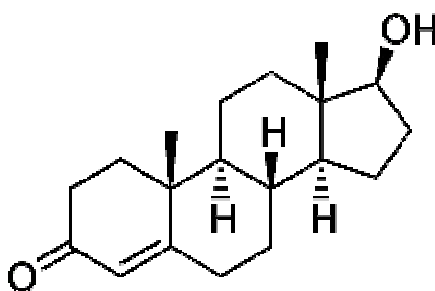
Apesar do conhecimento restrito sobre a atuação de muitos compostos na taxa de desenvolvimento de insetos necrófagos, a aplicação da Entomotoxicologia em casos reais, como foi exposto, tem se mostrado bem sucedida. Esta alternativa torna-se mais uma importante ferramenta em investigações forense, contudo são necessários outros estudos, mais aprofundados, focando questões como bioacumulação, o metabolismo dos insetos frente à ação de drogas, estudos experimentais para a formação de banco de dados, a fim de se compreender e explorar todo o potencial dessa vertente (BYRD, CASTNER, 2001; INTRONA, CAMPOBASSO, GOFF, 2001).

## 1.6- Esteróides Anabólico-Androgênicos

O aumento de mortes relacionadas ao consumo de drogas ilícitas, de abuso ou outras substâncias tóxicas apontam para o grande interesse em estudos entomotoxicológicos (INTRONA, CAMPOBASSO, GOFF, 2001). O consumo de drogas ilícitas tornou-se um sério problema nas sociedades em meados dos anos 60, coincidentemente com o movimento *hippie*, a Guerra do Vietnã e revoltas estudantis em vários países (SIEGEL, KNUPFER, SAUKKO, 2000). Em todo o mundo, cerca de 200 milhões de pessoas, aproximadamente 4,8% da população mundial entre 15 e 64 anos, fazem uso de drogas ilícitas (UNODC, 2007). Juntamente com os narcóticos, os esteróides anabólico-androgênicos (EAA) são utilizados indiscriminadamente por atletas, praticantes de atividades físicas, adolescentes e indivíduos interessados em obter aumentos rápidos de massa muscular e força, além da diminuição do tempo de recuperação entre exercícios físicos intensos (LISE, *et al.* 1999). Os EAA têm sua produção, comércio, manipulação e uso controlados por serem consideradas substâncias que podem causar danos severos ao usuário em caso de abuso. Esta restrição faz com que muitos usuários busquem a obtenção destas substâncias por meios ilícitos, como o mercado negro e laboratórios clandestinos, tornando duvidosa a procedência da substância e do princípio ativo (SILVA, DANIELSKI, CZEPIELEWSKI, 2002).

Os esteróides anabolizantes ou esteróides anabólico-androgênicos são substâncias semi-sintéticas ou sintéticas derivadas da testosterona, hormônio sexual masculino (Fig. 2). Podem ser utilizados com fins terapêuticos no tratamento de algumas doenças como, por exemplo, sarcopenias, hipogonadismo, câncer de mama e osteoporose. Nos esportes, os EAA são utilizados a fim de aumentar a força física e a massa muscular por meio da atividade anabólica (promoção do crescimento muscular) superior à atividade androgênica (formação ou reafirmação dos caracteres sexuais masculinos) destas substâncias (SILVA, DANIELSKI, CZEPIELEWSKI, 2002; GOODMAN-GILMAN, 2003). A molécula de testosterona foi isolada, caracterizada quimicamente e seus efeitos básicos esclarecidos por volta de 1935, sendo possível, a partir de então, a produção e disponibilização de compostos sintéticos (YESALIS, 1993). A esterificação dos EAA confere à molécula propriedade lipofílica, permitindo a retenção desta substância no organismo por mais tempo, promovendo, conseqüentemente, um aumento de sua atividade (OGA, 1996), além de evitar a degradação antes da passagem para a circulação sistêmica (GOODMAN-GILMAN, 2003).

Na prática de esportes, a alteração da capacidade fisiológica de um determinado sistema orgânico a fim de se obter um resultado acima da capacidade normal do indivíduo, alterando o desempenho físico, psicológico e/ou período de recuperação física, afetando o rendimento mediante a utilização de substâncias químicas, ou outros meios artificiais, é conhecida como dopagem. Muitas vezes são utilizadas doses excessivas para o alcance de determinados efeitos e isto pode levar a intoxicações, desenvolvimento de tolerância e dependência. Além dos EAA e outros hormônios (do crescimento, gonadotrofinas e corticotrofina), estimulantes do sistema nervoso central (anfetaminas, metanfetaminas, cocaína e cafeína), depressores desse mesmo sistema (narcoanalgésicos e álcool), diuréticos e fármacos que atuam no sistema hematopoiético estão entre os agentes de dopagem mais utilizados (OGA, 1996).



**Figura 2.** Estrutura química da testosterona (CAS: 58-22-0) (Goodman-Gilman, 2003).

Ainda não se sabe ao certo se a hipertrofia muscular e o aumento da força devido ao uso de EAA são decorrentes da ação do princípio ativo ou da retenção de fluidos corporais, efeitos comportamentais ou placebo (SILVA, DANIELSKI, CZEPIELEWSKI, 2002). Contudo, quando utilizados em doses superiores à terapêutica, geralmente de 10 a 20 vezes (OGA, 1996), os EAA têm seus efeitos colaterais como calvície, hipertrofia prostática (em homens), acne, hipertensão, aumento das taxas de colesterol potencializando riscos de enfarte e derrame, limitação do crescimento para jovens (devido ao fechamento prematuro dos discos de crescimento das epífises ósseas), virilização em mulheres, ginecomastia, impotência, esterilidade, insônia, hepatotoxicidade, problemas em tendões e ligamentos (devido ao aumento da força e do tamanho das fibras musculares), retenção de fluidos corporais, mais evidenciados (GUIMARÃES-NETO, 2005). O reflexo dos efeitos colaterais pode ser observado também no aumento da taxa de mortalidade do

grupo de usuários dos EAA, aproximadamente 4,6 vezes maior em relação aos não usuários destas substâncias (CUNHA et al, 2004).

O uso ilícito dos EAA nos esportes parece ter iniciado na década de 50 com os halterofilistas e fisiculturistas, apesar da busca por meios que alterassem o desempenho em atividades físicas já ter sido relatado nos jogos olímpicos do final do século III a.C. O uso dos EAA é bastante difundido entre atletas, praticantes de musculação e frequentadores de academias. Contudo, devido ao uso abusivo, a estatística referente ao número de usuários não é clara e por vezes imprecisa. Estima-se que mais de 50% dos halterofilistas e cerca de 33% dos demais atletas tenham feito uso de EAA pelo menos uma vez (OGA, 1996).

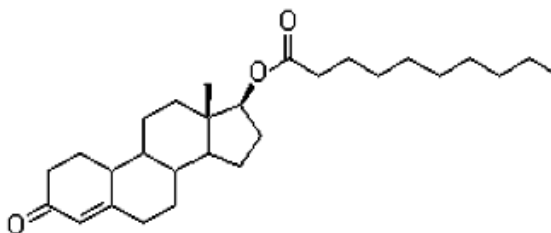
A utilização dos EAA baseia-se, na maioria dos casos, em experiências empíricas. Contudo, três padrões de uso são mais comuns: o ciclo, no qual há uma alternância entre períodos da administração e abstinência do fármaco; a pirâmide, no qual a dosagem é aumentada gradativamente até um limite pré-determinado, seguindo-se um decréscimo da quantidade utilizada até cessar o uso; e uma forma conhecida como “stacking”, que consiste no uso concomitante e alternado de vários esteróides, tendo por parâmetro o grau de toxicidade de cada substância empregada (SILVA, DANIELSKI, CZEPIELEWSKI, 2002; GUIMARÃES-NETO, 2005).

Os EAA mais usados segundo estatísticas do *National Institute on Drug Abuse* de 2001 (SILVA, DANIELSKI, CZEPIELEWSKI, 2002) são Anadrol<sup>®</sup> (oximetolona), Oxandrin<sup>®</sup> (oxandrolona), Dianabol<sup>®</sup> (metandrostebolona) e Winstrol<sup>®</sup> (estanozolol) dentre os de uso oral, e Deca-Durabolin<sup>®</sup> (decanoato de nandrolona), Durabolin<sup>®</sup> (fenilpropionato de nandrolona), Depo-testosterone<sup>®</sup> (cipionato de testosterona) e Equipoise<sup>®</sup> (undecilenato de boldenona), dentre os de uso injetável. Em estudos realizados em alguns estados brasileiros, os EAA mais citados entre os usuários foram Deca-Durabolin<sup>®</sup>, Durateston<sup>®</sup>, Winstrol<sup>®</sup>, Hemogenin<sup>®</sup> (oximetolona), Deposteron<sup>®</sup> (cipionato de testosterona), dentre outros, variando a frequência de cada droga de acordo com o grupo de usuários considerado (CONCEIÇÃO et al., 1999; SILVA, MOREAU, 2003; FRIZON, MACEDO, YONAMINE, 2005; SILVA et al., 2007; IRIART, CHAVES, ORLEANS, 2009).

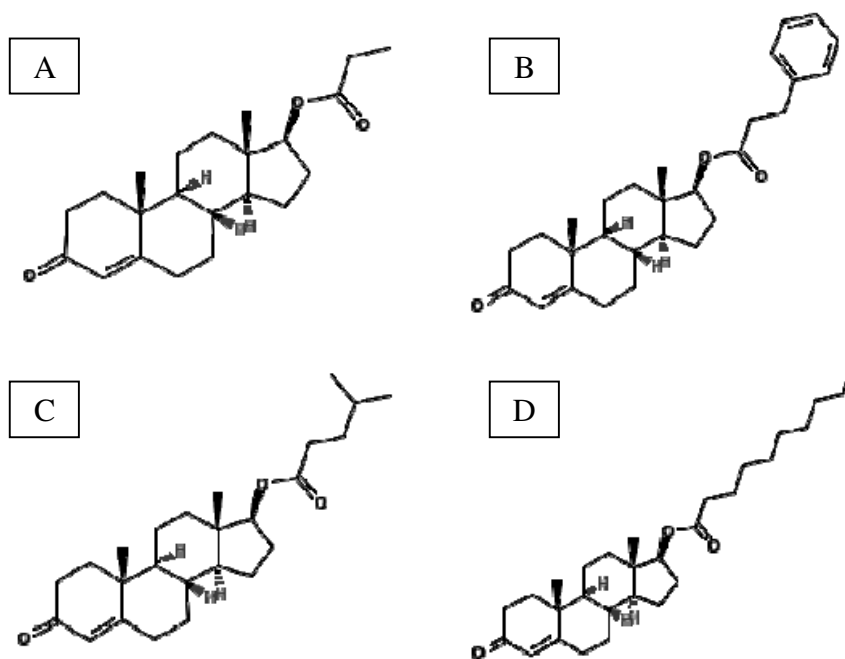
A nandrolona pertence à classe dos ésteres de testosterona, sendo mais utilizada na forma injetável de decanoato de nandrolona (Fig. 3) sob o nome comercial de Deca-Durabolin<sup>®</sup> - Organon do Brasil (OGA, 1996). Foi introduzida no mercado em 1962, oferecendo uma ação

prolongada devido à presença da droga no organismo até três semanas após a administração intramuscular (CUNHA et al, 2004). Por ser um anabolizante de baixo nível androgênico, devido ao metabólito resultante ter baixa afinidade pelo receptor androgênico, e por promover baixa retenção hídrica, o decanoato de nandrolona é bastante utilizada por mulheres e homens em fase de pré-competição e por mulheres fora de temporada de competição. Na maioria das vezes, esta substância é utilizada em séries, com a administração por um determinado período de tempo com dosagens específicas (decrecentes ou graduais), intercaladas a períodos sem a utilização ou ainda em séries de associação de duas ou mais drogas, como a associação do decanoato de nandrolona e os ésteres de testosterona. Para o decanoato de nandrolona, uma série pode ter dosagens variando de 200 a 25 mg (CUNHA et al, 2004; GUIMARÃES-NETO, 2005).

A testosterona comercializada sob o nome Durateston<sup>®</sup>, Organon do Brasil (combinação de quatro ésteres de testosterona: propionato, fenilpropionato, isocaproato e decanoato) (Fig. 4) é um hormônio sintético normalmente prescrito para o tratamento de câncer de mama na mulher, para auxiliar na recuperação de pacientes que passaram por cirurgias e/ou tratamentos de câncer que resultem em danos ao tecido muscular, homens hipogonádicos, estimular o ganho de peso para deficiência nutricional crônica ou Aids e estimular a produção das células vermelhas do sangue. Ocorre também o uso dos ésteres de testosterona por atletas e jovens com a finalidade de aumentar a massa corporal, a força muscular, o vigor e a resistência física (SANTOS, 2003).



**Figura 3.** Estrutura química do decanoato de nandrolona (CAS: 360-70-03), princípio ativo do Deca-Durabolin<sup>®</sup> (Goodman-Gilman, 2003).



**Figura 4.** Estrutura química dos ésteres de testosterona componentes do Durateston<sup>®</sup>: (A) Propionato de testosterona (CAS: 57-85-2); (B) Fenilpropionato de testosterona (CAS: 1255-49-8); (C) Isocaproato de testosterona (CAS: 15262-86-9); (D) Decanoato de testosterona (CAS: 5721-91-5) (Goodman-Gilman, 2003).

## 2. OBJETIVOS

1. Estudar e comparar o efeito de diferentes concentrações do decanoato de nandrolona – em uma proporção de aproximadamente 5 vezes a dose terapêutica (DT), 25 x DT e 50 x DT – na taxa de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), quando acrescida em dieta artificial e oferecida como fonte exclusiva para sua alimentação;
2. Estudar e comparar o efeito de diferentes concentrações da associação entre ésteres de testosterona e decanoato de nandrolona – em uma proporção de 1 x DT, 10 x DT e 100 x DT; e 5 x DT, 25 x DT e 50 x DT, respectivamente – na taxa de desenvolvimento e sobrevivência de imaturos de *C. putoria* e *C. albiceps* (Diptera: Calliphoridae), quando acrescidos em dieta artificial e oferecida como fonte exclusiva para sua alimentação.

### 3 – CAPÍTULO I - The effect of nandrolone decanoate on the development of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), flies of forensic importance from Brazil <sup>1</sup>

C. M. Souza, P. J. Thyssen & A. X. Linhares

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo State, Brazil, 13083-970.

**ABSTRACT** Necrophagous insects are valuable tools for post mortem interval (PMI) estimation or for determining the cause of death, especially when the corpse is in advanced decomposition. Due to the increase in deaths related to drug abuse, it is crucial to know how these substances affect the development of flies that feed on corpses to avoid errors in the PMI estimates. This study evaluated the effects of the nandrolone decanoate, an anabolic androgenic steroid commonly used by bodybuilders to increase body mass, on the development of *Chrysomya megacephala* (Fabricius), *C. putoria* (Wiedemann) and *C. albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Larvae obtained from fly colonies established in the lab were placed in plastic vials containing an artificial rearing diet, and divided in four experimental groups: 3 of them contained the following nandrolone decanoate concentrations: 4.5mg/kg, 22.5mg/kg and 45mg/kg; and a drug-free control group. Weights were recorded for groups of 10 larvae at 12h-intervals until pupation. No statistical significant differences were observed on mean larval weights, on emergency interval and on emergency rates for all groups. However, differences for the three species were observed during the larval development. Initially, *C. putoria* rearing in the highest concentration of decanoate showed greater weight gain. However, at older ages immatures presented lower mean weights than the control group. For *C. albiceps*, the highest concentration of decanoate negatively affected the mass gain during almost the entire larval development. These results indicate that a bias in the PMI estimate may occur if the effect of the drug is ignored.

