



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**CRIAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS DO PADRÃO SUCESSÓRIO
DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE DÍPTEROS DE IMPORTÂNCIA
FORENSE NO ESTADO DO MATO GROSSO, ATRAVÉS DE
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODE)**

ELISANGELA SANTANA DE OLIVEIRA DANTAS

Orientadora: Dr^a. Patrícia Pasquali Parise Maltempi

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
doutor Ciências Biológicas (Área de
Biologia Celular e Molecular)

Rio Claro
Junho de 2014

**CRIAÇÃO DE UM BANCO DE DADOS DO PADRÃO SUCESSÓRIO
DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE DíPTEROS DE IMPORTÂNCIA
FORENSE NO ESTADO DO MATO GROSSO, ATRAVÉS DE
IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR (DNA BARCODE)**

ELISANGELA SANTANA DE OLIVEIRA DANTAS

**Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
doutor Ciências Biológicas (Área de
Biologia Celular e Molecular)**

Orientadora: Dr^a. Patrícia Pasquali Parise Maltempi

Rio Claro
Junho de 2014

595.7 Dantas, Elisangela Santana de Oliveira
D192c Criação de um banco de dados do padrão sucessório das principais espécies de dípteros de importância forense no estado do Mato Grosso, através de identificação molecular (DNA Barcode) / Elisangela Santana de Oliveira Dantas. - Rio Claro, 2014
82 f. : il., figs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Patrícia Pasquali Parise Maltempi
Coorientador: Flávia Galindo Silvestre

1. Inseto. 2. Entomologia forense. 3. Díptera. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que essa tese fosse concluída:

- Em especial a minha orientadora Dr^a. Patrícia Pasquali Parise Maltempi, a ela não tenho palavras, pois confiou em mim, aceitou esse desafio e ficou firme me apoiando até o final, mesmo nas horas de maior dificuldade. Obrigada professora por tudo, sem seu apoio jamais essa tese teria sido possível.

- Ao programa de Pós Graduação de Biologia Celular e Molecular, por todo o apoio. Em especial a Rosemary Cardoso por ter sempre que preciso sido atendida com muito respeito, profissionalismo e bom humor (obrigada).

- Ao laboratório Forense da POLITEC, pelo apoio com os equipamentos, espaço, sem o qual não seria possível a confecção desta tese.

- A Reginaldo Rossi, meu companheiro de horas de bom humor, e muiiitas perguntas.

- A Flavia Galindo Silvestre por ter me estimulado a escrever sobre esse tema. Sem ela esse projeto não teria sido realizado.

-Ao LIANO, você meu amigo de fé meu irmão camarada...Mas é muito bom saber que você é meu amigo.

- Aos meus grandes amigos Ed, Tu e Samuca pelos momentos de muita alegria na sua casa, por me acolherem com muito carinho sempre que precisei.

- Ao meu pai, que não está mais presente, mas que com certeza que está muito orgulhoso.

- A a minhas irmãs que sempre me apoiaram, Janaina e Fabrizio por momentos de extrema diversão, a minha mãe que neste período ficou viúva, mas que tem levado isso sempre com bom senso e horas de pensamentos...TE AMO.

- Aos meus três filhos: Natalia, Vinicius e Ulisses, por eles existirem em minha vida e serem as pessoas que mais aturaram e aturam todas as mudanças de humor. A mamãe ama muito vocês.

- Ao meu marido "NINI" por ser mais que meu marido, ser meu companheiro, meu amigo, minha vida, estar com ele é a melhor coisa que pude fazer na minha vida.

- A minha irmã Angela que sempre com sua grande paciência e destreza no computador me ajudou sempre que pedi.Você é muito especial.

- Aos meus dois grandes amigos e irmãos, Érica e Júnior, não vou escrever muito só que: ainda bem que Deus Criou os Amigos...

EU APRENDI

*...Que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para segurar e um coração para
nos entender;*

...Que deveríamos ser gratos à DEUS por não nos dar tudo que lhe pedimos;

...Que são os pequenos acontecimentos diários que torna a vida espetacular;

...Que o AMOR e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;

...Que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;

...Que as oportunidades nunca são perdidas; alguém vai aproveitar as que você perdeu;

...Que um sorriso é a maneira mais barata de melhorar sua aparência;

...Que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer...

Shakespeare

SUMÁRIO

Sumário	7
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Entomologia Forense	1
1.2 Sucessão Entomológica.....	8
1.3 Fenômenos Cadavéricos	10
1.4 O Código de Barras da Vida	14
1.5 Banco de Dados.....	18
1.5.1 BOLD – Barcode of Life Data Systems.....	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo	22
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Experimento	23
3.2 Extração do DNA.....	24
3.3 Amplificação	25
3.4 Sequenciamento	26
3.5 Alinhamento	26
3.6 Entrada dos Dados nos Bancos de Dados.....	28
3.7 Sistemática Molecular	29
4 RESULTADOS.....	30
5 DISCUSSÃO	40
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	64

RESUMO

A Perícia criminal trabalha com um grande número de situações dentro das áreas de atuação. Dentro dessa diversidade de estudos está a entomologia forense, que utiliza os insetos aliado a justiça para responder perguntas do cotidiano. como: descobrir rotas de tráfico, maus tratos contra pessoas e IPM (Intervalo Pós-Morte), que é o foco principal deste trabalho. Quando há casos em que pessoas estão envolvidas, quanto mais rápida for a identificação da mesma, melhor será para os familiares que sofrem com a suas perdas. Para que isso ocorra é necessário unir varias áreas da Perícia Criminal para que essa identificação se consolide e a entomologia se inclui em uma dessas áreas. A correta identificação das espécies de insetos encontradas no corpo é uma das ferramentas que auxilia nessa busca pela verdade. Porém, existe grande dificuldade na identificação de insetos imaturos e isso retarda o trabalho da perícia. O Código de barra de DNA tem sido utilizado com sucesso na identificação da insetos. A identificação correta das espécies é importante para a conservação e quantificação da biodiversidade. Com isso este trabalho tem como objetivo gerar um banco de dados de sequências do código de barras de DNA. O gene utilizado como código de barra de DNA é o gene mitocondrial Citocromo C Oxidase 1 (COI). Na validação do gene COI do código de barra de DNA como ferramenta taxonômica para identificação de espécies de dípteros de interesse forense, obtivemos um resultado satisfatório das espécies identificadas . O Código de barra de DNA interage entre a Taxonomia Clássica e Molecular para uma identificação precisa das espécies. Os resultados do presente trabalho demonstraram que como ferramenta taxonômica, o DNA barcode pode ser usado para a identificação molecular de insetos de interesse forense.

Palavras chaves: Entomologia forense, Barcode, Banco de dados, Diptera.