**KEYWORDS** blow flies, hormone, post mortem interval, entomotoxicology

After death, animal tissues are attractive to a variety of invertebrates, especially sarcosaprophagous insects (Nuortueva 1977). The decomposition process may be influenced by a great number of factors, and among them is the important activity of dipterans belonging to the families Calliphoridae, Sarcophagidae and Muscidae as decomposers and scavengers (Souza and Linhares 1997, Byrd and Castner 2001). These flies are attracted from large distances, due to the presence of highly specialized sensillae sensitive to odours, to visit the carcass or breed in this substrate. Certain species can colonize a corpse for a limited interval time or for a specific stage of decomposition, so this produces a faunal succession (Catts and Goff 1992). For this reason, the

---

<sup>1</sup> Artigo escrito nas normas exigidas para submissão (realizada em 04-12-2009) ao periódico “Journal of Medical Entomology”.



entomology within the forensic context has been defined as the application of the study of insects and other arthropods aims to collect useful information for an investigation in the scope legal.

Forensic entomology can be used to provide: the determination of the post-mortem interval (PMI), of circumstances or cause of the death; the investigate whether there was displacement of the corpse; linking suspects to a criminal act; the analysis of any toxic substances, if autopsy cannot settle the cause of death (Nuorteva 1977, Smith 1986, Catts 1990). Some studies have demonstrated that the presence of drugs or toxins in decomposing tissues can affect the development rate of the insect, when such tissues are used as food, thus potentially altering the estimate of the PMI (Goff et al. 1989, Goff et al. 1991, Bourel et al. 1999, Bourel et al. 2001, Carvalho et al. 2001, Oliveira et al. 2009). Therefore, when this parameter does not taken into consideration, leading to errors in the PMI estimate (Introna et al. 1998, Greenberg and Kunich 2002).

Drugs such as anabolic androgenic steroids (AAS) are used indiscriminately by athletes, bodybuilders, teenagers and any person interested in obtaining rapid increase in muscle mass and strength, and to reduce recovery time between intense exercises (Lise et al. 1999). Questionnaires applied to strength training apprentices in some Brazilian states have reported that the users rate is between 6.5 and 20% according to age range and to economic and social conditions (Conceição et al. 1999, Silva and Moreau 2003, Frizon et al. 2005, Silva et al. 2007, Iriart et al. 2009).

Nandrolone decanoate is an injectable steroid belongs to testosterone esters class and is commercially known as Deca-Durabolin<sup>™</sup> (Organon from Brazil) (Oga, 1996). It has a low androgenic level, hence promoting low water retention. For this reason, it is widely used by women and men in the pre-competition phase/season/period and by women out of the competition season. The use of AAS is based on empirical experiences, which have determined that for nandrolone decanoate, a sequence of use may have dosages ranging from 200 to 25 mg. The collateral effects that may occur in use of high dosages are baldness, prostate hypertrophy, acne, hypertension, increasing on cholesterol rate intensifying risk of heart attack and stroke, limiting the growth for young people (due to the close of bone epiphysis prematurely), virilization in women, gynecomastia, impotence, infertility, insomnia, liver toxicity, problems with tendons and ligaments (due to the increasing on strength and size of muscle fibers), retention of body fluids, most evident (Guimarães-Neto 2005). These effects can be observed also in the

increasing of mortality rate of the AAS users, approximately 4.6 times higher than the nonusers of this substances (Cunha et al. 2004).

About 97% of testosterone, even as their synthetics, when present in the bloodstream, bind to plasmatic proteins to be carried and transferred to the tissues or degraded. The free amount is converted fastly by the liver and then excreted. Into the cells, this hormone is broked in metabolites. However, some effects observed in the organism can occur even when the steroid is in its unmetabolized form (Guyton and Hall 2002).

In this study, we evaluated the larval developmental rate and the viability of *Chrysomya megacephala* (Fabricius), *C. albiceps* (Wiedemann), and *C. putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) reared in artificial diets containing nandrolone decanoate. These blowflies, originally from the Old World, were introduced into southern Brazil in the 1970's (Guimarães et al. 1978), and they are important from forensic entomology standpoint (Souza and Linhares 1997, Marchiori et al. 2000, Carvalho et al. 2000, Carvalho and Linhares 2001, Carvalho et al. 2004, Moretti et al. 2008).

## Materials and Methods

Adults of *C. megacephala*, *C. albiceps* and *C. putoria* were collected in the urban area of Campinas City, São Paulo, Brazil. Decaying bovine liver, chicken gizzard and/or fish, were used as bait and the specimens collected were taken to the lab where they were maintained in screen plastic cages in a controlled temperature room at  $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $60\% \pm 10\%$  of relative humidity, and a 12-12h photoperiod. The larvae used in the experiments were obtained from colonies established from these collected flies.

For each *Chrysomya* species, the following procedure was performed: the newly hatched larvae were counted and separated with a thin brush in groups of 150 individuals each, which were kept in plastic vials covered with nylon, containing an artificial diet prepared according to Estrada et al. (2009). This artificial rearing diet was composed of powered milk, yeast, casein, antifungal, agar and animal tissues (in this case, chicken heart and bovine stomach in the proportion of 2:1). The vials were maintained in a growth chamber (Fanem<sup>TM</sup> model 387), with the same temperature, relative humidity, and photoperiod as for the adults. During the preparation of the artificial diet, the drug was added. Nandrolone decanoate is available in oily solution form, marketed as Deca-Durabolin<sup>TM</sup> 50 mg (Organon from Brazil). Considering the therapeutic dosage

(TD) of this anabolic androgenic steroid for adults (approximately 60 kg) equal to 0.83 mg/kg, four experimental groups were used, three of them containing the following nandrolone decanoate concentrations: 4.5mg/kg (~ 5xTD), 22.5mg/kg (~ 25xTD) and 45mg/kg (~ 50xTD); and a control group without the drug. Each treatment was replicated six times; three replicas were used for weight recording and determination of the larval instar, and the other replicas were maintained to determine developmental and emergence rates.

For each treatment, individual weights for ten randomly chosen larvae were recorded at 12h-intervals using an analytical balance (Scientech™ AS 210), until pupation. The larval samples used for weight recording were cleaned with distilled water and dried with filter paper to remove diet residues. For instar determination, the number of stigmatic clefts in the posterior spiracle was determined with a stereomicroscope (ZEISS™ Stemi SV 11). Due to the small weight at the beginning of the development, larvae were weighed in groups of ten. In this case, the experiments were done in three replicas. After hour 24, the weight was individually recorded, as described above. For each measurement, the immatures were taken from different vials and discarded after the measurement was taken. When larvae reached the post feeding stage, they were transferred to another vial containing sawdust for pupariation. The emerged adults and the puparia were counted to determine the rates previously mentioned.

Two-way analyses of variance (ANOVA) were performed to compare the effect of the treatments and fly species on mean larval development, and to compare the effect of the treatments and fly species at each age. For each test, weight was used as response variable. A series of one-way ANOVAs were also used to test the effect of the treatments on the mean weight of each species at each age. The “a posteriori” Duncan multiple comparisons test was used to compare the means. All tests were done with a 5% global level of significance. The PROC GLM procedure of the statistical package SAS™ (Statistical Analysis System) (SAS Institute 2006) was used for the analyses.

## Results

There was no relationship between drug concentration and total mean larval weight for *Chrysomya megacephala* ( $F=0.06$ ;  $p=0.9797$ ) (Fig. 5). A few peaks were observed at different ages for the mean larval weight (Table 1). At 24h ( $F=38.62$ ;  $p<0.0001$ ), the immatures from the control group presented a lower mass gain than in the groups exposed to the drugs. At 84h

( $F=3.42$ ;  $p=0.0274$ ), the 25 x TD showed a higher mass gain compared to the other groups. The pupal stage was reached at the same time for all groups. The same was observed for the periods of instar change. The emergence intervals, emergence rates and larval viabilities were the same for all groups (Table 2).

Although the different concentrations of nandrolone decanoate had no effect on the rate of weight gain in *Chrysomya albiceps* immatures ( $F=1.81$ ;  $p=0.1436$ ) the Duncan multiple comparisons test showed that the mean weight at 25 x TD was significantly smaller than that of the control group. The total larval development times were not significantly different among the groups. The control and drug added groups had the instar change at the same time (Fig. 6). The larval mean weights were significantly different at most ages, except at 24h ( $F=0.76$ ;  $p=0.5460$ ), 36h ( $F=2.63$ ;  $p=0.0647$ ), 144h ( $F=1.12$ ;  $p=0.3550$ ), 156h ( $F=1.40$ ;  $p=0.2595$ ) and 180h ( $F=1.38$ ;  $p=0.2659$ ) (Table 3). The emergence interval was similar for all groups as well. The larval viability was higher for the control group than for the AAS groups. For the 5 x TD group this index was lower. In the same way, the emergence rate was slightly lower for 5 x TD than those for the other groups, where this rate was similar (Table 4).

The total rate of weight gain for *C. putoria* was not affected by the presence or the drug concentration ( $F=0.10$ ;  $p=0.9615$ ). The instar changes occurred at the same time for immatures of all groups (Fig. 7). However, some weight variation among the groups was observed along the curves of weight gain. ANOVA and Duncan tests showed differences at 12h ( $F=35.12$ ;  $p<0.0001$ ), 24h ( $F=10.99$ ;  $p<0.0001$ ), 36h ( $F=5.21$ ;  $p=0.0043$ ), 48h ( $F=36.02$ ;  $p<0.0001$ ), 120h ( $F=5.36$ ;  $p=0.0037$ ) and 132h ( $F=4.09$ ;  $p=0.0135$ ) (Table 5). The larval viability was similar between control group and the higher concentration group (50 x TD), being slightly higher in the groups treated with intermediate concentrations of the AAS (5 x TD and 25 xTD, in an increasing pattern). The emergence rate was similar among control, 5 x TD and 25 x TD groups, being lower for the higher concentration group (50 x TD) (Table 6).

## Discussion

There are few papers dealing with the effects of hormones in the developmental rate of flies. Among these, Musvasva et al. (2001) investigated the influence of hydrocortisone, an steroid commonly used as anti-inflammatory drug, in the development of the flesh fly *Sarcophaga (Curranella) tibialis* (Diptera: Sarcophagidae). Even though the time of larval

development was accelerated and the pupariation time was delayed, a relationship between the concentration of this drug and the development time of immatures of this sarcophagid fly could not be assessed. The rate of mortality, although apparently high, was not statistically significant. Moreover, morphological changes in pupae and adults were not recorded by the authors, similarly to what happened in the present study.

Another study verified the action of testosterone of veterinarian use in the development of the blow fly *Chrysomya albiceps* (Ferrari et al. 2008). For this drug, differently from what was verified for nandrolone decanoate, a bigger weight gain for maggots exposed to AAS was observed, despite the absence of differences on the developmental time compared to the drug-free group.

Da Silva and Villet (2006) evaluated the action of progesterone, a steroid obtained from two contraceptives for human use, on the developmental rate of *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann). A trend towards higher mortality rates in third-instar larvae was observed but it was considered a consequence of breeding substrate decaying. The indication of a slight accelerated development observed in second-instar larvae feeding on the progesterone was not significative.

The lack of significant effect of AAS added to the artificial diet offered to *Chrysomya* species could be due to a lack or deficiency of assimilation of these compounds by the maggots. That is because vertebrate hormones, like their synthetics, are apolar and therefore present low solubility in water, while insect hormones, also derived from the precursor steroid molecule, are hydrophilic (Klowden 2002). This difference of solubility could have interfered with the absorption of the nandrolone decanoate and its metabolites, because flies may lack effective apolar carriers to allow the metabolism of the compound evaluated to occur.

Because of the anabolic characteristic of nandrolone decanoate, like for other AAS (Oga 1996), a larval weight gain was expected to occur. However, for *C. albiceps* the increase of drug concentration caused a proportional decrease in weight gain (Table 3). For *C. putoria* an apparent paradox effect was noticed. Initially, a higher weight gain was observed for higher AAS concentrations. However, after 72h the specimens reared at 50 x TD showed a lower weight gain compared to the control group, that had a larger weight than that of the other treatments, even though the values were closer to those of 5 x TD and 25 x TD.

In specific ages, the significant differences in weight gain, as shown by ANOVA and Duncan multiple comparisons tests, could produce an error in the PMI estimate. This fact is also evident for *C. putoria* at 48 h, time in which the weight recorded for the control group was significantly smaller than that recorded for the individuals exposed to all decanoate nandrolone concentrations. In this case, the differences in weight can indicate a development approximately six hours faster in the development of immatures exposed to the drug.

*Chrysomya albiceps* is more frequently found in decaying carcasses (Souza and Linhares 1997, Carvalho and Linhares 2001, Carvalho et al. 2001, Carvalho et al. 2004, Moretti et al. 2008), and, for this reason, it is one of the most Forensically important necrophagous insects in Brazil. Even though nandrolone decanoate had no effect on the rate of weight gain in immatures ( $F=1.81$ ;  $p=0.1436$ ), the highest concentration of this AAS used in the experiments affected negatively the weight gain through time (Table 3). If developing larvae present in a carrion are taken for PMI estimates and weight is used as parameter, the PMI could be underestimated because of the smaller weight observed in these conditions compared to mass gain of the other groups.

Cyclopentanoperhydrophenanthrene, the precursor molecule of insect steroid hormones, such as ecdysteroids (basically related to moulting (ecdysone), but also associated with events in other developmental stages), is obtained exclusively from feeding (Klowden 2002). In this regard, another hypothesis to explain why significant effects of nandrolone decanoate on the development rates of these flies were not observed, is that the AEE metabolized during the feeding period of the immatures was broken down and the recovered cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus may have been incorporated to the metabolism of the fly own hormones, and therefore not affecting its feeding physiology and metabolism.

In addition, maggots are able to accumulate and also to eliminate several compounds that can be obtained from feeding (Nuorteva and Nuorteva 1982, Sohal and Lamb 1977, 1979). This ability may determine whether the development, either during larval or pupal development, will be affected. In this case, higher levels of steroid elimination, compared to the accumulation levels, may have occurred. Because of that, the small variations observed in the rates of development, survivorship and emergence were not significant. However, this assumption is merely speculative, because the experimental model was not designed to test this hypothesis.

Furthermore, this ability depends on individual physiology and on developmental stages of each species.

The predatory behavior of some blowfly larvae, such as *C. albiceps*, is common when food source is insufficient or when the abundance of predators and preys in the decomposing substrate is very high. This behavior may be influenced by many factors, such as prey vulnerability due to the reduction of larval agility, palatability and action of pheromones (Faria et al. 2004). Therefore, another aspect that should be investigated is whether the presence of drugs, such as the AEE tested in the present study, may influence these parameters, making the species which had contact with this type of compound more vulnerable to predation, therefore changing significantly the process of decomposition.

More evidence to corroborate or even to confront the results of the present study is needed through further experiments, using higher concentrations of nandrolone decanoate, in order to enhance the possible effects of this compound on the development of *C. megacephala*, *C. albiceps* and *C. putoria*.

## Acknowledgments

The observations reported here are part of a Thematic Project named “Forensic Entomology: the utilization of Arthropods for determining time, place, cause, and circumstances of death” supported by FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation), grant no. 04/08544-0. CMS had also been supported by a scholarship from CAPES. The authors also thank TC Moretti for their suggestions and corrections in writing of this manuscript.

## References Cited

- Bourel B., G. Tournel, V. Hédouin, M. Deveaux, M.L. Goff and D. Gosset. 2001. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. *Forensic Sci. Inter.* 120: 127-131.
- Bourel B., V. Hédouin, L. Martin-Bouyer, A. Bécart, G. Tournel, M. Deveaux and D. Gosset. 1999. Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J. Forensic Sci.* 44 (2): 354-358.
- Byrd J.H. and J.L. Castner. 2001. Insects of forensic importance. pp. 43-79. In: Byrd J.H. and J.L. Castner. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. CRC Press. Florida, USA.
- Carvalho L.M.L., A.X. Linhares and J.R. Trigo. 2001. Determination of drug levels and the effect

- of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. *Forensic Sci. Inter.* 120: 140-144.
- Carvalho L.M.L. and A.X. Linhares. 2001. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. *J. Forensic Sci.* 46(3): 604-608.
- Carvalho L.M.L., P.J. Thyssen, M.L. Goff and A.X. Linhares. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. *Aggrawal's Int. J. For. Med. Toxicol.* 5: 33-39.
- Carvalho L.M.L., P.J. Thyssen, A.X. Linhares and F.A.B. Palhares. 2000. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 135-138.
- Catts E.P. 1990. Analysing entomological data. pp. 124-137. In: Catts E.P. and N.H. Haskell. *Entomology and death: a procedural guide.* Joyce's Print Shop. Clemson, USA.
- Catts E.P. and M.L. Goff. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Ann. Rev. Entomol.* 37: 253-272.
- Conceição C.A., F.S. Wander, L.P. Massili, L.A.F. Vianna, D.M. Gonçalves, and G. Fossati. 1999. Uso de anabolizantes entre praticantes de musculação em academias. *Rev. Pesq. Méd.* 33: 103-16.
- Cunha T.S., N.S. Cunha, M.J.C.S. Moura and F.K. Marcondes. 2004. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac.* 40(2): 165-179.
- Da Silva C. and M.H. Villet. 2006. Effects of prophylactic progesterone in decomposing tissues on the development of *Chrysomya chloropyga* (Wiedeman) (Diptera: Calliphoridae). *African Entomol.* 14(1): 199-202.
- Estrada D.A., M.D. Grella, P.J. Thyssen and A.X. Linhares. 2009. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. *Neotr. Entomol.* 38(2): 203-207.
- Faria L.D.B., W.A.C. Godoy and S.F. Reis. 2004. Larval predation on different instars in blowfly populations. *Brazil. Arch. Biol. Technol.* 47(6): 887-894.
- Ferrari A.C., A.T.C. Soares, M.A. Guimarães and P.J. Thyssen. 2008. Efeito da testosterona no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Medicina (Ribeirão Preto)* 41(1): 30-34.
- Frizon F., S.M.D. Macedo and M. Yonamine, M. 2005. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Funso/RS. *Rev. Ciênc. Farmac. Bas. Apl.* 26(3): 227-232.
- Goff M.L., A.I. Omori and J.R. Goodbrod. 1989. Effect of cocaine in tissues on the development



- rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). *J. Med. Entomol.* 26(2): 91-93.
- Goff M.L., W.A. Brown, K.A. Hewadikaram and A.I. Omori. 1991. Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation do postmortem intervals using arthropod development patterns. *J. Forensic Sci.* 36(2): 537-542.
- Greenberg B. and J.C. Kunich. 2002. *Entomology and the law: flies as forensic indicators.* Cambridge, New York, USA.
- Guimarães J.H., A.P. Prado and A.X. Linhares. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 22: 53-60.
- Guimarães-Neto W.M. 2005. *Musculação – Anabolismo Total: treinamento, nutrição, esteróides anabólicos, outros ergogênicos.* 7 ed. Phorte, São Paulo, BR.
- Guyton A.C. and J.E. Hall. 2002. Funções reprodutivas e hormonais no homem. pp.774-785. In: Guyton A.C. and J.E. Hall. *Tratado de fisiologia médica.* 10ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil.
- Introna F., C.P. Campobasso and A. Difazio. 1998. Three case studies in forensic entomology from Southern Italy. *J. Forensic Sci.* 43: 210-214.
- Iriart J.A.B., J.C. Chaves and R.G. Orleans. 2009. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. *Cad. Saúde Púb.* 25(4): 773-782.
- Klowden M.J. 2002. *Physiological systems in insects.* Academic Press, London.
- Lise M.L.Z., T.S. Gama e Silva, M. Ferigolo and H.M.T. Barros. 1999. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo, *Rev. Assoc. Méd. Bras.* 45(4): 364-370.
- Marchiori C.H., C.G. Silva, E.R. Caldas, C.I.S. Vieira, K.G.S. Almeida, F.F. Teixeira and A.X. Linhares. 2000. Artrópodes associados com carcaça de suíno em Itumbiara, sul de Goiás. *Arq. Inst. Biol.* 67(2): 167-170.
- Moretti T.C., O.B. Ribeiro, P.J. Thyssen, and D.R. Solis. 2008. Insects on decomposing carcasses of small rodents in a secondary forest in southeastern Brazil. *Eur. J. Entomol.* 105: 691-696.
- Musvasva E., K.A. Williams, W.J. Muller and M.H. Villet. 2001. Preliminary observations on the effects of hydrocortisone and sodium methohexital on development of *Sarcophaga (Curranella) tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae), and implications for estimating post mortem interval. *Forensic Sci. Intern.* 120: 37-41.
- Nuorteva P. and S.L. Nuorteva. 1982. The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. *Ambio* 11(1): 34-37.
- Nuorteva, P. 1977. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. pp. 1072-1095. In: C.G. Tedeschi, W.G. Eckert, L.G. Tedeschi (eds.). *Forensic medicine: a study in trauma and*

- environmental hazards, vol. II. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Oga S. 1996. Fundamentos de toxicologia. Atheneu, São Paulo, BR.
- Oliveira H.G., G. Gomes, J.J. Morlin-Jr, C.J.V. Zuben and A.X. Linhares. 2009. The effect of Buscopan® on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). J. Forensic Sci. 54(1): 202-206.
- (SAS) Statistical Analysis System Institute Inc. 2006. SAS user's guide: statistics. SAS, 6th ed., Cary, USA.
- Silva L.S.M.F. and R.L.M. Moreau. 2003. Uso de esteróides anabólico androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. Rev. Bras. Ciênc. Farmac. 39(3): 327-333.
- Silva P.R.P., L.C. Machado-Jr, V.C. Figueiredo, A.P. Cioffi, M.C. Prestes and M.A. Czepielewski. 2007. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de musculação de Porto Alegre. Arq. Bras. Endoc. Metabol. 51(1): 104-110.
- Smith K.G.V. 1986. A manual of Forensic Entomology. Cornell Univ. Press, New York, USA.
- Sohal R.S. and R.E. Lamb. 1977. Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*. J. Insect Physiol. 23: 1349-1354.
- Sohal R.S. and R.E. Lamb. 1979. Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. J. Insect Physiol. 25: 119-124.
- Souza A.M. and A.X. Linhares. 1997. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. Med. Vet. Entomol. 11: 8-12.

**Table 1. Mean weights (mg) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) over the development time (h) of *Chrysomya megacephala* immatures in different concentrations of nandrolone decanoate.**

| Age | Control                | 5 x TD                 | 25 x TD                | 50 x TD               |
|-----|------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| 12  | 0,79 $\pm$ 0,06 (a,b)  | 0,77 $\pm$ 0,07 (b)    | 0,90 $\pm$ 0,10 (a)    | 0,87 $\pm$ 0,02 (a b) |
| 24  | 3,34 $\pm$ 0,50 (c)    | 5,19 $\pm$ 0,53 (b)    | 5,09 $\pm$ 0,73 (b)    | 5,96 $\pm$ 0,45 (a)   |
| 36  | 7,94 $\pm$ 1,17 (a)    | 8,86 $\pm$ 1,44 (a)    | 7,90 $\pm$ 1,30 (a)    | 7,95 $\pm$ 0,90 (a)   |
| 48  | 23,82 $\pm$ 3,45 (a)   | 23,06 $\pm$ 2,82 (a,b) | 21,54 $\pm$ 2,21 (a,b) | 20,45 $\pm$ 4,29 (b)  |
| 60  | 35,44 $\pm$ 3,74 (a)   | 34,53 $\pm$ 3,77 (a)   | 34,70 $\pm$ 5,28 (a)   | 35,28 $\pm$ 3,77 (a)  |
| 72  | 43,26 $\pm$ 6,23 (a)   | 41,80 $\pm$ 4,34 (a)   | 42,94 $\pm$ 7,04 (a)   | 44,31 $\pm$ 2,89 (a)  |
| 84  | 45,09 $\pm$ 3,81 (b)   | 44,75 $\pm$ 1,81 (b)   | 48,37 $\pm$ 2,59 (a)   | 45,56 $\pm$ 2,72 (b)  |
| 96  | 46,71 $\pm$ 4,29 (a)   | 45,84 $\pm$ 2,96 (a)   | 47,26 $\pm$ 2,98 (a)   | 46,11 $\pm$ 3,58 (a)  |
| 108 | 41,71 $\pm$ 3,93 (a)   | 40,59 $\pm$ 2,61 (a)   | 43,39 $\pm$ 2,02 (a)   | 42,44 $\pm$ 3,47 (a)  |
| 120 | 36,79 $\pm$ 2,54 (a,b) | 35,52 $\pm$ 2,52 (b)   | 38,36 $\pm$ 3,13 (a)   | 35,57 $\pm$ 1,95 (b)  |

For each row, means followed by at least one letter in common differ, according to Duncan multiple comparisons test.

**Table 2. Larval viability, emergency and emergency interval (h) rates of *Chrysomya megacephala* under different nandrolone decanoate concentrations (n=150) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).**

| Groups  | Larval viability | Emergency rate | Emergency interval (h) |
|---------|------------------|----------------|------------------------|
| Control | 133 (89%)        | 126 (84%)      | 102 $\pm$ 22,45        |
| 5 x TD  | 138 (92%)        | 128 (85%)      | 102 $\pm$ 22,45        |
| 25 x TD | 137 (91%)        | 127 (85%)      | 102 $\pm$ 22,45        |
| 50 x TD | 135 (90%)        | 128 (85%)      | 102 $\pm$ 22,45        |

**Table 3. Mean weights (mg) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) over the development time (h) of *Chrysomya albiceps* immatures in different concentrations of nandrolone decanoate.**

| Age | Control               | 5 x TD                | 25 x TD                | 50 x TD              |
|-----|-----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|
| 12  | 0,11 $\pm$ 0,01 (d)   | 0,22 $\pm$ 0,02 (c)   | 0,29 $\pm$ 0,01 (b)    | 0,34 $\pm$ 0,01 (a)  |
| 24  | 0,43 $\pm$ 0,03 (a)   | 0,45 $\pm$ 0,15 (a)   | 0,48 $\pm$ 0,14 (a)    | 0,36 $\pm$ 0,02 (a)  |
| 36  | 1,46 $\pm$ 0,24 (a,b) | 1,45 $\pm$ 0,33 (a,b) | 1,52 $\pm$ 0,42 (a)    | 1,17 $\pm$ 0,18 (b)  |
| 48  | 5,72 $\pm$ 0,41 (a)   | 6,13 $\pm$ 0,51 (a)   | 4,17 $\pm$ 0,78 (b)    | 4,17 $\pm$ 0,69 (b)  |
| 60  | 14,94 $\pm$ 3,00 (a)  | 12,43 $\pm$ 1,50 (b)  | 10,38 $\pm$ 1,61 (c)   | 11,84 $\pm$ 1,81 (c) |
| 72  | 28,80 $\pm$ 2,58 (b)  | 26,80 $\pm$ 2,91 (b)  | 33,70 $\pm$ 3,60 (a)   | 21,87 $\pm$ 3,25 (c) |
| 84  | 49,58 $\pm$ 5,29 (a)  | 44,44 $\pm$ 3,56 (b)  | 37,22 $\pm$ 4,46 (c)   | 33,23 $\pm$ 4,91 (c) |
| 96  | 62,25 $\pm$ 5,11 (a)  | 54,69 $\pm$ 6,44 (b)  | 49,52 $\pm$ 4,70 (c)   | 48,76 $\pm$ 4,84 (c) |
| 108 | 70,29 $\pm$ 6,47 (a)  | 65,05 $\pm$ 5,77 (a)  | 67,54 $\pm$ 6,22 (a)   | 56,75 $\pm$ 7,24 (b) |
| 120 | 79,28 $\pm$ 6,85 (a)  | 71,11 $\pm$ 6,31 (b)  | 71,14 $\pm$ 6,56 (b)   | 72,71 $\pm$ 4,25 (b) |
| 132 | 83,38 $\pm$ 6,07 (a)  | 76,23 $\pm$ 5,00 (b)  | 72,23 $\pm$ 6,97 (b,c) | 68,10 $\pm$ 9,18 (c) |
| 144 | 83,67 $\pm$ 7,48 (a)  | 78,46 $\pm$ 9,92 (a)  | 80,26 $\pm$ 11,33 (a)  | 75,93 $\pm$ 9,83 (a) |
| 156 | 71,16 $\pm$ 6,22 (a)  | 70,92 $\pm$ 7,10 (a)  | 71,37 $\pm$ 6,97 (a)   | 66,20 $\pm$ 6,22 (a) |
| 168 | 71,79 $\pm$ 9,24 (a)  | 66,36 $\pm$ 9,32 (a)  | 64,78 $\pm$ 9,51 (a,b) | 56,66 $\pm$ 8,07 (b) |
| 180 | 56,06 $\pm$ 4,97 (a)  | 53,53 $\pm$ 4,70 (a)  | 52,33 $\pm$ 4,55 (a)   | 51,67 $\pm$ 6,43 (a) |

For each row, means followed by at least one letter in common differ, according to Duncan multiple comparisons test.

**Table 4. Larval viability, emergency and emergency interval (h) rates of *Chrysomya albiceps* under different nandrolone decanoate concentrations (n=150) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).**

| Groups  | Larval viability | Emergency rate | Emergency interval (h) |
|---------|------------------|----------------|------------------------|
| Control | 139 (93%)        | 133 (89%)      | 132 $\pm$ 18,97        |
| 5 x TD  | 116 (77%)        | 115 (77%)      | 132 $\pm$ 18,97        |
| 25 x TD | 132 (88%)        | 128 (85%)      | 132 $\pm$ 18,97        |
| 50 x TD | 133 (89%)        | 126 (84%)      | 132 $\pm$ 18,97        |