ABSTRACT

The criminal Skill works with a large number of situations within their areas of expertise. Within this diversity of studies is forensic entomology, which uses insects allied to justice to answer questions everyday. as discovering routes trafficking, mistreatment of people and PMI (postmortem interval), which is the main focus of this work. When there are cases in which people are involved, the faster the identification thereof, will be best for the family suffering from their loss. For this to occur it is necessary to combine several areas of Criminal Skill for this identification to consolidate and entomology are included in one of these areas. Correct identification of insect species found in the body is a tool that aids in this search for truth. However, there is great difficulty in the identification of immature insects and this slows down the work skill. The DNA bar code has been successfully used in the identification of insects. The correct species identification is important for the conservation of biodiversity and quantification. Thus this work aims to generate a database of sequences of DNA barcode. The gene used as a DNA barcode is the mitochondrial gene Cytochrome C Oxidase 1 (COI). Validation of the COI gene of the DNA bar as taxonomic tool for identification of species of Diptera phoresis of interest, code obtained a satisfactory outcome of the identified species. The DNA bar code interacts between the Classical and Molecular taxonomy for accurate species identification. The results of this study showed that as taxonomic tool, the DNA barcode can be used for molecular identification of insects of forensic interest.

Key words : Forensic Entomology , Barcode Database, Diptera .

Dedico em especial a Deus, que permitiu que eu continuasse nessa jornada até o final, colocando em meu caminho pessoas que me fazem crescer; só ele pode definir o que começa e o que para.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Entomologia Forense

A entomologia é uma ciência muito antiga nas civilizações babilônicas e do Egito. As moscas apareciam como amuletos, como deuses (Baal Zebub), e como uma das pragas na história bíblica do Êxodo (Thompson e Pont, 1993). A metamorfose das moscas já era conhecida no antigo Egito como pode ser visto em um papiro encontrado no interior da boca de uma múmia que continha a seguinte inscrição: “As larvas não se transformarão em moscas dentro de ti” [Papiro de Gizé nº 18026:4:14]. A maioria dos insetos encontrados em corpos embalsamados são os mesmos que agora auxiliam na solução de casos de morte (Greenberg 1991).

A entomologia forense é a área de investigação científica que interpreta as informações fornecidas pelos insetos na resolução de questões de caráter forense (Carreira et al., 2008). Segundo Lord e Stevesson (1986) a entomologia forense divide o estudo de insetos em três categorias: urbana, de produtos estocados e médico-legal. Esta última se baseia na utilização de artrópodes na resolução de crimes, frequentemente aqueles ligados à morte violenta (Hall, 2001).

Desta forma, por entomologia médico-legal ou forense entende-se a aplicação dos estudos sobre insetos (ou outros artrópodes) associados a um cadáver humano em decomposição, além dos eventos que envolvam suspeitas de crime, a fim de disponibilizar informações necessárias para uma posterior investigação (Keh, 1985; Smith, 1986; Greenberg, 1991; Von Zuben *et al.*, 1996; Vanlaerhoven e Anderson, 1999).

A fauna entomológica decompositora exerce um importante papel ecológico com envolvimento direto na entomologia forense e as questões médico-

legais. Conhecimentos sobre a entomologia forense médico-legal estão ligados com estudos relacionados à taxonomia, biologia e ecologia dos táxons envolvidos nos processos de decomposição de animais e seres humanos (Ururahy, 2008).

O primeiro registro de utilização de insetos na investigação criminal que se conhece ocorreu no século XIII, na China. Foi um caso de homicídio em que um lavrador apareceu degolado por uma foice. Para resolver o caso, todos os lavradores da região foram obrigados a depositar suas foices no solo, ao ar livre. As moscas pousaram em apenas uma delas, atraídas pelos restos de sangue que ainda estavam aderidos à lâmina. A conclusão foi que aquela era a foice do assassino (Benecke, 2001).

Estudos pioneiros e sistematizados da entomofauna de cadáveres se deram com a publicação do livro de Mégnin (1894), que listou a sequência cronológica da decomposição de corpos e a colonização dos mesmos por insetos, sendo essas sequências descritas como oito ondas de invasões, sendo reconhecidas as ordens Diptera, Lepidoptera e Acarina.

A sucessão, segundo Oliveira-Costa (2007), segue um padrão inicialmente previsível, visto que a cada fase o processo de decomposição o extrato é colonizado por determinados grupos, que se sentem mais atraídos por estágios diferentes. Desta forma é possível associar espécies a fases específicas da decomposição.

O conhecimento da sucessão de insetos e sobre colonização cadavérica, numa determinada área geográfica permite, através da análise da entomofauna do cadáver, fazer uma estimativa do tempo decorrido depois da morte (Anderson, 2001). Os insetos podem ser úteis na investigação de um crime por fornecerem a estimativa de tempo transcorrido após a morte, também conhecido como intervalo

Pós-Morte (IPM). O IPM é baseado no tempo que o inseto leva para se desenvolver de ovo até o estágio no qual ele foi encontrado no cadáver. Por meio deste tipo de estudo, pode-se inferir dentre outros aspectos, onde o crime ocorreu analisando a fauna na região onde o cadáver foi encontrado; o culpado do crime, relacionando insetos ou fragmentos encontrados no suspeito e vítima ou no suspeito e também o local do crime (Galloway *et al.*, 1989; Goff e Flynn, 1991; Miranda *et al.* 2006).

Devido ao olfato apurado, esses animais sentem rapidamente os odores exalados pelos cadáveres, onde se instalam e procriam, pois a carne decomposta forma um ótimo habitat, seja como sítio de cópula, estímulo à oviposição ou fonte proteica (Greenberg, 1985; Jirón e Vargas-Alvarado, 1983; Miranda *et al.*, 2006). As espécies de moscas necrófagas apresentam três instares larvais. As larvas param de se alimentar após o terceiro instar e abandonam a carcaça em sentido radial buscando proteção e condições favoráveis para empupar e posteriormente emergir na sua forma adulta, fechando o ciclo (Gomes; Zuben, 2005).

A aceleração da putrefação cadavérica ocorre pela ação desses artrópodes (Love; Hamilton, 2011), sendo que para cada estágio de decomposição do corpo determinado grupo de insetos é atraído. Fatores como temperatura e umidade do ar exercem influência e podem alterar dados a respeito dos padrões de sucessão ecológica das espécies colonizadoras do cadáver. Os registros referentes à distribuição geográfica destes táxons tornam-se então, de fundamental importância para o IPM assim como o conhecimento do período levado por cada estágio de desenvolvimento do inseto (Oliveira-Costa, 2007; Carvalho, Queiroz, 2010)

As pesquisas realizadas em outros países somam um grande banco de dados sobre o padrão de sucessão de insetos nos corpos. Porém, devido às condições

climáticas brasileiras aliadas à grande extensão territorial do país, esses dados não podem ser seguramente utilizados nos nossos exames periciais (Mann *et al.*, 1990).

O conhecimento da fauna local é muito importante quando se fala em investigação, dados de regiões com características diferentes, podem não fornecer com exatidão a identificação das espécies encontradas no local inicial do estudo, havendo desta forma a necessidade de um banco de dados mais completo de espécies encontradas por região (Cainé *et al.*, 2009).

Os estudos feitos no Brasil têm visado a priori a identificação das espécies que são atraídas a corpos de animais em decomposição, incluindo humanos, mas os inventários faunísticos ainda são diminutos (Pujol-Luz *et al.* 2008; Vasconcelos & Araújo 2012). O conhecimento das espécies envolvidas no processo de decomposição é o primeiro passo para uma efetiva utilização dos insetos como ferramenta para resolução de crimes (Barros *et al.*, 2008)

Atualmente pode-se verificar, no Brasil, um interesse crescente na pesquisa em entomologia forense, contemplando aspectos biológicos, ecológicos e taxonômicos, dando uma maior precisão na estimativa do intervalo pós-morte entre outras aplicações. (Moura *et al.*, 1997; Thyssen, 2005).