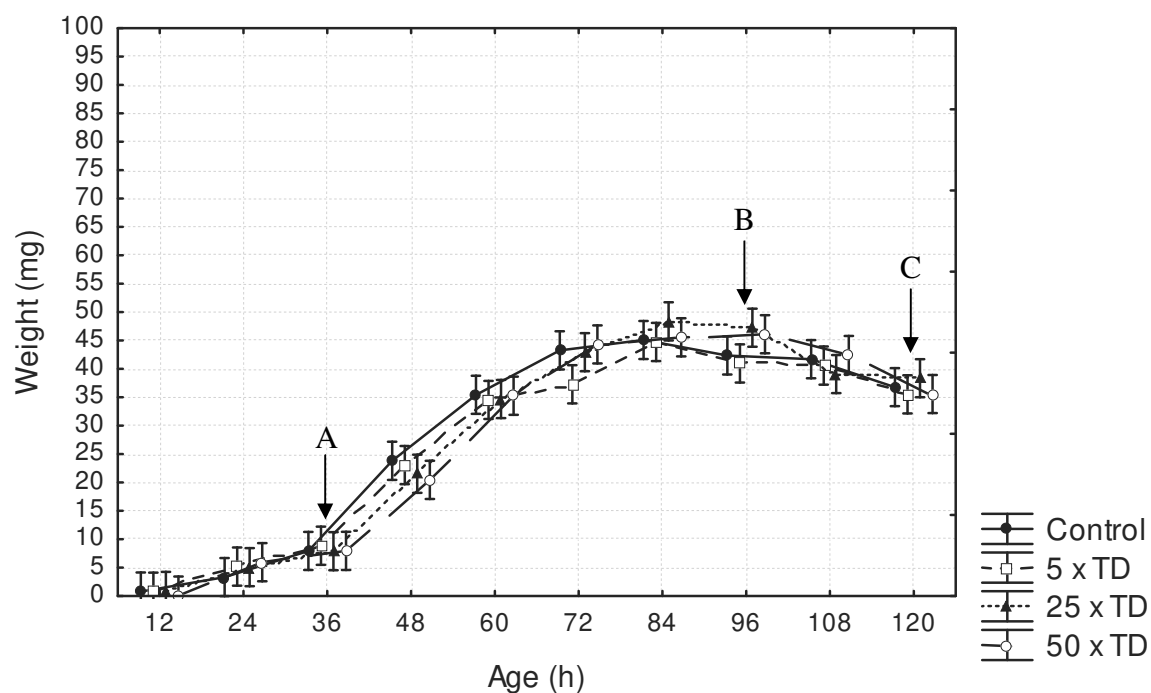
**Table 5. Mean weights (mg) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ) over the development time (h) of *Chrysomya putoria* immatures in different concentrations of nandrolone decanoate.**

| Age | Control              | 5 x TD                 | 25 x TD                | 50 x TD                |
|-----|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 12  | 0,36 $\pm$ 0,08 (b)  | 0,70 $\pm$ 0,03 (a)    | 0,64 $\pm$ 0,04 (a)    | 0,64 $\pm$ 0,02 (a)    |
| 24  | 2,15 $\pm$ 0,38 (a)  | 1,43 $\pm$ 0,31 (c)    | 1,76 $\pm$ 0,33 (b)    | 1,41 $\pm$ 0,30 (c)    |
| 36  | 5,53 $\pm$ 1,08 (a)  | 5,52 $\pm$ 0,95 (a)    | 4,47 $\pm$ 0,53 (b)    | 6,11 $\pm$ 1,11 (a)    |
| 48  | 10,38 $\pm$ 1,44 (c) | 16,55 $\pm$ 1,66 (b)   | 17,98 $\pm$ 2,08 (a,b) | 19,00 $\pm$ 2,72 (a)   |
| 60  | 32,95 $\pm$ 3,48 (a) | 33,03 $\pm$ 3,44 (a)   | 31,89 $\pm$ 2,75 (a)   | 33,13 $\pm$ 4,10 (b,a) |
| 72  | 40,51 $\pm$ 7,20 (a) | 40,71 $\pm$ 4,76 (a)   | 42,89 $\pm$ 4,61 (a)   | 42,35 $\pm$ 3,93 (a)   |
| 84  | 47,95 $\pm$ 2,47 (a) | 45,91 $\pm$ 6,61 (a)   | 47,83 $\pm$ 3,12 (a)   | 42,99 $\pm$ 5,29 (a)   |
| 96  | 46,74 $\pm$ 5,07 (a) | 47,99 $\pm$ 3,47 (a)   | 48,48 $\pm$ 2,37 (a)   | 46,89 $\pm$ 2,64 (a)   |
| 108 | 48,15 $\pm$ 3,84 (a) | 45,80 $\pm$ 6,41 (a)   | 48,71 $\pm$ 2,57 (a)   | 44,50 $\pm$ 3,48 (a)   |
| 120 | 48,79 $\pm$ 4,14 (a) | 45,33 $\pm$ 3,93 (a,b) | 48,71 $\pm$ 3,01 (a)   | 42,70 $\pm$ 4,78 (b)   |
| 132 | 29,78 $\pm$ 2,40 (b) | 34,24 $\pm$ 4,70 (a)   | 31,94 $\pm$ 1,81 (a,b) | 32,47 $\pm$ 1,85 (a,b) |

For each row, means followed by at least one letter in common differ, according to Duncan multiple comparisons test.

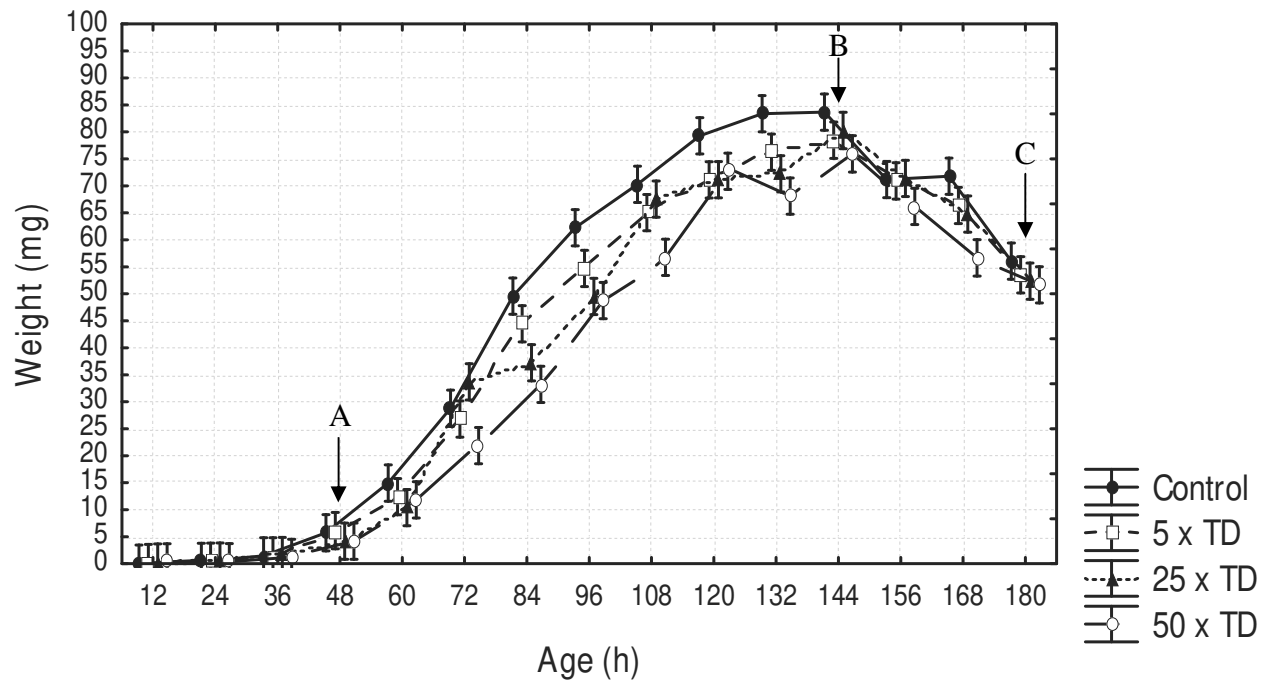
**Table 6. Larval viability, emergency rate and emergency interval (h) of *Chrysomya putoria* under different nandrolone decanoate concentrations (n=150) ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ).**

| Groups  | Larval viability | Emergency rate | Emergency interval (h) |
|---------|------------------|----------------|------------------------|
| Control | 114 (76%)        | 106 (71%)      | 126 $\pm$ 22,45        |
| 5 x TD  | 120 (80%)        | 115 (77%)      | 126 $\pm$ 22,45        |
| 25 x TD | 130 (87%)        | 126 (84%)      | 126 $\pm$ 22,45        |
| 50 x TD | 118 (79%)        | 90 (60%)       | 126 $\pm$ 22,45        |



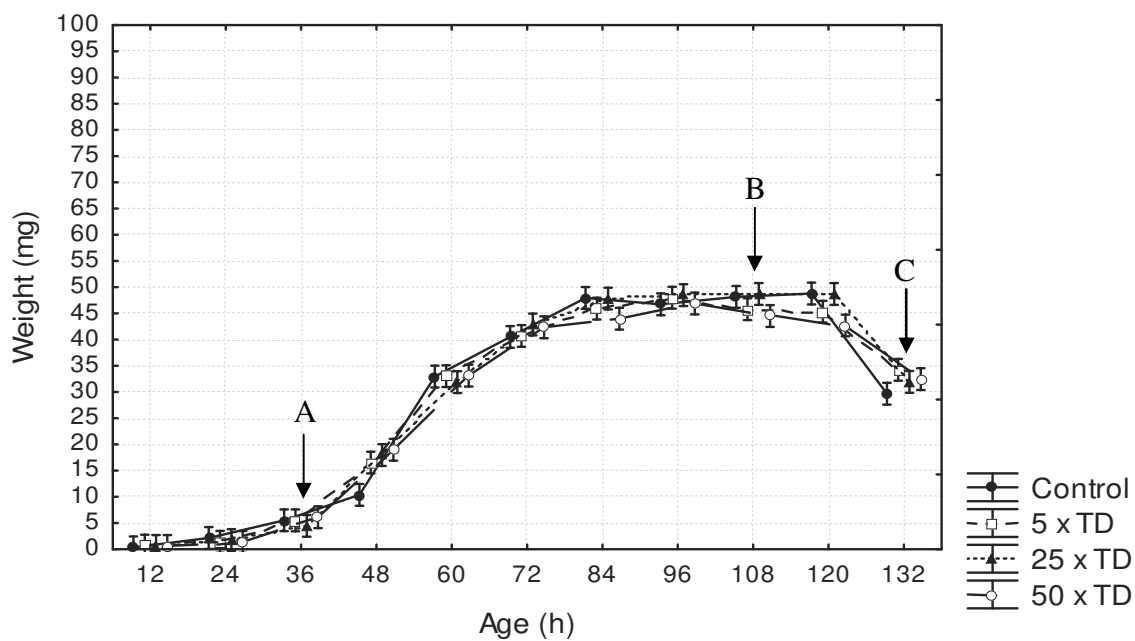
<sup>A</sup> Second larval instar end; <sup>B</sup> Third larval instar end (post-feeding larval stage); <sup>C</sup> Pupae stage

**Fig. 5. Development curves (h) of *Chrysomya megacephala* larvae reared in different concentrations of nandrolone decanoate, relative to the period from hatching until pupariation.**



<sup>A</sup> Second larval instar end; <sup>B</sup> Third larval instar end (post-feeding larval stage); <sup>C</sup> Pupae stage

**Fig. 6.** Curves of development (h) of *Chrysomya albiceps* larvae reared in different concentrations of nandrolone decanoate, relative to the period from hatching until pupariation.



<sup>A</sup> Second larval instar end; <sup>B</sup> Third larval instar end (post-feeding larval stage); <sup>C</sup> Pupae stage

**Fig. 7. Curves of development (h) of *Chrysomya putoria* larvae reared in different concentrations of nandrolone decanoate, relative to the period from hatching until pupariation.**



#### **4- CAPÍTULO II – O efeito do decanoato de nandrolona associado a ésteres de testosterona no desenvolvimento de duas espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) de importância forense**

C. M. Souza, P. J. Thyssen, A. X. Linhares

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil, 13083-970.

**Resumo:** Devido ao aumento no número de mortes relacionadas ao abuso de drogas, o conhecimento da interferência destas substâncias sobre o desenvolvimento de certas espécies de insetos necrófagos torna-se de grande importância, especialmente quando a estimativa do intervalo pós-morte (IPM) usa como base a idade do inseto. O presente estudo avaliou o efeito associado de Deca-Durabolin® (DE) e Durateston® (DU), esteróides anabólico-androgênicos comumente usados para aumento da massa muscular, na taxa de desenvolvimento de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) e *C. albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), moscas de interesse forense no Brasil. Imaturos obtidos de colônias de adultos estabelecidas em laboratório foram depositados em potes plásticos contendo dieta artificial para montagem dos grupos experimentais, sem (grupo controle) e com adição de esteróides associados, nas seguintes concentrações: 2,25 mg/kg DE + 3,57 mg/kg DU; 11,25 mg/kg DE + 35,7 mg/kg DU; 22,5 mg/kg DE + 357 mg/kg DU. Cada tratamento foi replicado seis vezes. O ganho de massa foi registrado para grupos de 10 larvas, em intervalos de 12 h, até que atingissem o estágio de pupa. ANOVA de um critério e teste de comparações múltiplas de Duncan foram realizados para comparar o efeito das drogas sobre o desenvolvimento larval de *C. putoria* e *C. albiceps*, usando o ganho de massa como variável resposta. Apesar da heterogeneidade das curvas de desenvolvimento, não houve alteração do tempo de desenvolvimento e do intervalo de emergência total de ambos califórídeos. No entanto, a viabilidade larval e a taxa de emergência de *C. putoria* foram significativamente afetadas nas maiores concentrações de drogas. A análise do ganho de massa, por hora, indicou diferenças significativas no período compreendido entre 36 e 84 h entre grupos controle e com adição de drogas, o que levaria a erro no cálculo do IPM, se esta condição não fosse considerada.

**Palavras-chave:** moscas-varejeiras, esteróides anabólico-androgênicos, intervalo pós-morte, entomotoxicologia

## Introdução

A fim de possibilitar o cálculo mais acurado da estimativa do intervalo pós-morte (IPM), a realização de estudos que forneçam informações sobre o levantamento de espécies associadas à matéria orgânica animal em decomposição, conhecimento taxonômico, biologia, ecologia, ação de drogas ou outras substâncias tóxicas no desenvolvimento da entomofauna necrófaga são de grande relevância para a formação de um extenso banco de dados que auxilie em investigações médico-criminais (PUJOL-LUZ, ARANTES, CONSTANTINO, 2008). Dessa forma, para a aplicação da Entomologia Forense em casos nos quais há a suspeita ou presença confirmada de substâncias tóxicas, a interferência deste composto no desenvolvimento dos insetos deve ser considerada para evitar possíveis erros na estimativa do tempo decorrido da morte (INTRONA, CAMPOBASSO, DIFAZIO, 1998; GREENBERG, KUNICH, 2002).

Assim, a Entomotoxicologia define-se como a ciência que aplica análises toxicológicas a insetos que se alimentam de tecidos em decomposição a fim de identificar qualitativa e, em alguns casos, quantitativamente, drogas e toxinas presentes neste substrato, além de estudar como estas substâncias podem influenciar o ciclo de desenvolvimento destes organismos ou alterar a atratividade destes pela carcaça/cadáver (BEYER, ENOS, STAJIC, 1980; INTRONA, CAMPOBASSO, GOFF, 2001). Além disso, a utilização da artropodofauna necrófaga mostra-se como uma alternativa em investigações criminais quando análises toxicológicas convencionais não podem ser realizadas devido a indisponibilização de amostras do próprio cadáver geradas pelo tempo decorrido do óbito ou pela causa da morte, e também porque amostras provenientes de tecidos vivos, como larvas coletadas no cadáver, são sempre mais indicadas a estas análises (BEYER, ENOS, SATJIC, 1980; KINTZ, TRACQUI, MANGIN, 1990; BYRD, CASTNER, 2001).

Dípteros da família Calliphoridae podem ser atraídos a grandes distâncias pelo odor da carcaça, chegando pouco tempo após a morte e, em alguns casos, permanecendo neste substrato durante todos os estágios de decomposição (CATTS, GOFF, 1992). Tal fato revela o importante papel desta família, justificando a utilização de algumas espécies como *Chrysomya* spp. em estudos de Entomologia Forense. Além disso, espécies como *C. albiceps* e *C. putoria* tem se mostrado de grande importância forense para o Brasil (MONTEIRO-FILHO, PENEREIRO,

1987; CARVALHO et al., 2000; CARVALHO et al., 2004; MORETTI et al., 2008; SOUZA, KIRST, KRÜGER, 2008).

O uso abusivo de drogas ilícitas, fármacos prescritos com restrição e outras substâncias tóxicas tem aumentado significativamente. As mortes associadas a este fator acompanham esse mesmo padrão de crescimento, gerando cada vez mais interesse em estudos entomotoxicológicos (INTRONA, CAMPOBASSO, GOFF, 2001; UNODC, 2007). Dentro desse contexto, os esteróides anabólicos-androgênicos (EAA) tem sido utilizados indiscriminadamente por indivíduos interessados em ganhos rápidos de massa corporal, aumento da força muscular e diminuição do tempo de recuperação entre exercícios físicos intensos. Contudo, efeitos colaterais indesejáveis como ginecomastia, alterações fisiológicas de alguns sistemas, dos caracteres sexuais secundários e até mesmo o óbito em casos de superdosagens podem ocorrer quando há administração sem prescrição e acompanhamento médico (LISE et al., 1999; SILVA, DANIELSKY, CZEPIELEWSKI, 2002).

Os EAA de uso abusivo mais freqüentes no Brasil são Deca-Durabolin<sup>®</sup> (decanoato de nandrolona), Durateston<sup>®</sup> (associação de quatro ésteres de testosterona), Winstrol<sup>®</sup> (estanozolol), Hemogenin<sup>®</sup> (oximetolona), Deposteron<sup>®</sup> (cipionato de testosterona), dentre outros, variando a freqüência de cada droga de acordo com o grupo de usuários considerado (CONCEIÇÃO et al., 1999; SILVA, MOREAU, 2003; FRIZON, MACEDO, YONAMINE, 2005; SILVA et al., 2007; IRIART, CHAVES, ORLEANS, 2009).

Com base nessas informações, o objetivo deste estudo foi avaliar a taxa de desenvolvimento e viabilidade de imaturos de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) expostos à presença associada de Deca-Durabolin<sup>®</sup> (DE) e Durateston<sup>®</sup> (DU), adicionados em dieta artificial, oferecida como fonte exclusiva de alimentação das larvas.

## **Material e Métodos**

As espécies utilizadas neste estudo foram *Chrysomya putoria* (Wiedemann) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). As coletas de espécimes adultos para montagem de colônias em laboratório foram realizadas na região urbana no município de Campinas, SP. Foram utilizadas como iscas fígado bovino, víscera de frango e/ou peixe expostas em armadilhas

apropriadas, seguindo a metodologia proposta por Ferreira (1978). As armadilhas permaneceram suspensas por 24 horas e, após esse período, foram retiradas e os insetos capturados, levados ao Laboratório de Entomologia do Departamento de Biologia Animal (Parasitologia), no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) para proceder à triagem. Esses espécimes foram anestesiados mediante exposição à baixa temperatura ( $-20^{\circ}\text{C}$  / 3 minutos) e para identificação utilizou-se a chave taxonômica de Carvalho e Ribeiro (2000). Os exemplares de interesse foram colocados em gaiolas para estabelecimento de colônias, mantidas em sala climatizada, com temperatura ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), fotoperíodo (12-12 horas) e umidade relativa ( $70\pm 10\%$ ) controlados, para posterior obtenção de imaturos a serem utilizados nos testes.

A ovipostura foi estimulada por meio da oferta de carne bovina moída crua. Após a postura dos ovos, aguardou-se a eclosão das larvas que foram contadas e retiradas com o uso de pincel fino e depositadas em frascos plásticos apropriados, cobertos com organza, contendo dieta artificial preparada de acordo com Estrada e colaboradores (2009), acrescida dos EAA. Esses frascos foram mantidos em câmaras climáticas (Fanem<sup>®</sup> modelo 387), com as mesmas condições controladas de temperatura, fotoperíodo e umidade relativa citada para os adultos, onde todas as etapas vitais foram acompanhadas.

A montagem do experimento foi realizada da mesma forma para as duas espécies de mosca, com a confecção de quatro grupos, sendo um controle, sem a adição dos EAA, e os outros três com as concentrações dos EAA indicadas a seguir. Os fármacos foram obtidos na forma líquida, em solução oleosa, ambos fabricados pela Organon do Brasil, comercializados sob os nomes Deca-Durabolin<sup>®</sup> (decanoato de nandrolona - DE) e Durateston<sup>®</sup> (combinação de quatro ésteres de testosterona - propionato, fenilpropionato, isocaproato e decanoato - DU). Considerou-se a dose terapêutica (DT) indicada para adultos para o DE igual a 0,83 mg/kg e para o DU igual a 3,57 mg/kg. A associação destes compostos foi feita nas seguintes proporções, respectivamente: grupo I, 2,25 mg/kg ( $\sim 2,5 \times \text{DT}$ ) e 3,57 mg/kg ( $1 \times \text{DT}$ ); grupo II, 11,25 mg/kg ( $\sim 12,5 \times \text{DT}$ ) e 35,7 mg/kg ( $10 \times \text{DT}$ ); grupo III, 22,5 mg/kg ( $\sim 25 \times \text{DT}$ ) e 357 mg/kg ( $100 \times \text{DT}$ ).

Foram feitas seis repetições para cada grupo experimental. Em cada uma foram colocadas 150 larvas. Três repetições de cada grupo foram manipuladas, permitindo a retirada de exemplares com os quais se procederam a aferição do ganho de massa e a observação do estágio larval. Os demais grupos não foram manipulados, sendo, posteriormente, usados para calcular a sobrevivência, viabilidades larval e das pupas, e intervalo de emergência.

O registro do ganho de massa dos imaturos foi realizado por meio de uma balança analítica (Scientech® AS 210). Antes da aferição, os espécimes foram limpos com água destilada e secos em papel filtro, a fim de retirar os resíduos da dieta para que desta forma os dados obtidos indicassem a massa real dos imaturos. Para a determinação do estágio larval (1°, 2° ou 3°) dos indivíduos de cada grupo, a quantidade de fendas estigmáticas no espiráculo posterior das amostras retiradas foi observada com o auxílio de um estereomicroscópio (ZEISS® Stemi SV 11).

Esses procedimentos foram realizados em intervalos de 12 horas até a formação de pupas. Para isto, foram escolhidas aleatoriamente 10 larvas de uma das réplicas manipuláveis. Devido à massa de cada larva ser reduzida nos primeiros intervalos de observação, a aferição foi realizada para grupos de cada tratamento (três grupos de 10 larvas cada, retiradas dos potes manipuláveis). Posteriormente, a aferição da massa passou a ser individual dentro de um grupo de 10 larvas. Os espécimes utilizados neste procedimento foram descartados. Ao se observar a estabilização do ganho de massa dos imaturos, considerados a partir de então “pré-pupas”, realizou-se a transferência destes da dieta para serragem, a fim de que o desenvolvimento fosse concluído, com a formação de pupas e posterior emergência dos adultos. Após a morte dos adultos emergidos nos grupos não manipuláveis, foram calculados e analisados o tempo total de desenvolvimento, a viabilidade larval, o intervalo de emergência do adulto (em horas) e a viabilidade das pupas.

Análise de variância (ANOVA) de um critério foi realizada para comparar o efeito dos tratamentos no desenvolvimento larval, usando o ganho de massa como resposta. O teste de comparações múltiplas de Duncan foi realizado posteriormente para comparar os dados e identificar os grupos não semelhantes. O nível global de significância considerado para os testes estatísticos foi de 5% ( $p < 0,05$ ), usando o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS® (Statistical Analysis System) (SAS Institute 2006).

## **Resultados**

Apesar de terem sido geradas curvas de desenvolvimento muito heterogêneas para os grupos testados, não houve alteração estatisticamente significativa no padrão de desenvolvimento de *C. albiceps*, frente à presença de diferentes concentrações da associação entre DE e DU ( $F = 0,55$ ;  $p=0,6468$ ). O tempo total de desenvolvimento, assim como a mudança de estágio larval ocorreu ao mesmo tempo para os grupos acrescidos da droga e o controle (Fig. 8). Em idades

específicas foram observadas diferenças significativas no ganho de massa para os diferentes grupos (Tab. 7).

O intervalo de emergência foi idêntico para todos os tratamentos. Embora não significativas ( $F = 0,7246$ ;  $p = 0,5491$ ), a viabilidade larval e a emergência seguiram o mesmo padrão, mais elevadas para o grupo exposto a maior concentração dos EAA e, em escala decrescente, para as larvas submetidas às menores concentrações e o controle (Tab. 8).

*Chrysomya putoria* não sofreu influência significativa no desenvolvimento quando submetida ao DE associado a DU ( $F = 0,68$ ;  $p = 0,5640$ ), mesmo gerando curvas de desenvolvimento também heterogêneas (Fig. 9). Apesar disso, exceto para a idade de 96h ( $F = 1,94$ ;  $p = 0,1409$ ) e 108h ( $F = 0,41$ ;  $p = 0,7438$ ), foram observadas diferenças significativas no ganho de massa dos imaturos perante as diferentes concentrações da associação entre DE e DU e o controle (Tab. 9). Foi registrada uma maior mortalidade, tanto para larvas quanto para pupas ( $F = 5,830$ ;  $p = 0,0050$ ), conforme o aumento da concentração de EAA (Tab. 10), principalmente para a maior concentração testada.

## Discussão

A literatura vinculada a Entomotoxicologia referente a trabalhos que enfocam o estudo de esteróides anabólico-androgênicos é restrita. Foram avaliados três fármacos pertencentes a esta classe: a hidro cortisona (MUSVASVA et al., 2001), a progesterona (DA SILVA, VILLET, 2006) e a testosterona de uso veterinário (FERRARI et al., 2008). A testosterona de uso humano também foi avaliada por nosso grupo de pesquisa (comunicação pessoal<sup>2</sup>). Exceto para a hidro cortisona, que foi verificada para o sarcófago *Sarcophaga (Carraneia) tibialis*, os demais EAA foram avaliados para espécies do gênero *Chrysomya*.

Assim como os resultados obtidos para *C. albiceps* perante a exposição dos imaturos à dieta acrescida da associação de DE e DU, Ferrari e colaboradores (2008) também não encontraram diferença no tempo de desenvolvimento dos imaturos de *C. albiceps* expostos à testosterona de uso veterinário (Androgenol<sup>®</sup>, Hertape, Brasil), considerando a variação de

---

<sup>2</sup> FORNARI, A.R.S.; THYSSEN, P.J.; LINHARES, A.X. O efeito de testosterona adicionada ao substrato alimentar na taxa de desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), moscas de importância forense. (Projeto financiado pela FAPESP, processo nº 07/55337-9)

concentração e o grupo mantido sem a presença deste composto. Apesar disso, o tamanho das larvas expostas ao Androgenol<sup>®</sup> apresentaram cerca de cinco vezes mais o valor da massa corpórea observada para os imaturos do grupo controle. Tal observação pode ter sido decorrente da administração prévia do Androgenol<sup>®</sup> em coelhos, cujos tecidos foram oferecidos à criação das larvas. Isto pode ter permitido que o composto fosse previamente metabolizado e então influenciasse significativamente o ganho de massa, explicando a ausência deste resultado em nosso estudo. Além disso, para a maior concentração da associação de DE e DU foi verificado um ganho de massa inferior se comparado aos demais grupos.

Os resultados apresentados por *C. albiceps* e *C. putoria* para a ação da testosterona de uso humano (comunicação pessoal <sup>2</sup>) assemelham-se aos obtidos para a associação do DE e DU para estas mesmas espécies. Em ambos os casos, a ausência de interferência da droga no desenvolvimento das espécies avaliadas foi constatada. Da mesma forma, apesar de ter sido analisada outra espécie do mesmo gênero, Da Silva e Villet (2006) também verificaram não haver interferência de diferentes concentrações de progesterona no desenvolvimento da espécie *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann).

Para a hidrocortisona, um esteróide utilizado comumente no tratamento de quadros inflamatórios, apesar de ter sido observado que o tempo de desenvolvimento larval foi acelerado e o tempo de pupariação foi atrasado, não foi encontrada relação entre a concentração dessa droga e o tempo de desenvolvimento de imaturos de *Sarcophaga (Curranella) tibialis* (Macquart) (Diptera: Sarcophagidae). Além disso, alterações morfológicas nas pupas e adultos não foram visualizadas (MUSVASVA et al., 2001).

Ao contrário do padrão de diferença significativo encontrado para a alta taxa de mortalidade observada para *C. albiceps* e *C. putoria* frente aos EAA avaliados, este mesmo comportamento observado para *S. tibialis* frente à hidrocortisona (MUSVASVA et al., 2001) e para *C. chloropyga* frente à progesterona (DA SILVA, VILLET, 2006), não foi estatisticamente significativo em ambos os casos.

Embora as concentrações testadas provenientes da associação entre DECAN e TEST não tenham apresentado efeito significativo no ganho de massa dos imaturos de *C. albiceps* e *C. putoria*, foram constatadas diferenças significativas em idades específicas indicadas, pelos testes ANOVA e DUNCAN (Tabelas 7 e 9). A maior concentração (grupo III), em ambas as espécies, porém mais evidente para *C. putoria*, afetou negativamente o ganho de massa das larvas. Neste

caso, se larvas em desenvolvimento, expostas a tecidos com a presença desses fármacos em concentrações similares, forem utilizadas para a estimativa do IPM, usando o ganho de massa como parâmetro, erros de subestimativa podem ser gerados.

Os hormônios de vertebrados, assim como seus sintéticos, são apolares, isto é, apresentam baixa solubilidade em água, sendo que os hormônios do inseto também derivados da molécula ciclopentanoperhidrofenantreno, são hidrofílicos (KLOWDEN, 2002). Esta diferença de solubilidade pode ter comprometido a absorção do DE associado ao DU, assim como dos metabólitos produzido pela quebra dessas substâncias. Pode ser que moléculas carreadores efetivas para estes compostos não existam nas moscas ou estejam atuando em outras vias fisiológica do inseto. Dessa forma, a inexistência de influência significativa dos EAA testados para *C. putoria* e *C. albiceps*, tomando-se o ganho de massa como parâmetro de avaliação, pode ser decorrente da inexistência ou baixa assimilação dessas drogas.

Pode ter ocorrido também quebra das moléculas constitutivas dos hormônios adicionados à dieta de criação dos imaturos, e, em seguida, recuperação do ciclopentanoperhidrofenantreno, impedindo que os EAA consumidos durante o processo alimentar fossem bioacumulados pelas larvas, causando alterações significativas. O ciclopentanoperhidrofenantreno é o principal composto formador dos hormônios esteróides, tanto de insetos quanto de vertebrados, e no primeiro caso é obtido exclusivamente por meio da alimentação. Essa molécula é precursora do ecdisteróide (ecdisona), hormônio encontrado nos insetos que está primariamente envolvido no processo de muda, mas pode desencadear efeitos também em outros estágios de desenvolvimento (KLOWDEN 2002). Assim, as moléculas de ciclopentanoperhidrofenantreno que porventura tenham sido obtidas podem ter sido utilizadas no anabolismo do ecdisteróide ou outros hormônios dos dípteros utilizados no experimento.

As diferenças observadas no ganho de massa em idades específicas podem ter ocorrido também devido ao alto nível de eliminação do DE associado ao DU oferecido às larvas. Isto porque, já foi comprovado que os insetos são capazes de bioacumular e eliminar vários compostos e, em consequência desse fato serem afetados ou não pela presença ou passagem desses compostos por seus organismos (NUORTEVA, NUORTEVA 1982; SOHAL, LAMB, 1977; 1979). Contudo, análises mais aprofundadas, inclusive histológicas, devem ser realizadas para elucidar esta hipótese.



Outro ponto que deve ser mais explorado é se compostos como os EAA podem afetar o comportamento de predação realizado por larvas de dípteros, tornando as larvas mais vulneráveis, implicando em alteração significativa do processo de decomposição. A predação exercida durante o estágio larval é freqüente para algumas espécies, como *C. albiceps*, em condições de escassez de recurso alimentar ou pelo elevado número de presas e predadores existentes no substrato em decomposição. Fatores, como vulnerabilidade das presas devido à diminuição da agilidade larval, palatabilidade e ação de feromônios, podem influenciar esse comportamento (FARIA et al. 2004).

Um maior aumento na concentração da associação dos EAA utilizados, ou ainda a incorporação de um outro hormônio para novas análises pode permitir que as diferenças no ganho de massa sejam mais pronunciadas, evidenciando os efeitos no desenvolvimento de *C. albiceps* e *C. putoria*. Até porque, uma das formas de utilização abusiva dos EAA, conhecida como “stacking”, consiste no uso concomitante e alternado de vários esteróides (SILVA, DANIELSKI, CZEPIELEWSKI, 2002; GUIMARÃES-NETO, 2005).