Do total de insetos encontrados em carcaças, cerca de 60% é representado por dípteros, destacando-se entre eles os califorídeos, os sarcófagídeos e os muscídeos (Payne, 1965; Greenberg, 1991). Exemplares destas famílias possuem boa representação quando se fala em sucessão, já que constituem as fontes mais comuns de evidências coletadas durante a investigação criminal (Wells e Sperling 2001; Oliveira-Costa 2008).

Com cerca de um milhão de espécies descritas no mundo e 100.000 no Brasil, os insetos constituem o grupo mais diversificado de organismos no planeta, representando cerca de 60% de todas as espécies conhecidas (Carvalho 2012; Rafael *et al.* 2012). Mais de mil espécies podem ser encontradas em um jardim ou quintal e suas populações podem chegar a milhões por hectare (Tripplehorn & Johnson 2005).

Os Dipteras são encontrados desde o limite norte das terras do Ártico até o sul das ilhas próximas à costa da Antártica (Vockeroth 2002); Eles fazem parte das quatro ordens megadiversas de insetos holometábolos e é a melhor inventariada. Em compensação, o número de espécies descritas ainda deixa a desejar da real diversidade, devido a ausência de descrição de espécies em algumas regiões. A estimativa é que haja em torno de 400.000 espécies no mundo e 60.000 no Brasil (Carvalho *et al.* 2012).

Os dípteros estão divididos em duas subordens, a que reúne todos os mosquitos e as moscas com longas antenas, chamadas de Nematocera, e aquela que reúne as moscas robustas e compactas com antenas curtas, denominadas de Brachycera. Na subordem Brachycera, estão as espécies necrófagas das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Fanniidae e Stratiomyidae, que representam os insetos de maior relevância forense (Fontoura *et.al.*, 2009; Gennard, 2012).

Os dípteros são insetos que apresentam apenas um par de asas transparentes com nervuras, localizadas anteriormente. As asas posteriores foram transformadas em estruturas menores denominadas balancins ou halteres, úteis na estabilidade durante o voo. Os indivíduos dessa ordem podem variar muito de estilo de vida e tamanho. O tamanho é uma característica importante no estudo

de moscas necrófagas (que se alimentam de matéria orgânica em decomposição), já que são atraídas pelo odor que o vento leva até elas; isso indica que precisam voar contra o vento para alcançar o corpo (Turner, 1987). Os imaturos (ovos e larvas) dos dípteros necrófagos, que também podem apresentar comportamento predador e canibal, são os principais responsáveis pela perda de massa da carcaça durante o período de decomposição. Por serem pecilotérmicos, sua taxa de desenvolvimento aumenta com o aumento da temperatura (Gomes, Zuben, 2005; Gennard, 2012).

A família Calliphoridae é composta por mais de 1000 espécies (Byrd e Castner, 2001) e engloba as espécies mais importantes capazes de fornecer informação relativa a determinação do IPM. Estas espécies são atraídas por matéria orgânica em decomposição e por excrementos, constituindo assim os primeiros insetos a localizar e colonizar cadáveres. As larvas desta família são caracterizadas pela sua capacidade energética e voracidade, pois secretam fluídos digestivos que contêm enzimas proteolíticas que facilitam e aceleram a decomposição dos tecidos.

A família Calliphoridae compreende as moscas varejeiras de coloração escura com reflexos metálicos no abdome em verde, azul ou violeta (Carvalho e Ribeiro, 2000). De acordo com Amorim *et al.* (2002), ocorrem na região Neotropical 28 gêneros e 126 espécies de califorídeos. Destas, são encontradas no Brasil 36 espécies endêmicas, das quais 17 espécies apresentam interesse forense (Mello, 2003; Carvalho e Mello-Patiu, 2008). Os adultos desta família são sinantrópicos e extremamente ágeis. Apresentam três instares larvais e suas larvas são vorazes e essencialmente necrófagas, podendo se desenvolver

também em material orgânico em decomposição, e mais raramente em tecido animal vivo, onde realizam parasitismo (Oliveira-Costa, 2011; Rosa, *et al.*, 2011).

De distribuição praticamente mundial, colonizam habitats urbanos e rurais, sendo muito comum a sua presença em cadáveres humanos. Costumam ser os primeiros membros da entomofauna a visitar a carcaça em decomposição, sendo, portanto, os indicadores forenses mais exatos do tempo de morte de um cadáver (Nuoerteva, 1977). No Velho Mundo, as moscas do gênero *Calliphora*, *Lucilia* e *Chrysomya* são consideradas as espécies mais importantes e freqüentes em cadáveres.

A família Sarcophagidae compreende 2.600 espécies que, na fase adulta, apresentam morfologia externa bastante uniforme, o que dificulta sua identificação (Amorim, 2009). São representados por moscas de grande porte, que apresentam coloração cinza, olhos vermelhos, três faixas pretas longitudinais no dorso do tórax e abdome xadrez cinza brilhante. São espécies de difícil identificação, diferenciando-se principalmente por meio da genitália masculina. São larvíparos, ou seja, realizam a postura de larvas já em primeiro instar, e de acordo com alguns autores têm preferência por estágios mais avançados da decomposição (Carvalho; Linhares, 2001; Gennard, 2012).

Os indivíduos desta família são frequentemente observados em habitats interiores ou em condições adversas que impossibilitam o voo a outros insetos. Por esta razão, encontram-se entre os primeiros insetos a localizar restos cadavéricos, logo a seguir aos indivíduos da família Calliphoridae. Os adultos são atraídos, preferencialmente, por substâncias adocicadas, embora possam também ser encontrados associados aos primeiros e últimos estádios de decomposição. As larvas são fortemente atraídas por matéria em putrefação.

Representantes da família Muscidae estão presentes em todas as regiões biogeográficas e compreendem cerca de 4.500 espécies descritas distribuídas em 173 gêneros (Carvalho *et al.* 2005). Na região Neotropical são reconhecidos 84 gêneros e 840 espécies (Carvalho e Couri 2002); existindo no Brasil 20 espécies de muscídeos de interesse forense (Carvalho e Mello-Patiu 2008). Os muscídeos em geral são cosmopolitas e apresentam alto grau de sinantropia, sendo encontrados em praticamente todos os tipos de ambiente. São moscas que podem variar de pequenas a grandes, de cor negra, acinzentada, amarelada ou ocasionalmente verde ou azul metálica (Oliveira-Costa , 2011).

Tanto os califorídeos quanto os muscídeos ovipõem sobre matéria orgânica em decomposição, utilizando este substrato como fonte proteica para si ou para o desenvolvimento das fases imaturas. Pelo fato de os sarcófagídeos serem ovovivíparos e depositarem larvas de primeiro instar nas carcaças, parecem apresentar um pioneirismo na sucessão (Byrd e Castner 2001).