A ampliação do conhecimento sobre a ação de drogas e outras substâncias tóxicas no desenvolvimento e comportamento de espécies de importância forense é de grande relevância para a Entomologia Forense, pois estudos que enfoquem a obtenção de dados diversos sobre a entomofauna necrófaga são de grande importância para a formação de um extenso banco de dados que auxilie em investigações médico-criminais (PUJOL-LUZ, ARANTES, CONSTANTINO, 2008).

## **Agradecimentos**

Este trabalho foi parte integrante do Projeto Temático “Entomologia Forense: a utilização de artrópodes para determinar o tempo, lugar, causa e circunstâncias da morte”, financiado pela FAPESP, processo número 04/08544-0. A autora Carina M. Souza também obteve bolsa de estudos da CAPES.

## **Referências Citadas**

BEYER, J. C.; ENOS, W. F.; STAJIC, M. Identification through analysis of maggots. **Journal of Forensic Sciences**, n. 25, p. 411-412, 1980.

- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. **Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. 418p.
- CARVALHO, L. M. L.; THYSSEN, P. J.; GOFF, M. L.; LINHARES, A. X. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. **Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, n. 5, p. 33-39, 2004.
- CARVALHO, L. M. L.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X.; PALHARES, F. B. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 95, v. 1, p. 135-138, 2000.
- CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 253-272, 1992.
- CONCEIÇÃO, C. A.; WANDER, F. S.; MASSILI, L. P.; VIANNA, L. A. F.; GONÇALVES, D. M.; FOSSATI, G. Uso de anabolizantes entre praticantes de musculação em academias. **Revista Pesquisa Médica**, n. 33, p. 103-16, 1999.
- DA SILVA, C.; VILLET, M. H. Effects of prophylactic progesterone in decomposing tissues on the development of *Chrysomya chloropyga* (Wiedeman) (Diptera: Calliphoridae). **African Entomology**, v. 14, n. 1, p. 199-202, 2006.
- ESTRADA, D. A.; GRELLA, M. D.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 203-207, 2009.
- FARIA, L. D. B.; GODOY, W. A. C.; REIS, S. F. Larval predation on different instars in blowfly populations. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 887-894, 2004.
- FERRARI, A. C.; SOARES, A. T. C.; GUIMARÃES, M. A.; THYSSEN, P. J. Efeito da testosterona no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). **Medicina (Ribeirão Preto)**, n. 41, v. 1, p. 30-34, 2008.
- FERREIRA, M. J. M. Sinantropia de dípteros muscóideos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. **Revista Brasileira Biologia**, n. 38, p. 445-454, 1978.
- FRIZON, F.; MACEDO, S. M. D.; YONAMINE, M. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Funso/RS. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 227-232, 2005.
- GREENBERG, B.; KUNICH, J. C. **Entomology and the law: flies as forensic indicators**. New York: Cambridge University Press, 2002. 306p.
- GUIMARÃES-NETO, W. M. **Musculação – Anabolismo Total: treinamento, nutrição, esteróides anabólicos, outros ergogênicos**. Guarulhos: Phorte, 7 ed., 2005. 172p.

- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; DIFAZIO, A. Three case studies in forensic entomology from Southern Italy. **Journal of Forensic Sciences**, v. 43, p. 210-214, 1998.
- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L. Entomotoxicology, **Forensic Science International**, n. 120, p. 42-47, 2001.
- IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEANS, R. G. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 773-782, 2009.
- KINTZ, P.; TRACQUI, A.; MANGIN, P. Toxicology and fly larvae on a putrefied cadáver. **Journal of Forensic Sciences**, v. 30, p. 243-246, 1990.
- KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. Londres: Academic Press, 2002. 415p.
- LISE, M. L. Z.; GAMA E SILVA, T. S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H. M. T. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n.4, p.364-370, 1999.
- MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; PENNEREIRO, J. L. Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Brasil. Biol.**, 47(3): 289-295.
- MORETTI, T. C.; RIBEIRO, O. B.; THYSSEN, P. J.; SOLIS, D. R. Insects on decomposing carcasses of small rodents in a secondary forest in Southeastern Brazil. **European Journal of Entomology**, n. 105, p. 691-696, 2008.
- MUSVASVA, E.; WILLIAMS, K. A.; MULLER, W. J.; VILLET, M. H. Preliminary observations on the effects of hydrocortisone and sodium methohexital on development of *Sarcophaga (Curranella) tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae), and implications for estimating post mortem interval. **Forensic Science International**, n. 120, p. 37-41, 2001.
- NUORTEVA, P.; NUORTEVA, S. L. The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. **Ambio**, v. 11, n. 1, p. 34-37, 1982.
- PUJOL-LUZ, J. R.; ARANTES, L. C.; CONSTANTINO, R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 4, p. 485-492, 2008.
- SAS Institute. 2006. PROC user's manual, version 6th ed. SAS Institute, Cary, NC.
- SILVA, L. S. M. F.; MOREAU, R. L. M. Uso de esteróides anabólico androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 327-333, 2003.
- SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235-243, 2002.
- SILVA, P. R. P.; MACHADO-Jr, L. C.; FIGUEIREDO, V. C.; CIOFFI, A. P.; PRESTES, M. C.; CZEPIELEWSKI, M. A. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de

- musculação de Porto Alegre. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2007.
- SOHAL, R. S.; LAMB, R. E. Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 23, p. 1349-1354, 1977.
- SOHAL, R. S.; LAMB, R. E. Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, p. 119-124, 1979.
- SOUZA, A. S. B.; KIRST, F. D.; KRÜGER, R. F. Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul state in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 52, v. 4, p. 641-646, 2008.
- UNODC, 2007. 2007: World drug report. **United Nations: Office on drugs and crime**. Disponível em: <[http://www.unodc.org/brazil/pt/pressrelease\\_20072506.html](http://www.unodc.org/brazil/pt/pressrelease_20072506.html)>. Acesso em 16 out. 2007.

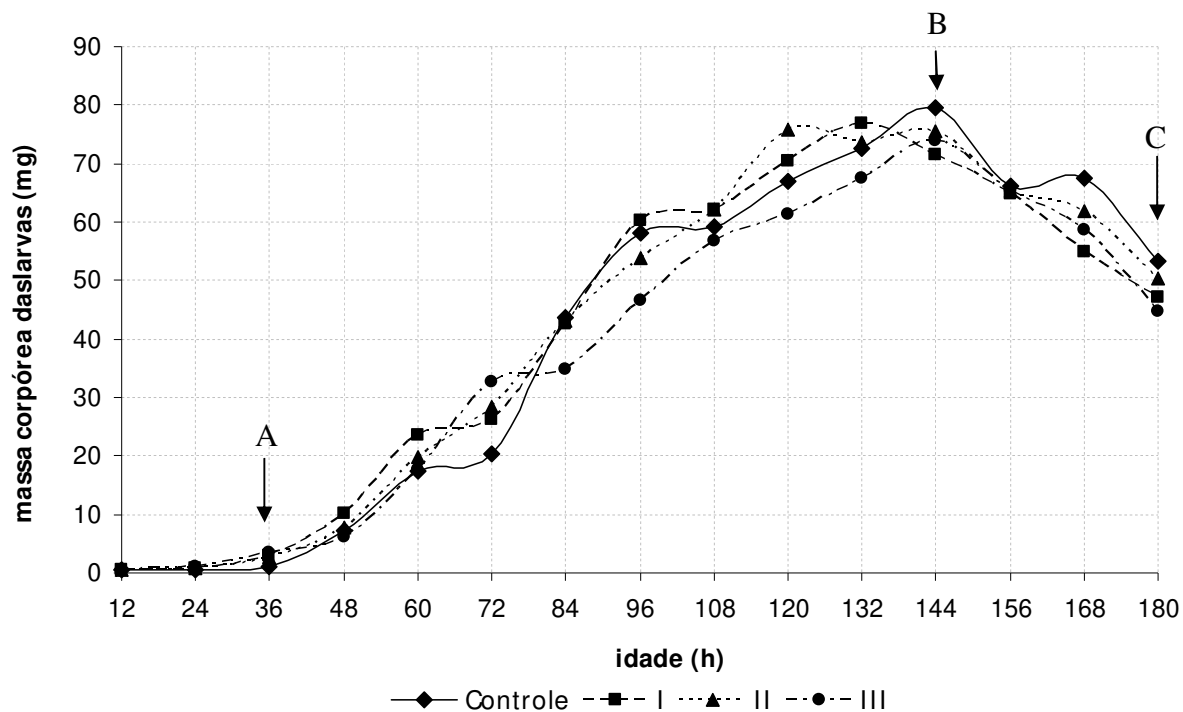
**Tabela 7:** Média da massa corporal (mg) em relação ao tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya albiceps* em diferentes concentrações da associação entre o decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona ( $x \pm DP$ ).

| Idade (h) | Controle             | 2,5xDT DECAN + 1xDT TEST | 12,5xDT DECAN + 10xDT TEST | 25xDT DECAN + 100xDT TEST |
|-----------|----------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 12        | 0,52 $\pm$ 0,14 a    | 0,62 $\pm$ 0,08 a        | 0,61 $\pm$ 0,05 a          | 0,66 $\pm$ 0,08 a         |
| 24        | 0,62 $\pm$ 0,29 a    | 0,92 $\pm$ 0,24 a        | 0,74 $\pm$ 0,25 a          | 0,94 $\pm$ 0,06 a         |
| 36        | 0,96 $\pm$ 0,19 c    | 3,02 $\pm$ 0,63 b        | 2,77 $\pm$ 0,78 a b        | 3,49 $\pm$ 0,43 a         |
| 48        | 7,21 $\pm$ 1,23 b    | 10,06 $\pm$ 1,42 b       | 7,64 $\pm$ 0,95 a          | 6,05 $\pm$ 0,76 c         |
| 60        | 17,53 $\pm$ 2,13 b   | 23,96 $\pm$ 2,87 b       | 19,81 $\pm$ 2,91 a         | 17,68 $\pm$ 2,29 b        |
| 72        | 20,39 $\pm$ 3,18 c   | 26,31 $\pm$ 5,19 b       | 28,34 $\pm$ 4,23 b         | 32,61 $\pm$ 4,74 c        |
| 84        | 43,64 $\pm$ 4,64 a   | 42,54 $\pm$ 6,21 a       | 43,18 $\pm$ 5,74 a         | 34,89 $\pm$ 3,12 b        |
| 96        | 58,12 $\pm$ 6,97 a b | 60,26 $\pm$ 7,67 b       | 53,83 $\pm$ 7,06 a         | 46,72 $\pm$ 4,44 c        |
| 108       | 59,30 $\pm$ 5,00 a   | 62,02 $\pm$ 7,44 a       | 62,02 $\pm$ 7,25 a         | 56,72 $\pm$ 5,42 a        |
| 120       | 66,86 $\pm$ 8,88 b c | 70,45 $\pm$ 7,21 a       | 75,79 $\pm$ 4,61 a b       | 61,43 $\pm$ 7,09 c        |
| 132       | 72,56 $\pm$ 7,90 a b | 76,80 $\pm$ 7,21 a b     | 73,58 $\pm$ 8,98 a         | 67,57 $\pm$ 8,14 b        |
| 144       | 79,61 $\pm$ 4,69 a   | 71,57 $\pm$ 7,85 a b     | 75,42 $\pm$ 8,69 b         | 73,80 $\pm$ 8,51 a b      |
| 156       | 66,21 $\pm$ 6,92 a   | 64,83 $\pm$ 6,26 a       | 65,43 $\pm$ 6,32 a         | 65,43 $\pm$ 6,14 a        |
| 168       | 67,43 $\pm$ 5,75 a   | 54,95 $\pm$ 7,12 b       | 61,94 $\pm$ 6,71 c         | 58,55 $\pm$ 3,96 b c      |
| 180       | 53,37 $\pm$ 5,38 a   | 47,11 $\pm$ 4,17 b       | 50,40 $\pm$ 6,19 b         | 44,75 $\pm$ 3,56 b        |

Para uma mesma linha, médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

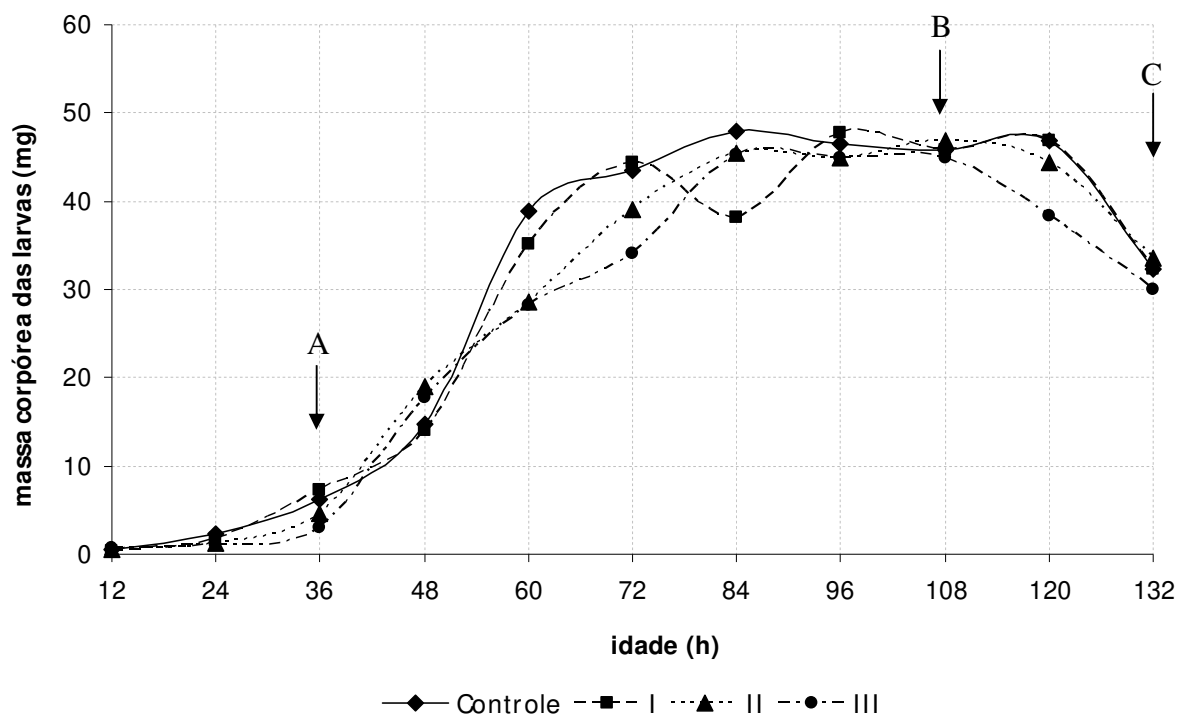
**Tabela 8:** Viabilidade larval, emergência e intervalo de emergência (h) de *Chrysomya albiceps* submetida a diferentes concentrações da associação do decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona (n=150) ( $x \pm DP$ ).

| Grupos                     | Viabilidade Larval | Emergência | Intervalo de emergência (h) |
|----------------------------|--------------------|------------|-----------------------------|
| Controle                   | 115 (77%)          | 111 (74%)  | 132 $\pm$ 25,9              |
| 2,5xDT DECAN + 1xDT TEST   | 116 (77%)          | 112 (75%)  | 132 $\pm$ 25,9              |
| 12,5xDT DECAN + 10xDT TEST | 118 (79%)          | 117 (78%)  | 132 $\pm$ 25,9              |
| 25xDT DECAN + 100xDT TEST  | 128 (85%)          | 126 (84%)  | 132 $\pm$ 25,9              |



A Fim do segundo estágio larval; B Fim do terceiro estágio larval ("pré-pupa"); C Estágio de pupa  
 I- 2,5 x DT DECAN + 1 x DT TEST; II- 12,5 x DT DECAN + 10 x DT TEST; III- 25 x DT DECAN + 100 x DT TEST

**Figura 8:** Curvas de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* submetida à criação em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações da associação de decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona, referente ao período de eclosão a pupariação.



A Fim do segundo estágio larval; B Fim do terceiro estágio larval (“pré-pupa”); C Estágio de pupa  
 I- 2,5 x DT DECAN + 1 x DT TEST; II- 12,5 x DT DECAN + 10 x DT TEST; III- 25 x DT DECAN + 100 x DT TEST

**Figura 9:** Curvas de desenvolvimento de *Chrysomya putoria* submetida à criação em dieta artificial acrescida de diferentes concentrações da associação de decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona, referente ao período de eclosão a pupariação.

**Tabela 9:** Média da massa corporal (mg) em relação ao tempo de desenvolvimento (h) de imaturos de *Chrysomya putoria* em diferentes concentrações da associação entre o decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona ( $\bar{x} \pm DP$ ).

| Idade | Controle             | 2,5xDT DECAN + 1xDT TEST | 12,5xDT DECAN + 10xDT TEST | 25xDT DECAN + 100xDT TEST |
|-------|----------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 12    | 0,46 $\pm$ 0,01 c    | 0,44 $\pm$ 0,04 c        | 0,53 $\pm$ 0,02 b          | 0,66 $\pm$ 0,08 a         |
| 24    | 2,32 $\pm$ 0,58 a    | 1,69 $\pm$ 0,34 b        | 1,29 $\pm$ 0,53 b c        | 1,15 $\pm$ 0,35 c         |
| 36    | 6,13 $\pm$ 1,87 a    | 7,22 $\pm$ 1,30 a        | 4,60 $\pm$ 1,16 b          | 3,04 $\pm$ 1,05 c         |
| 48    | 14,79 $\pm$ 2,88 b   | 14,03 $\pm$ 3,54 b       | 19,06 $\pm$ 2,78 a         | 17,82 $\pm$ 1,88 a        |
| 60    | 38,83 $\pm$ 3,46 a   | 35,21 $\pm$ 5,51 a       | 28,58 $\pm$ 3,70 b         | 28,15 $\pm$ 4,62 b        |
| 72    | 43,47 $\pm$ 4,49 a   | 44,40 $\pm$ 5,24 a       | 39,01 $\pm$ 3,84 b         | 34,01 $\pm$ 5,50 c        |
| 84    | 47,88 $\pm$ 4,37 a   | 38,12 $\pm$ 6,03 b       | 45,53 $\pm$ 2,80 a         | 45,20 $\pm$ 3,42 a        |
| 96    | 46,51 $\pm$ 2,24 a   | 47,69 $\pm$ 4,35 a       | 44,92 $\pm$ 2,57 a         | 44,96 $\pm$ 2,51 a        |
| 108   | 45,81 $\pm$ 4,91 a   | 45,81 $\pm$ 4,91 a       | 46,90 $\pm$ 3,21 a         | 44,94 $\pm$ 1,91 a        |
| 120   | 46,86 $\pm$ 2,25 a   | 46,86 $\pm$ 2,25 a       | 44,35 $\pm$ 3,15 a         | 38,31 $\pm$ 6,35 b        |
| 132   | 32,30 $\pm$ 2,18 a b | 32,30 $\pm$ 2,18 a b     | 33,51 $\pm$ 3,06 a         | 30,00 $\pm$ 3,00 b        |

Para uma mesma linha, médias seguidas da mesma letra não apresentam diferença significativa pelo teste de comparações múltiplas de Duncan.

**Tabela 10:** Viabilidade larval, emergência e intervalo de emergência (h) de *Chrysomya putoria* submetidas a diferentes concentrações da associação do decanoato de nandrolona e ésteres de testosterona (n=150) ( $\bar{x} \pm DP$ ).

| Grupos                     | Viabilidade Larval* | Emergência* | Intervalo de emergência (h) |
|----------------------------|---------------------|-------------|-----------------------------|
| Controle                   | 127 (85%)           | 120 (80%)   | 120 $\pm$ 29,4              |
| 2,5xDT DECAN + 1xDT TEST   | 134 (89%)           | 120 (80%)   | 120 $\pm$ 29,4              |
| 12,5xDT DECAN + 10xDT TEST | 101 (67%)           | 89 (59%)    | 120 $\pm$ 29,4              |
| 25xDT DECAN + 100xDT TEST  | 115 (77%)           | 87 (58%)    | 120 $\pm$ 29,4              |

\* F=5,830; p=0,0050



## 5. CONCLUSÕES

1- A análise do ganho de massa, por hora, indicou diferenças significativas em pontos específicos tanto para *Chrysomya putoria* quanto para *C. albiceps* em ambos os delineamentos experimentais, o que pode ocasionar erro no cálculo do IPM, caso esta condição não seja considerada, apesar de não ter sido observadas diferenças significativas no tempo total de desenvolvimento e intervalo de emergência.

2- Para *C. albiceps*, a maior concentração do decanoato de nandrolona afetou negativamente o ganho de massa durante várias idades do desenvolvimento larval.

3- A viabilidade larval e a taxa de emergência de *C. putoria* foram significativamente afetadas pela associação do decanoato de nandrolona associado aos ésteres de testosterona.

4- O tempo total de desenvolvimento e intervalo de emergência não diferiu entre os grupos em cada experimento, apesar da heterogeneidade observada nas curvas de desenvolvimento dos imaturos expostos ao decanoato de nandrolona associado aos ésteres de testosterona.

5- Inicialmente, *C. putoria* apresentou maior ganho de massa, contudo, em idades mais avançadas, os imaturos expostos ao decanoato de nandrolona obtiveram menor média de massa corpórea se comparado aos demais grupos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMENDT, J.; KRETTEK, R.; ZEHNER, R. Forensic entomology. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 2, p. 51-65, 2004.
- AMENDT, J.; ZEHNER, R.; RECKEL, F. The nocturnal oviposition behaviour of blowflies (Diptera: Calliphoridae) in Central Europe and its forensic implications. **Forensic Science International**, n. 175, p. 61-64, 2008.
- AMORIM, J. A.; RIBEIRO, O. B. Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 96, p. 781-784, 2001.
- ARNALDOS, M. I.; GARCÍA, M. D.; ROMERA, E.; PRESA, J. J.; LUNA, A. Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. **Forensic Science International**, n. 149, p. 57-65, 2005.
- BASSANEZI, R. C.; LEITE, M. B. F.; GODOY, W. A. C.; VON ZUBEN, C. J.; VON ZUBEN, F. J.; REIS, S. F. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 92, p. 281-286, 1997.
- BENECKE, M. A brief history of forensic entomology. **Forensic Science International**, v. 120, p. 2-14, 2001.
- BENECKE, M. Forensic Entomology: Arthropods and Corpses. In: TSOKOS, M. (Ed.) **Forensic Pathology Review**, v. II, p. 207-240, 2004.
- BEYER, J. C.; ENOS, W. F.; STAJIC, M. Identification through analysis of maggots. **Journal of Forensic Sciences**, n. 25, p. 411-412, 1980.
- BOLDRINI, J. L.; BASSANEZI, R. C.; MORETTI, A. C.; ZUBEN, F. J. V.; GODOY, W. A. C.; REIS, S. F. Non-local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **Journal of Theoretical Biology**, n. 185, p. 523-531, 1997.
- BORNEMISSZA, G. F. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. **Australian Journal of Zoology**, v. 5, p. 1-12, 1957.
- BORROR, D. J.; DeLONG, D. M. **Introdução ao estudo dos insetos**. São Paulo: Edgard Blücher, 1969. 635p.
- BOUREL, B.; FLEURISSE, L.; HÉDOUIN, V.; CAILLIEZ, J. C.; CREUSY, C.; GOSSET, D.; GOFF, M. L. Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in Calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, p. 596-599, 2001a.
- BOUREL, B.; HÉDOUIN, V.; MARTIN-BOUYER, L.; BÉCART, A.; TOURNEL, G.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D. Effects of morphine in decomposing bodies on the

- development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Forensic Sciences**, v. 44, n. 2, p. 354-358, 1999.
- BOUREL, B.; TOURNEL, G.; HÉDOUIN, V.; DEVEAUX, M.; GOFF, M. L.; GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Science International**, v. 120, p. 127-131, 2001b.
- BOUREL, B.; TOURNEL, G.; HÉDOUIN, V.; GOFF, M. L.; GOSSET, D. Determination of drug levels in two species of necrophagous Coleoptera reared on substrates containing morphine. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 2, p. 600-603, 2001c.
- BRUSCA, R. C.; BRUSCA, G. J. **Invertebrates**. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2<sup>nd</sup> ed., 2003. 966p.
- BUZZI, Z. J. **Entomologia Didática**. 4<sup>a</sup> ed., Curitiba: Editora UFPR, 2002. 348p.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. **Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. 418p.
- CAINÉ, L. M.; REAL, F. C.; SALOÑA-BORDAS, M. I.; PANCORBO, M. M.; LIMA, G.; MAGALHÃES, T.; PINHEIRO, F. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. **Forensic Science International**, n. 184, p. e21–e23, 2009.
- CALDERÓN-ARGUEDAS, O.; TROYO, A.; SOLANO, M. E. Cuantificación de formas larvales de *Synthesiomyia nudiseta* (Diptera: Muscidae) como un criterio en el análisis del intervalo post mortem. **Parasitología Latinoamericana**, n. 60, p. 138-143, 2005.
- CAMPOBASSO, C. P.; GHERARDI, M.; CALIGARA, M.; SIRONI, L.; INTRONA, F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **International Journal of Legal Medicine**, n. 118, p.210-214, 2004.
- CAMPOBASSO, C. P.; VELLA, G. D.; INTRONA, F. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. **Forensic Science International**, v. 120, p. 18-27, 2001.
- CARRERA, M. **Insetos de Interesse Médico e Veterinário**. Curitiba: Editora UFPR, 1991. 228p.
- CARVALHO, C. J. B.; MELLO-PATIU, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 52, v. 3, p. 390-406, 2008.
- CARVALHO, L. M. L. **Detecção e efeito de drogas no desenvolvimento de formas imaturas e adultas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), duas moscas varejeiras de interesse forense**. 2004. 104f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 3, p. 604-608, 2001.
- CARVALHO, L. M. L.; LINHARES, A. X.; TRIGO, J. R. Determination of drug levels and the effect of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. **Forensic Science International**, v. 120, p. 140-144, 2001.
- CARVALHO, L. M. L.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X.; PALHARES, F. B. A checklist of arthropods associated with carrion and human corpses in southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 95, v. 1, p. 135-138, 2000.
- CARVALHO, L. M. L.; THYSSEN, P. J.; GOFF, M. L.; LINHARES, A. X. Observations on the succession patterns of necrophagous insects onto a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil. **Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, n. 5, p. 33-39, 2004.
- CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 253-272, 1992.
- CATTS, E. P.; HASKELL, N. H. **Entomology and death: a procedural guide**. Clemson, SC: Joyce's Print Shop, 1990. 180p.
- CENTENO, N.; ALMORZA, D.; ARNILLAS, C. Diversity of Calliphoridae (Insecta: Diptera) in Hudson, Argentina. **Neotropical Entomology**, n. 33, v. 3, p. 387-390, 2004.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. New York: Cambridge University Press, 2006. 788p.
- CONCEIÇÃO, C. A.; WANDER, F. S.; MASSILI, L. P.; VIANNA, L. A. F.; GONÇALVES, D. M.; FOSSATI, G. Uso de anabolizantes entre praticantes de musculação em academias. **Revista Pesquisa Médica**, n. 33, p. 103-116, 1999.
- CUNHA, T. S.; CUNHA, N. S.; MOURA, M. J. C. S.; MARCONDES, F. K. Esteróides anabólicos androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 165-179, 2004.
- DE JONG, G. D.; HOBACK, W. W. Effect of investigator disturbance in experimental forensic entomology: succession and community composition. **Medical and Veterinary Entomology**, n. 20, p. 248-258, 2006.
- EBERHARDT, T. L.; ELLIOT, D. A. A preliminary investigation of insect colonisation and succession on remains in New Zealand. **Forensic Science International**, n. 176, p. 217-223, 2008.
- FERRARI, A. C.; SOARES, A. T. C.; GUIMARÃES, M. A.; THYSSEN, P. J. Efeito da testosterona no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). **Medicina (Ribeirão Preto)**, n. 41, v. 1, p. 30-34, 2008.

- FRANÇA, G.V. **Medicina Legal**. 8ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2008. 629p.
- FRIZON, F.; MACEDO, S. M. D.; YONAMINE, M. Uso de esteróides andrógenos anabólicos por praticantes de atividade física das principais academias de Erechim e Passo Funso/RS. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 26, n. 3, p. 227-232, 2005.
- GAGLIANO-CANDELA, R.; AVENTAGGIATO, L. The detection of toxic substances in entomological specimens. **International Journal of Legal Medicine**, n. 114, p. 197-203, 2001.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; HEWADIKARAM, K. A.; OMORI, A. I. Effect of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera, Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation do postmortem intervals using arthropod development patterns. **Journal of Forensic Sciences**, v. 36, n. 2, p. 537-542, 1991.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on the estimations of postmortem intervals. **Journal of Forensic Sciences**, v. 37, n. 3, p. 867-872, 1992.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I.; LaPOINT, D. A. Preliminary observations of the effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of postmortem interval. **Journal of Forensic Sciences**, v. 38, n. 2, p. 316-322, 1993.
- GOFF, M. L.; BROWN, W. A.; OMORI, A. I.; LaPOINT, D. A. Preliminary observations of phencyclidine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae). **Journal of Forensic Sciences**, v. 39, n. 1, p. 123-128, 1994.
- GOFF, M. L.; MILLER, M. L.; PAULSON, J. D.; LORD, W. D.; RICHARDS, E.; OMORI, A. I. Effects of 3,4-mehtilenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae and puparia. **Journal of Forensic Sciences**, v. 42, n. 2, p. 276-280, 1997.
- GOFF, M. L.; OMORI, A. I.; GOODBROD, J. R. Effect of cocaine in tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 26, n. 2, p. 91-93, 1989.
- GOODMAN-GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 10 ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1821p.

- GREENBERG, B.; KUNICH, J. C. **Entomology and the law: flies as forensic indicators**. New York: Cambridge University Press, 2002. 306p.
- GRELLA, M. D.; ESTRADA, D. A.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. The effect of scopolamine on the development of *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) and its importance for the post mortem interval estimate. **Entomología Mexicana**, v. 6, n. 2, p.870-873, 2007.
- GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. **Myiasis in man and animals in Neotropical region: bibliographic database**. São Paulo: Plêiade: FAPESP, 1999. 308p.
- GUIMARÃES, J. H.; PRADO, Â. P.; LINHARES, A. X. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 22, v. 1, p. 53-60, 1978.
- GUIMARÃES-NETO, W. M. **Musculação – Anabolismo Total: treinamento, nutrição, esteróides anabólicos, outros ergogênicos**. Guarulhos: Phorte, 7 ed., 2005. 172p.
- GUNATILAKE, K.; GOFF, M. L. Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analysing arthropod larvae. **Journal of Forensic Sciences**, v. 34, p. 714-716, 1989.
- GUPTA, A.; SETIA, P. Forensic entomology - past, present and future. **Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 50-53, 2004.
- HALL, R. D.; GERHARDT, R. R. Flies (Diptera). *In*: MULLEN, G.; DURDEN, L. A. **Medical and Veterinary Entomology**, New York: Academic Press, p. 127-145, 2002.
- HÉDOUIN, V.; BOUREL, B.; BÉCART, A.; TOURNEL, G.; DEVEAUX, M.; GOFF, M. L.; GOSSET, D. Determination of drug levels in larvae of *Protophormia terraenovae* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, n. 1, p. 12-14, 2001.
- HÉDOUIN, V.; BOUREL, B.; MARTIN-BOUYER, L.; BÉCART, A.; TOURNEL, G.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D. Morphine perfused rabbits: a tool for experiments in forensic entomology. **Journal of Forensic Sciences**, v. 44, n. 2, p. 347-350, 1999a.
- HÉDOUIN, V.; BOUREL, B.; MARTIN-BOUYER, L.; BÉCART, A.; TOURNEL, G.; DEVEAUX, M.; GOSSET, D. Determination of drug levels in larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) reared on rabbit carcasses containing morphine. **Journal of Forensic Sciences**, v. 44, n. 2, p. 351-353, 1999b.
- HORENSTEIN, M. B.; LINHARES, A. X.; ROSSO, B.; GARCÍA, M. D. Species composition and seasonal succession of saprophagous calliphorids in a rural area of Cordoba, Argentina. **Biological Research**, v. 40, p. 163-171, 2007.
- IANNACONE, J. Artropodofauna de importancia forense em um cadáver de cerdo en el Callao, Peru. **Revista Brasileira de Zoologia**, n. 20, v.1, p. 85-90, 2003.

- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; DIFAZIO, A. Three case studies in forensic entomology from Southern Italy. **Journal of Forensic Sciences**, v. 43, p. 210-214, 1998.
- INTRONA, F.; CAMPOBASSO, C. P.; GOFF, M. L. Entomotoxicology, **Forensic Science International**, n. 120, p. 42-47, 2001.
- INTRONA, F.; LO DICO, C.; CAPLAN, Y. H.; SMIALEK, J. E. Opiate analysis of cadaveric blowfly larvae as an indicator of narcotic intoxication. **Journal of Forensic Sciences**, v. 35, p. 118-122, 1990.
- IRIART, J. A. B.; CHAVES, J. C.; ORLEANS, R. G. Culto ao corpo e uso de anabolizantes entre praticantes de musculação. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 4, p. 773-782, 2009.
- KINTZ, P.; GODELAR, B.; TRACQUI, A.; MANGIN, P.; LUGNIER, A. A.; CHAUMONT, A. J. Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine. **Journal of Forensic Sciences**, v. 35, n. 1, p. 204-207, 1990a.
- KINTZ, P.; TRACQUI, A.; LUDES, B.; WALLER, J.; BOUKHABZA, A.; MANGIN, P.; LUGNIER, A. A.; CHAUMONT, A. J. Fly larvae and their relevance in forensic toxicology. **The American Journal of Forensic Medicine and Pathology**, v. 11, n. 1, p. 63-65, 1990b.
- KINTZ, P.; TRACQUI, A.; MANGIN, P. Toxicology and fly larvae on a putrefied cadaver. **Journal of Forensic Sciences**, v. 30, p. 243-246, 1990.
- KLOWDEN, M. J. **Physiological systems in insects**. Londres: Academic Press, 2002. 415p.
- KOČÁREK, P. Decomposition and coleopteran succession on exposed carrion of small mammal in Opava, the Czech Republic. **European Journal of Soil Biology**, v. 39, p. 31-45, 2003.
- LINHARES, A. X. Synanthropy of calliphoridae and sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 25, p. 189-215, 1981.
- LINHARES, A. X. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 32, p. 383-392, 1988.
- LINHARES, A. X.; THYSSEN, P. J. Miíases de Importância Médica – Moscas e Entomologia Forense. In: DE CARLI, G. A. (org.) **Parasitologia Clínica: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas**, 2º ed., São Paulo: Ed. Atheneu, p.709-730, 2007.
- LISE, M. L. Z.; GAMA E SILVA, T. S.; FERIGOLO, M.; BARROS, H. M. T. O abuso de esteróides anabólico-androgênicos em atletismo, **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n.4, p.364-370, 1999.
- LORD, W. D.; STEVENSON, J. R. **Directory of forensic Entomologists**. Def. Pest Mgmt. Info. Anal. Center (eds.), Washington: Walter Reed Army Medical Center, 1986. 44p.

- MARCHENKO, M. I. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of death. **Forensic Science International**, n. 120, p. 89-109, 2001.
- MARCHIORI, C. H.; SILVA, C. G.; CALDAS, E. R.; VIEIRA, C. I. S.; ALMEIDA, K. G. S.; TEIXEIRA, F. F.; LINHARES, A. X. Artrópodes associados com carcaça de suíno em Itumbiara, sul de Goiás. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 2, p. 167-170, 2000.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, São Paulo: Atheneu, 2001. 432p.
- MARQUARDT, W. C.; KONDRATIEFF, B. C.; MOORE, C. G. (Orgs.) **Biology of Disease Vectors**. Colorado: Academic Press, 2ª ed., 2004. 816p.
- MATUSZEWSKI, S.; BAJERLEIN, D.; KONWERSKI, S.; SZPILA, K. An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. **Forensic Science International**, n. 180, p. 61-69, 2008.
- MICHAUD, J. P.; MOREAU, G. Predicting the visitation of carcasses by carrion-related insects under different rates of degree-day accumulation. **Forensic Science International**, n. 185, p. 78-83, 2009.
- MILLER, M. L.; LORD, W. D.; GOFF, M. L.; DONNELLY, D.; McDONOUGH, E. T.; ALEXIS, J. C. Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. **Journal of Forensic Science**, v. 39, p. 1305-1313, 1994.
- MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; PENEREIRO, J. L. Estudo de decomposição e sucessão sobre uma carcaça animal numa área do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 47, p. 289-295, 1987.
- MORETTI, T. C.; RIBEIRO, O. B.; THYSSEN, P. J.; SOLIS, D. R. Insects on decomposing carcasses of small rodents in a secondary forest in Southeastern Brazil. **European Journal of Entomology**, n. 105, p. 691-696, 2008a.
- MORETTI, T. C.; THYSSEN, P. J.; GODOY, W. A. C.; SOLIS, D. R. Necrophagy by the social wasp *Agelaia pallipes* (Hymenoptera: Vespidae, Epiponini): possible forensic implications. **Sociobiology**, n. 51, v. 2, p. 393-398, 2008b.
- MOURA, M. O.; CARVALHO, C. J. B.; MONTEIRO, E. L. A. A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, State of Paraná. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 92, p. 269-274, 1997.
- MUSVASVA, E.; WILLIAMS, K. A.; MULLER, W. J.; VILLET, M. H. Preliminary observations on the effects of hydrocortisone and sodium methohexital on development of *Sarcophaga (Curranella) tibialis* Macquart (Diptera: Sarcophagidae), and implications for estimating post mortem interval. **Forensic Science International**, n. 120, p. 37-41, 2001.
- NOLTE, K. B.; PINDER, R. D.; LORD, W. D. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. **Journal of Forensic Sciences**, v. 37, n. 4, p. 1179-1185, 1992.



- NUORTEVA, P.; NUORTEVA, S. L. The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. **Ambio**, v. 11, n. 1, p. 34-37, 1982.
- O'BRIEN, C.; TURNER, B. Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. **International Journal of Legal Medicine**, n. 118, p. 188-189, 2004.
- OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 515p.
- OLIVEIRA, H. G.; GOMES, G.; MORLIN-JR, J. J.; ZUBEN, C. J. V.; LINHARES, A. X. The effect of Buscopan® on the development of the blow fly *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Forensic Science**, v. 54, n. 1, p. 202-206, 2009.
- OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia forense: quando os insetos são vestígios**. Campinas: Millennium, 2 ed., 2007. 456p.
- ÖZDEMİR, S.; SERT, O. Determination of Coleoptera fauna on carcasses in Ankara province, Turkey. **Forensic Science International**, n. 183, p. 24–32, 2009.
- PIEN, K.; LALOUP, M.; PIPELEERS-MARICHAL, M.; GROOTAERT, P.; DeBOEK, G.; SAMYN, N.; BOONEM, T.; VITS, K.; WOOD, M. Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **International Journal of Legal Medicine**, n. 118, p. 190-193, 2004.
- POUNDER, D. J. Forensic entomotoxicology. **Journal of Forensic Science**, v. 31, p. 469-472, 1991.
- PUJOL-LUZ, J. R.; MARQUES, H.; URURAHY-RODRIGUES, A.; RAFAEL, J. A.; SANTANA, F. H. A.; ARANTES, L. C.; CONSTANTINO, R. 2006. A forensic entomology case from the Amazon rain Forest of Brazil. **Journal of Forensic Science**, n. 51, v. 5, p. 1151-1153, 2006.
- PUJOL-LUZ, J. R.; ARANTES, L. C.; CONSTANTINO, R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 4, p. 485-492, 2008.
- REED, H. B. A study of dog carcass communities in Tennessee, with special reference to the insects. **The American Midland Naturalist**, v. 59, n.1, p. 213-245, 1958.
- REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**, 4ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 883p.
- RIBEIRO, N. M. **Decomposição e sucessão entomológica em carcaças de suínos expostas em área de cerrado e mata ciliar no Sudeste Brasileiro**. 2003. 69f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- RICHARDS, C. S.; PATERSON, I. D.; VILLET, M. H. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. **International Journal of Legal Medicine**, n. 122, p. 271–279, 2008.

- ROQUETTE-PINTO, E. Nota sobre a fauna cadavérica, no Rio de Janeiro. **A Tribuna Médica**, n. 21, 1908, p. 413-417.
- ROSA, T. A. **Artropodofauna de interesse forense no Cerrado do município de Uberlândia, MG: abundância relativa, diversidade e sucessão entomológica**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.
- RUPPERT, E. E.; BARNES, D. R. **Zoologia dos Invertebrados**. São Paulo: Rocca, 6ª ed., 1996. 1029p.
- SADLER, D. W.; FUKU, C.; COURT, F.; POUNDER, D. J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Science International**, n. 71, p. 191-197, 1995.
- SADLER, D. W.; ROBERTSON, L.; BROWN, G.; FUKU, C.; POUNDER, D. J. Brabitorates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **Journal of Forensic Sciences**, v. 42, n. 3, p. 481-485, 1997.
- SADLER, D. W.; SENEVIRATNE, C.; POUNDER, D. J. Correspondence. **Journal of Forensic Sciences**, v. 42, n. 6, p. 1212-1213, 1997.
- SANTOS, A. M. 2003. **O mundo anabólico**: Analise do uso de esteróides anabólicos nos esportes. Barueri – São Paulo: Manole.
- SEGURA, N. A.; USAQUÉN, W.; SÁNCHEZ, M. C.; CHUAIRE, L.; BELLO, F. Succession pattern of cadaverous entomofauna in a semi-rural area of Bogotá, Colombia. **Forensic Science International**, n. 187, p. 66-72, 2009.
- SHARANOWSKI, B. J.; WALKER, E. G.; ANDERSON, G. S. Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. **Forensic Science International**, n. 179, p. 219-240, 2008.
- SHERMAN, R. A.; WYLE, F. A.; THRUPP, L. Effects of seven antibiotics on the growth and development of *Phaenicia sericata* (Diptera: Calliphoridae) larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 5, p. 646-649, 1995.
- SIEGEL, J.; KNUPFER, G.; SAUKKO, P. **Encyclopedia of forensic sciences**. Three-volume, Elsevier, 2000. 1484p.
- SILVA, L. S. M. F.; MOREAU, R. L. M. Uso de esteróides anabólico androgênicos por praticantes de musculação de grandes academias da cidade de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 327-333, 2003.
- SILVA, P. R. P.; DANIELSKI, R.; CZEPIELEWSKI, M. A. Esteróides anabolizantes no esporte. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 8, n. 6, p. 235-243, 2002.
- SILVA, P. R. P.; MACHADO-Jr, L. C.; FIGUEIREDO, V. C.; CIOFFI, A. P.; PRESTES, M. C.; CZEPIELEWSKI, M. A. Prevalência do uso de agentes anabólicos em praticantes de

- musculação de Porto Alegre. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2007.
- SOHAL, R. S.; LAMB, R. E. Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, *Musca domestica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 23, p. 1349-1354, 1977.
- SOHAL, R. S.; LAMB, R. E. Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, *Musca domestica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, p. 119-124, 1979.
- SONG, Z. K.; WANG, X. Z.; LIANG, G. Q. Species identification of some common necrophagous flies in Guangdong province, southern China based on the rDNA internal transcribed spacer 2 (ITS2). **Forensic Science International**, n. 175, p. 17-22, 2008.
- SOUZA, A. M.; LINHARES, A. X. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, p. 8-12, 1997.
- SOUZA, A. S. B.; KIRST, F. D.; KRÜGER, R. F. Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul state in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 52, v. 4, p. 641-646, 2008.
- TAVARES, M. C. H. **Sucessão faunística de populações de insetos associados à decomposição de carcaças de suínos expostas em diferentes altitudes e condições pluviométricas na reserva florestal da Serra do Japi, Jundiá, SP.** 2003. 121f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.
- THOMPSON, F. C. Nomenclator Status Statistics. **The Diptera site: The BioSystematic Database of World Diptera**. 2008. Disponível em: <<http://www.sel.barc.usda.gov/Diptera/names/Status/bdwdstat.htm>>. Acesso em: out. 2008.
- THYSSEN, P. J.; LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; LINHARES, A. X. The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. **Neotropical Entomology**, n. 34, v. 5, p. 777-783, 2005.
- THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X. First description of immature stages of *Hemilucilia segmentaria* (Diptera: Calliphoridae). **Biological Research**, n. 40, p. 271-280, 2007.
- TRACQUI, A.; KEYSER-TRACQUI, C.; KINTZ, P.; LUDES, B. Entomotoxicology for the forensic toxicologist: much ado about nothing? **International Journal of Legal Medicine**, n. 118, p. 194-196, 2004.
- TURCHETTO, M.; VANIN, S. Forensic evaluations on a crime case with monospecific necrophagous fly population infected by two parasitoid species. **Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, n. 5, v. 1, p. 12-18, 2004.

- UNODC, 2007. 2007: World drug report. **United Nations: Office on drugs and crime**. Disponível em: <[http://www.unodc.org/brazil/pt/pressrelease\\_20072506.html](http://www.unodc.org/brazil/pt/pressrelease_20072506.html)>. Acesso em 16 out. 2007.
- VANIN, S.; TASINATO, P.; DUCOLIN, G.; TERRANOVA, C.; ZANCANER, S.; MONTISCI, M.; FERRARA, S. D., TURCHETTO, M. Use of *Lucilia* species for forensic investigations in Southern Europe. **Forensic Science International**, n. 177, p. 37–41, 2008.
- VELÁSQUEZ, Y. A checklist of arthropods associated with rat carrion in a montane locality of northern Venezuela. **Forensic Science International**, n. 174, p. 67–69, 2008.
- VON ZUBEN, C. J.; BASSANEZI, R. C.; REIS, S. F.; GODOY, W. A. C.; VON ZUBEN, F. J. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **Journal of Applied Entomology**, n. 120, p. 379-382, 1996.
- VOSS, S. C.; FORBES, S. L.; DADOUR, I. R. Decomposition and insect succession on cadavers inside a vehicle environment. **Forensic Sciences, Medicine and Pathology**, n. 4, 2008, p. 22–32.
- WANG, J.; LI, Z.; CHEN, Y.; CHEN, Q.; YIN, X. The succession and development of insects on pig carcasses and their significances in estimating PMI in south China. **Forensic Science International**, n. 179, p. 11–18, 2008.
- WOOD, M.; LALOUP, M.; PIEN, K.; SAMYN, N.; MORRIS, M.; MAES, R. A. A.; DE BRUIJN, E. A.; MAES, V.; DE BOECK, G. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of benzodiazepines in *Calliphora vicina* larvae and puparia by LC-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 505-512, 2003.
- YEATS, D. K.; WIEGMANN, B. M. (eds.) **The evolutionary biology of flies**. New York: Columbia University Press, 2005. 430 p.
- YESALIS, C. E. **Anabolic steroids in sport and exercise**. Champaign: Human Kinetics Publishers, 1993. 325p.