1.2 Sucessão Entomológica

A composição da comunidade de artrópodes relacionada ao padrão de sucessão esperado nos corpos, habitualmente, é utilizada para estimativa de intervalo pós-morte nos corpos em adiantado estado de decomposição. Deve-se considerar, porém, os diversos fatores presentes na cena do crime que podem retardar ou acelerar a sucessão. Nos estágios iniciais de decomposição, bastam as técnicas usuais de cronotanatognose e o tempo de desenvolvimento dos insetos imaturos. Neste caso, o padrão de sucessão serve como um indício a mais do tempo de morte. Contudo, quando o processo de decomposição

encontra-se adiantado e os outros métodos falham, esse método é o mais acurado (Oliveira-Costa, 2003).

No processo de decomposição, o corpo irá servir de alimento e/ou abrigo para uma sucessão de diferentes espécies de insetos. As moscas Calliphoridae, por exemplo, predominam no início da decomposição do cadáver, mas quando o corpo já está em um estado avançado de decomposição, os besouros é que predominam (Gomes, Zuben, 2004). Segundo Torrez (2006) a morte leva a uma perda de temperatura do corpo, a qual se equilibra com a do meio ambiente em 24 horas, desde que a temperatura não seja muito reduzida. Surge a palidez não só no pescoço, mas também em outras partes, já no decorrer da primeira hora, ao passo que a rigidez cadavérica se instala por completo transcorrido um tempo de aproximadamente sete horas para depois desaparecer como as circunstâncias entre dois a quatro dias. Neste momento as primeiras ondas de moscas começam a chegar ao corpo. As fêmeas contendo ovos chegam ao corpo, aspiram o sangue e outras secreções que saem dos orifícios naturais e realizam a postura. Desta forma inicia-se o desenvolvimento da fauna cadavérica, que passa por períodos distintos: o primeiro período é o Sarcófágico, no qual os dípteros se enquadram e dura até o 3º mês, o segundo período é o Dermesteriano, com a participação de coleópteros e traças e dura do 3º ao 4º mês, o período seguinte é o Silfiano, sendo encontrados dípteros e coleópteros e dura do 4º ao 8º mês e o último período é o Acariano Torrez (2006), no qual os ácaros atuam e dura do 6º ao 12º mês.

1.3 Fenômenos Cadavéricos

Segundo Carvalho (2010), transcorrido o exato momento da morte iniciam-se os chamados fenômenos abióticos consecutivos e transformativos que indicam a realidade da morte e por meio deles pode-se calcular o tempo em que ocorreu o óbito. Esses fenômenos são:

Desidratação cadavérica ou evaporação tegumentar, na qual ocorre a perda de água ao longo da superfície da pele do cadáver e se caracteriza pela diminuição do peso. A pele desseca e endurece. Essa fase está relacionada com IPM determinado para as primeiras 24 horas. Segundo Silva (2005) a espécie *Chrysomya megacephala* é a espécie encontrada da fase fresca até a fase de restos, com maior concentração na fase de deterioração e nos estágios iniciais das fases de massa.

Resfriamento corporal ou “algor mortis”, é a fase na qual a temperatura cai e tende a se equilibrar com o meio ambiente progressivamente e sem uniformidade. A velocidade de resfriamento é mais lenta em obesos e em vítimas em ambientes fechados, sem circulação de ar; tende a ser mais rápida em crianças e velhos e em vítimas com grande hemorragia. A espécie *Chrysomya albiceps* foi relacionada com a fase final do estágio fresco até a fase de restos e também com maior concentração na fase de deterioração (Silva, 2005).

Após a morte o corpo começa a passar por transformações devido às desordens bioquímicas decorrentes da morte celular. Com a baixa do pH intra e extracelular, as membranas celulares se rompem e os tecidos se desintegram. Com a ação de microrganismos e suas toxinas ocorre a putrefação, que está dividida em fases. O tempo de duração varia de acordo com fatores intrínsecos

(idade, causa da morte, dentre outros) e extrínsecos como a temperatura e umidade. Ainda, a denominação e quantidade de fases também variam de acordo com o autor. A espécie *Cochliomya macellaria* que foi relacionada com a fase fresca até o começo da fase de restos, tendo uma maior concentração de exemplares nos estágios de inchamento e deterioração (Silva, 2005).

Muitos autores, a fim de categorizar os estágios de decomposição em diferentes localidades e circunstâncias, propuseram uma divisão do processo de decomposição que melhor representasse as condições ambientais apresentadas, como Mégnin (1894), na França, que dividiu a decomposição cadavérica em oito estágios; Payne (1965), nos Estados Unidos, em seis; Bornemissza (1956), na Austrália, em cinco; Jirón e Cartin (1981), na Costa Rica, reconheceram quatro e Rodriguez e Bass (1983), nos Estados Unidos, distinguiram cinco, os quais são diferentes dos citados por Bornemissza (1956).

Fase da coloração – começa com o aparecimento de uma mancha verde no baixo ventre, local do organismo no qual ocorre o acúmulo de gases. Ocorre o descoramento e inchamento da face, escroto e vulva. Bornemissza (1956). Acontece entre 18 e 24 horas e se estende por todo o corpo depois do 3º ao 5º dias.

Fase gasosa – Então os gases inflam, e os tecidos promovem a liberação de sangue escumoso e fétido pelos orifícios naturais do corpo. Também aparecem bolhas na pele e a vascularização fica visível. Atinge o máximo em 96 horas. Pela Lei de NYSTEN-SOMMER, a rigidez se manifesta primeiro na face, na mandíbula e no pescoço, seguindo-se os Membros Superiores (MMSS), o tronco e, finalmente, os Membros Inferiores (MMII); desaparecendo na mesma

ordem (Croce, D.; Júnior, C. D. 2009). Os gases de putrefação aparecem na seguinte ordem:

1º dia: gases não inflamáveis;

2º ao 4º dia: gases inflamáveis;

5º dia em diante: gases não inflamáveis;

Fase coliquativa – A pele se rompe e as partes moles começam a desmanchar reduzindo o volume pela desintegração. Pode durar de um à vários meses.

Fase de esqueletização – Entre a 3ª e 4ª semana, os ossos vão ficando expostos.

Ainda que a maioria dos insetos necrófagos, quando no estágio adulto, possa ser identificada morfolologicamente, a identificação de estágios imaturos é muito complicada e, às vezes, impossível (Schroeder *et al.* 2003; Wells e Stevens 2008). Caracteres diagnósticos para imaturos de diversas espécies de dípteros de interesse forense são poucos e, às vezes, inexistentes (Wells e Stevens 2008). Na Figura 1 está demonstrado o diagnóstico da espécie baseado nas características morfológicas e anatômicas do espécime pode não ser de grande utilidade na distinção de estádios imaturos, seja devido a estes, não raras vezes, serem morfolologicamente indistinguíveis, seja devido à inexistência de chaves para a classificação desses imaturos.

Figura 1: Fases de desenvolvimento dos dípteros de interesse forense.

https://www.google.com.br/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=4R8xTgWqcE6ktM&tbnid=ohsM4_S75oi9yM:&ved=0CAUQjRw&url=http%3A%2F%2Fwww.fgsc.net%2F2000compendium%2F2000appendix4.html&ei=_knDU4WZKaXesASUooKQAw&bvm=bv.70810081,d.cWc&psig=AFQjCNEaBfkOFoT19wowuVlsDqFGMcdoDQ&ust=1405393251943772

Ovos



Larvas



Pupas



Adultos



Ciclo de vida completo de díptero



Embora a utilização do DNA na caracterização destes estágios já exista na literatura científica, não só para insetos adultos e larvas, mas também para pupários vazios (Mazzanti, 2010), ainda existe a necessidade da criação das formas imaturas até a emergência dos adultos para uma correta identificação taxonômica. Em casos criminais, a rápida determinação do IPM é crucial para a investigação. Frequentemente, não há tempo hábil para a criação das larvas até o estágio adulto e os exemplares podem morrer antes que a identificação em nível específico ocorra, acarretando a perda de evidências criminais importantes (Litjens *et al.* 2001; Schroeder *et al.* 2003). Isto ressalta a importância de uma rápida identificação das espécies encontradas no cadáver para agilizar o processo de reconhecimento do IPM. Uma solução para esses questionamentos é a integração entre Biologia Molecular e Entomologia Forense.

As várias técnicas empregadas pela Biologia Molecular conseguem identificar os exemplares em nível específico de forma rápida e confiável por meio de protocolos padrões, sem que se exija um profundo conhecimento de Taxonomia por parte dos peritos criminais, e podem ser empregados em qualquer estágio de desenvolvimento e estado de preservação desses insetos (Oliveira-Costa *et al.*, 2007).

1.4 O Código de Barras da Vida

O BOLD é um banco de dados administrado pelo *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL). O CBOL teve seu início em maio de 2004 e já inclui mais de 120 organizações de 45 nações. Ele é responsável por promover o desenvolvimento da Aliança Internacional de Pesquisa, a qual objetiva construir, nos próximos 20 anos, uma biblioteca *barcode* para todos os eucariotos vivos, iniciando com as 1,7

milhões de espécies catalogadas até então e posteriormente inserindo as espécies ainda desconhecidas cuja previsão é que variem entre 10 e 20 milhões de espécies (Ratnasingham, 2007). Uma campanha global, iniciada já em 2004, objetiva realizar sequenciamento do código de barra de todas as aves e peixes conhecidos até 2012 (Marshall, 2005). Assim, diante desse cenário de grande biodiversidade e perigo de sua perda, um método rápido e padronizado que auxilie na caracterização dessa biodiversidade é de grande valia. Diante desse cenário que o “Código de barras de DNA” ou DNA Barcoding foi proposto (Hebert et al. 2003). Este pressupõe que um pequeno fragmento de DNA pode ser utilizado como identificador padronizado e único, tal como, um código de barras para identificação de espécies já descritas como auxiliando na descoberta de novas espécies, uma iniciativa internacional que visa o desenvolvimento de um sistema universal para a identificação de todos os seres eucarióticos baseado em uma abordagem molecular padronizada (Miller, 2007).

O DNA Barcode emprega uma região de 648 pares de bases do gene mitocondrial citocromo oxidase Subunidade I (COI). O gene COI codifica parte de uma enzima terminal de cadeia respiratória da mitocôndria (posições 58-705 no final da porção 5', tendo como referências o genoma mitocondrial de *Mus musculus* Linnaeus, 1758) e tem como premissa que toda espécie deve apresentar um código de barras único e que a variação interespecífica é bem mais elevada que a intra-específica (esta de até 3%) (Hebert et al., 2003a). Os objetivos do código de barras são possibilitar a identificação de espécimes em nível específico e facilitar a descoberta de novas espécies.

A proposta é de que qualquer pesquisador, onde quer que esteja, seja apto a identificar com rapidez e eficiência a espécie, independente das condições de preservação da mesma (Stoeckle *et al.*, 2005).

De acordo com Bolzan (2011) outras vantagens apresentadas pelo uso da técnica de DNA barcode são: (1) o fato de se poder identificar espécies a partir de pequenas quantidades de tecido, já que o DNA mitocondrial está disponível em maior quantidade que o DNA nuclear e é mais dificilmente degradado; (2) não se alterar nos diferentes estágios de vida dos indivíduos, o que ocorre no uso da morfologia como critério de identificação taxonômica e (3) permitir a rápida identificação das espécies, inclusive as crípticas.

A escolha de um marcador mitocondrial tem sido comumente empregada em estudos filogenéticos, já que o mesmo evolui mais rapidamente que o DNA nuclear, de modo a acumular um maior número de diferenças, de cinco a dez vezes mais que genes nucleares (Stoeckle *et al.*, 2005), sendo informativo mesmo quando espécies próximas são comparadas (Hebert *et al.*, 2004).

O DNAm_t possui transmissão de origem materna e, assim, a observância da molécula de DNA mitocondrial também permite a identificação de genes herdados pela mãe. O elevado número de cópias de DNAm_t por célula, torna a amplificação mais efetiva e a sua forma circular reduz a tendência à degradação (Cainé, 2010; Craven *et al.*, 2012). Acumulam mutações cerca de 10 vezes mais rapidamente que o DNA genômico e as regiões hipervariáveis evoluem ainda mais rapidamente sendo úteis, portanto, no estudo de acontecimentos recentes e nas investigações de marcadores espécie-específicos (Torres *et al.* 2010).

O DNA mitocondrial (DNAm_t) é ainda uma ferramenta muito usada para a identificação/separação de espécimes, por ser haplóide, o que faz com que haja

mais robustos e menores taxas evolutivas. Além disso, há que se destacar que, pelo menos em animais, o COI apresenta o maior número de sequências disponíveis (Hajibabaei et al., 2007).

A caracterização da subunidade I do gene mitocondrial Citocromo Oxidase (COI) é aplicada extensamente na obtenção de dados de identificação espécie-específicos (para espécies de importância forense ver Sperling *et al.*, 1994; Malgorn e Coquoz, 1999; Wallman e Donnellan, 2001; Harvey *et al.*, 2003; Zehner *et al.*, 2004; Saigusa *et al.*, 2005; Wells *et al.*, 2007).

Os maiores obstáculos encontrados na completa aplicação do DNA Barcode, são os grupos com baixa diversidade genética em suas sequencias, além de resolução de espécies que divergiram recentemente, detecção de híbridos e os pseudogenes nucleares (Numts) (Stoeckle *et al.*, 2005).

Além disso, Yassin et al., (2010) e Bolzan (2011) apontam como fatores que podem restringir a utilização do DNA barcode (1) a possibilidade de não se conseguir identificar novas espécies que divergiram recentemente já que ainda não acumularam maiores níveis de diferenciação; (2) casos em que as variações intra e interespecíficas se sobrepõem em espécies não monofiléticas.

1.5 Banco de Dados

De acordo com Prosdocimi e colaboradores (2010), os bancos de dados são considerados coleções de dados interrelacionados, organizados a fim de suprir a necessidade de um grupo específico de aplicações e usuários.

O *International Nucleotide Sequence Database collaboration* (INSDC) é um grupo do qual três bancos de dados colaboradores participam: o *DNA Data Bank of Japan* (DDBJ), o *European Nucleotide Archive* (ENA) do *European*

Bioinformatics Institute (EMBL – EBI) e o *GenBank* do *US National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Galparin, 2011).

O *GenBank* é um dos principais bancos primários – que envolvem submissão direta de sequências de nucleotídeos, de aminoácidos ou estruturas proteicas. Constitui-se de um banco de dados público de sequências de nucleotídeos e proteínas, formulado e distribuído pelo *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (Benson *et al.*, 2002). Em 2010 o *GenBank*, contava com 500 bilhões de perfis consistindo de 50 trilhões de pares de bases (Leinonem *et al.*, 2010).

Os dados encontrados no *Genbank* podem ser originários tanto de pesquisadores individuais, que submetem dados diretamente para uma das bases de dados, quanto de submissões em grandes volumes de Centros de pesquisas.

No *GenBank* pode-se encontrar a família de programas *Blast*, que localiza o melhor alinhamento entre uma sequência “*Query*” (sequência consulta) e sequências da base de dados, ferramenta mais utilizada neste trabalho.

1.5.1 BOLD – Barcode of Life Data Systems

O BOLD é um banco de dados administrado pelo *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), lançado em maio de 2004 já com mais de 120 organizações de 45 países. O CBOL é responsável por promover o desenvolvimento de uma biblioteca *barcode* para todos os eucariotos vivos. A princípio iniciando com as espécies catalogadas até então (cerca de 1,7 milhões) e posteriormente inserindo as espécies ainda desconhecidas (entre 10 e 20 milhões previstas) (Ratnasingham, 2007).

Embora o BOLD realize a montagem dos dados *barcode* e as mantenham armazenadas, uma cópia de todas as sequências e dados de espécimes chaves também migram para o NCBI ou outros bancos (EMBL e DDBJ) logo que os resultados estejam prontos para a consulta pública.

Como já mencionado, o *barcode* emprega uma região de 648 pb da sequência do COI como padrão para o código de barras; vários estudos demonstraram a efetividade dessa sequência na identificação de mais de 95% das espécies animais (Herbet, et al., 2009). Para o processo de identificação de novas espécies é escolhido um limiar para separar as variações intraespecíficas das interespecíficas (Whitworth et al.; 2007). Neste caso (Hebert et al.; 2003) propuseram um limiar de 3% para insetos sendo que acima dessa porcentagem é considerada uma nova espécie. Tem-se conhecimento hoje de pesquisadores que consideram um limiar específico para cada grupo (Lefebure et al.; 2006 e Costa et al.; 2007). Apesar disso, alguns obstáculos ainda ocorrem, tais como: não há unanimidade na afirmação de que um simples e único segmento de DNA possa servir de padrão para todas as espécies animais, como por exemplo, os cnidários e as plantas que já se tem praticamente certo que não podem ser rastreadas pelo gene COI, sugerindo-se o uso dos genes de cloroplastos (Marshall, 2005; Hebert et al., 2010).

Para insetos o gene COI tem sido amplamente utilizado por pesquisadores, tais como Hebert et al. (2004) para Lepidoptera, Yassin et al. (2008), Pradeep Kumar et al. (2013) e Rolo et al., (2013) para Diptera, Yassin et al. (2009) para Orthoptera e demonstrado a efetividade do uso desta sequência na identificação das espécies. Por outro lado, Meier e colaboradores (2006) consideram que o uso do gene COI não é uma boa ferramenta na identificação de Diptera. Embora

alguns autores achem que o COI não seja uma boa ferramenta, devido a algumas limitações, ele tem sido considerado sim uma ferramenta de muita eficácia nos trabalhos de identificação forense. Além do fator tempo, é importante destacar que a execução da taxonomia por meio de técnicas baseadas no uso de características morfológicas apresentam algumas importantes limitações como: plasticidade fenotípica e variabilidade dos caracteres empregados, podendo levar a identificações incorretas; taxóns crípticos, comuns em muitos grupos e regiões podem ser agrupados muitas vezes erroneamente as chaves morfológicas costumam ser eficientes apenas para alguns estágios do ciclo de vida ou para apenas um dos sexos (Hebert, et al 2003; Hebert .; et al 2004; Valentini.; et al, 2008; Yassin et al 2008). As chaves dicotômicas geralmente requerem um alto nível de especialização e entendimento para a correta aplicação o que aumenta a frequência de erros associados a essas identificações. Essas limitações acima elencadas tornam o uso da tecnologia do Barcode uma ótima ferramenta para resolver o problema da identificação de espécies quando seus caracteres morfológicos apresentarem alguma limitação (Valentini,et al 2008, Packer.; et al 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo

Diante de todo o exposto na introdução, existe hoje no Estado de Mato Grosso, em especial Cuiabá e mais precisamente na Perícia Criminal, uma lacuna em relação a identificação da fauna cadavérica e dados mais consistentes que possam embasar laudos criminais. Desta forma o objetivo geral do trabalho é enumerar a sucessão de espécies entomológicas nas diferentes fases durante a decomposição.

- Padronizar a metodologia de seqüenciamento de DNA mitocondrial e identificar espécies através da comparação de seqüências de genes mitocondriais para uso na investigação de *intervalo pós-morte*;
- Criar um banco de dados (DNA BARCODE) com as principais espécies dípteros de importância forense, da região Cuiabá, auxiliando desta forma as investigações criminais, fazendo com que esse processo seja agilizado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento

O experimento foi realizado na área pertencente à POLITEC- Perícia Oficial de Identificação Técnica (SEJUSP - MT). Como substrato foram utilizadas carcaças de suínos (*Sus domestica* L.) acondicionadas em gaiolas metálicas (60 x 90 x 45 cm de altura) até a completa decomposição das mesmas.

Os animais utilizados no experimento tinham entre 10 e 13 Kg, e foram doados recém-mortos por um criador local. Foram feitos quatro experimentos, um para cada estação do ano: primavera, verão, outono e inverno entre janeiro de 2010 até o final de dezembro de 2011. O clima na região é tropical quente sub-úmido, com verões variando entre 25°C e 40°C e inverno podendo chegar a 17°C. A primavera e outono são instáveis.

Foram observadas as fases de decomposição até a completa esqueletização. Os estágios de decomposição foram definidos da seguinte forma: fase fresca, cromática, enfisematosa, coliquativa e esqueletização.

As carcaças foram monitoradas todos os dias às 09:00h da manhã, até que ocorresse a decomposição total do indivíduo, e as coletas do material larval foram realizadas de 3 em 3 dias. Nos dias de coletas essas foram feitas com uma colher de sopa e em três partes diferentes do animal (cabeça, abdômen e coxa traseira) sempre nesses mesmos lugares.

Parte dos exemplares coletados foi transportada viva ao laboratório de Entomologia Forense da POLITEC, onde completaram seu ciclo de desenvolvimento para identificação morfológica dos indivíduos adultos, por um

taxonomista usando chaves de identificação para estudos posteriores de montagem de banco de dados de adultos. Outra parte foi acondicionada em potes plásticos contendo pó de serra onde não receberam alimentação por três dias. Após este período foram passadas em água e acondicionadas em vidros com etanol 96%. Parte desse material foi guardada em freezer a -20 °C, parte foi guardada como material testemunho e parte usada nos processos de extração de DNA.

3.2 Extração do DNA

As extrações foram feitas a partir do indivíduo inteiro, como segue: em um recipiente fazer o Mix com 60µl de EDTA (C = 0.5M; pH 8.0) e 250µl de Solução de Lise de Núcleo por amostra. Distribuiu-se o Mix nos eppendorfs grandes e as larvas foram maceradas. Adicionou-se 10µl de Proteinase K (20mg/ml) à solução e agitar. Foi deixado em banho-maria a 65°C durante 2 horas. Opcional: Acrescentou-se 1,5µl de solução de RNase à solução, misturando a amostra invertendo o tubo 2-5 vezes. Incubar a solução a 37°C por 30 min. Deixar a amostra resfriando à temperatura ambiente por 5 minutos. Com a amostra a temperatura ambiente, colocou-se 100µl de Solução de Precipitação de Proteína (Promega) e misturado no vortex durante 20 segundos. A amostra foi resfriada no gelo por 5 min. A amostra foi centrifugada durante 10min a 13.000-16.000 x g. A proteína formou um *pellet* branco. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um eppendorf grande contendo 300 µl de isopropanol (temperatura ambiente) e misturar a solução, invertendo os tubos. Centrifugar a amostra durante 2min a 13.000-16.000 x g. O DNA formou um *pellet* branco. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente. Foi colocado 300µl de Etanol 70% e

invertido gentilmente o tubo várias vezes para lavar o DNA. A amostra foi centrifugada durante 2min a 13.000-16.000 x g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e colocar em banho-maria (40°C) durante 30min para evaporar o álcool. Foi adicionado ao tubo 60-100ul de H₂O Mili-Q autoclavada; a amostra foi incubada a 4°C (ou temperatura ambiente) overnight. A amostra foi agitada no vortex rapidamente as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e em seguida estocadas em freezer.

3.3 Amplificação

“A região de DNA mitocondrial utilizada foi a porção final da citocromo c oxidaseP subunidade I (COI), correspondente à região do DNA Barcode (Herbert *et al.*, 2003a). Este segmento foi amplificado através do conjunto de iniciadores LCO1490-L e HCO2198-L (Nelson *et al.* 2007), como mostra a Tabela 1. Foi realizada a amplificação utilizando: 40 ng de DNA; 25mM de dNTP; 20 mM de cada iniciador, 2,5 U de Taq e 3-4 mM de MgCl₂”. Seguindo protocolo utilizado por Kosmann, C. (2009).

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a amplificação e sequenciamento da citocromo c oxidase subunidade I (COI). Codificação dos nucleotídeos segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) (A= adenina; T = timina; C=citosina; G=guanina; W = A ou T; R = A ou G).

Iniciador	Posição	Sequência	Autores
LCO1490-L	1490	GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG	Nelson <i>et al.</i> , 2007
HCO2198-L	2198	TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA	Nelson <i>et al.</i> , 2007

Os ciclos de temperatura do PCR consistiram em um passo de desnaturação inicial de 94°C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 46°C por 30 segundos, e alongação a 72°C por 2 minutos. O último ciclo foi seguido de uma incubação a 72°C por cinco minutos de alongação final (Nelson *et al.*, 2007.)

3.4 Sequenciamento

Os *amplicons* foram visualizados em eletroforese com gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo. Em seguida foram purificados seguindo protocolo baseado em polietilenoglicol (PEG) e estocados em freezer.

A reação de seqüenciamento foi feita com 40 ng de DNA; 1,6 µM do mesmo iniciador da PCR e kit específico de sequenciamento DYEnamic ET@ (Amersham). A amplificação foi realizada em um termociclador e os ciclos consistiram de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, anelamento a 50°C por 5 segundos e alongação a 60°C por 4 minutos (Nelson *et al.*, 2007)” (Kosmann, C. 2009). O sequenciamento foi realizado no laboratório Forense da Politec-MT utilizando o sequenciar modelo megaBACE 500.

3.5 Alinhamento

Para o alinhamento foi utilizada as sequências de consenso através do software Clustal W (Thompson *et al.* 1994), sendo utilizados os parâmetros *default* , conferidas e editadas manualmente.

Existem vários programas disponíveis para realizar o alinhamento e a comparação entre sequências biológicas, entretanto entre a comunidade forense os programas *ClustalW* (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e o *Blast* (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>.) são amplamente utilizados. As maiores vantagens são o fato de terem sido projetados para serem executados em plataformas com baixo custo computacional e também por incluírem técnicas para acelerar os processos de comparação. Por estes motivos, foram estas as ferramentas de eleição para a etapa de análises e submissão dos dados.

Quanto à região analisada, o alinhamento de sequências pode ser classificado em alinhamento global ou alinhamento local. No alinhamento global, as duas sequências devem ser alinhadas de um extremo ao outro, enquanto que no alinhamento local procura-se alinhar apenas as regiões mais conservadas, independente da posição relativa de cada região em relação à sua sequência. O *ClustalW* é uma ferramenta que se presta com excelência à tarefa de alinhamento global de múltiplas sequências, com alta velocidade nas análises (Tuimala, 2004).

A principal utilidade do *Blast* neste trabalho foi para a comparação entre uma sequência de nucleotídeos fornecida pelo usuário (*query*) com as demais contidas no banco de dados. A comparação das sequências ocorre por alinhamento par a par, onde cada par de letras semelhantes recebe um *score* que é determinado por uma matriz de *score*, na qual os valores são determinados empiricamente. Quando em uma sequência não houver *gap*, esta seria representada em um gráfico por uma linha diagonal contínua, caso contrário esta linha estaria interrompida uma ou mais vezes (Cruz, 2006).

3.6 Entrada dos dados nos bancos de dados

Uma vez obtida a sequência gênica da amostra questionada, foram realizadas as análises e edições necessárias para submissão da sequência à base de dados para a pesquisa de similaridade. Os dados brutos provenientes do sequenciador, chamado de base calling, normalmente são submetidos a um programa de base calling. Há vários programas de base calling, tais como o Bioedit e o Geneious. O arquivo base calling carrega os dados do sequenciador e a identificação da sequência gerada, atribuindo um valor de qualidade para cada posição do nucleotídeo. Cada tipo de sequenciador traz associado um programa de base calling, no entanto o mais comum deles é o programa PHRED.

De acordo com Prosdocimi et al. (2010) o PHRED interpreta dados de sequências a partir de arquivos SCF (standard Chromatogram Format), arquivos de cromatograma dos analisadores automáticos de DNA ABI e arquivos Mega Bace ESD; a partir dos dados brutos do sequenciador, reconhece-se, a sequência de nucleotídeos, atribuem-se valores de qualidade às bases constituintes e gera arquivo de saída contendo informações sobre o base call e os valores de qualidade.

As pontuações de qualidade inseridas nos arquivos de saída do PHRED representam a probabilidade logarítmica negativa em escala de erro de uma base call, de forma que, quanto maior o valor de qualidade do PHRED, menor a probabilidade de ter ocorrido um erro na identificação da base. Só para se ter um parâmetro, um valor de PHRED 20 para uma determinada posição nucleotídica significa que ela apresenta uma chance em 100 de estar errada e um valor de PHRED 30 representa uma chance em 1000 (Carmo, 2011). As sequências estão

em processo de deposição no genbank, de forma que os números de acesso ainda não estão disponíveis.

3.7 Sistemática Molecular

A sistemática molecular engloba uma série de abordagens de relações filogenéticas, que são inferidas a partir de macromoléculas dos organismos em estudo (Soltis e Soltis 2000).

Ainda que o objetivo do presente trabalho não seja a análise da filogenia das espécies de Diptera amostradas, mas sim a criação de um banco de dados que possibilite a rápida identificação dos espécimes presentes em cadáveres, a avaliação da sistemática molecular foi feita por meio da montagem de árvore filogenética e distância gênica.

Neste sentido, o projeto DNA barcode também não possui o objetivo de resolver relações filogenéticas, no entanto tais análises devem ser realizadas a fim de detectar grupos monofiléticos e, conseqüentemente, delimitação das espécies (Nelson et al., 2007).

Desta forma, a elaboração e análise de cladograma foram realizadas a fim de encontrar o monofiletismo entre as espécies que colonizam corpos em decomposição.

4 RESULTADOS

A primeira etapa do experimento foi realizada no período de maio a setembro que compreende o período de seca. A segunda etapa foi realizada no período de novembro a março, que compreende o período chuvoso. Não houve para as duas etapas, variações climáticas diferentes das médias anuais normais ocorridas para o região de Cuiabá. Para a primeira etapa, foram observadas que a temperatura e a precipitação pluviométrica foram maiores que as da segunda, que caracteriza-se por apresentar um clima mais úmido com temperaturas mais baixas.

Os tempos de duração nas duas etapas do experimento foram bem semelhantes. No período chuvoso, onde a temperatura é mais amena e a umidade é mais elevada proporcionou uma decomposição mais lenta dos tecidos moles da carcaça. Já no período de seca devido a temperatura muito elevada teve como consequência um processo mais acelerado pela fauna decompositora.

Foi extraído o material genético de 220 indivíduos, dos quais em 50% foi possível obter amplicons do gene COI. Deste total bem sucedido, 16 espécies puderam ser identificadas com o uso de sequências, em sua maioria, com 612pb. A distribuição das espécies está mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de espécies encontradas através da extração de DNA com uso de Barcode no processo de decomposição de *Sus scrofa*.

Família	Gênero	Espécie
Muscidae	Musca	M. domestica L.
	Ophyra	O. albuquerquei (Loper, 1985)
		O. aenescens (Wiedemann, 1830)
Calliphoridae	Sarconesia	S. chlorogaster (Wiedemann, 1831)
	Chrysomya	C. albiceps (Wiedemann, 1819)
		C. megacephala (Fabricius, 1794)
	Lucilia	L. cluvia (Walker, 1849)
		L. coeruleiviridis (Macquart, 1855)
		L. cuprina (Wiedemann, 1830)
		L. cuprina Hawaii (Wiedemann, 1830)
		L. eximia (Wiedeman, 1819)
		L. mexicana (Macquart, 1843)
		L. porphyrina (Walker, 1856)
		L. sericata (Meigen, 1826)
		L. thatuna (Shannon, 1926)
Sarcophagidae	Peckia	P. intermutans (Walker 1861)

Algumas amostras, durante o alinhamento, tiveram cortadas suas extremidades não sobrepostas e sequência consenso, a fim de manter a uniformidade e sobreposição das mesmas.

Com relação à distribuição das bases que compõem as sequências analisadas, o valor médio do percentual de bases A+T nas espécies amostradas foi de 69,3%, como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Tabela de frequência de bases purínicas e pirimidínicas nos segmentos do COI, para as espécies amostradas.

Espécies	T	C	A	G	Total de pb
C. megacephala	39,4	15,1	29,7	15,8	612,0
C. albiceps	38,8	15,8	29,6	15,8	612,0
L. cluvia	37,7	15,5	30,2	16,6	612,0
L. coeruleiviridis	37,4	17,0	29,2	16,5	612,0
L. cuprina	37,5	15,5	30,5	16,5	612,0
L. cuprina Hawaii	37,5	15,7	30,3	16,5	612,0
L. eximia	37,2	17,0	28,7	17,1	612,0
L. mexicana	36,1	18,0	29,2	16,7	612,0
L. porphyrina	35,6	17,6	30,3	16,5	612,0
L. sericata	37,8	15,3	30,5	16,3	612,0
L. thatuna	37,8	15,3	30,3	16,5	612,0
M. domestica	38,2	15,3	29,5	17,0	612,0
O. aenescens	36,1	18,0	29,2	16,5	612,0
O. albuquerquei	38,7	14,8	30,3	16,2	612,0
S. chlorogaster	39,3	14,4	29,7	16,6	612,0
P. intermutans	37,7	17,5	29,2	15,6	612,0
Média (%)	37,6	16,1	29,7	16,5	612,0

As análises filogenéticas não foram realizadas com o intuito de estimar as relações evolutivas que ocorrem entre as espécies e suas respectivas distâncias, ou o tempo de divergência que existe entre os clados, tendo como objetivo principal somente a separação das espécies em clados monofiléticos, já que esse tipo de análise, como também o projeto DNA *Barcode* não possui a finalidade de estabelecer relações filogenéticas entre as espécies (Saitou & Nei, 1987; Nelson *et al.*, 2007). Com o alinhamento das sequências obtidas do COI obteve-se uma matriz de 612pb (Anexo 2) para a maioria das espécies, a partir da qual foram realizadas análises de distância genética pelo método Tamura-Nei (Tamura *et al.*, 1993), como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Tabela de distância genética (em preto) e desvio padrão (em azul) das espécies analisadas.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	<i>C. megacephala</i>	-															
2	<i>C. albiceps</i>	0,100 0,017	- -														
3	<i>L. cluvia</i>	0,127 0,020	0,075 0,014	-													
4	<i>L. coeruliviridis</i>	0,097 0,017	0,045 0,011	0,044 0,010	-												
5	<i>L. cuprina</i>	0,100 0,017	0,045 0,011	0,080 0,015	0,050 0,012	- -											
6	<i>L. curpina</i> <i>Hawaii</i>	0,100 0,017	0,045 0,011	0,080 0,015	0,050 0,012	0,000 0,000	- -										
7	<i>L. eximia</i>	0,018 0,018	0,067 0,012	0,057 0,010	0,045 0,009	0,072 0,013	0,072 0,013	- -									
8	<i>L. mexicana</i>	0,119 0,019	0,061 0,012	0,049 0,011	0,046 0,011	0,075 0,014	0,075 0,014	0,025 0,005	- -								
9	<i>L. porphyrina</i>	0,124 0,020	0,057 0,012	0,094 0,015	0,069 0,013	0,062 0,013	0,062 0,013	0,087 0,015	0,095 0,016	- -							
10	<i>L. sericata</i>	0,094 0,016	0,040 0,010	0,081 0,015	0,045 0,011	0,005 0,003	0,005 0,003	0,073 0,013	0,075 0,015	0,062 0,013	- -						
11	<i>L. thatuna</i>	0,106 0,017	0,035 0,009	0,086 0,016	0,056 0,012	0,025 0,007	0,025 0,007	0,069 0,012	0,069 0,013	0,062 0,013	0,025 0,007	- -					
12	<i>M. domestica</i>	0,108 0,017	0,111 0,017	0,135 0,020	0,108 0,017	0,122 0,019	0,122 0,019	0,140 0,020	0,144 0,021	0,135 0,020	0,116 0,018	0,117 0,018	- -				
13	<i>O. aenescens</i>	0,085 0,015	0,126 0,019	0,145 0,021	0,112 0,018	0,109 0,018	0,109 0,018	0,131 0,019	0,130 0,020	0,132 0,021	0,103 0,019	0,121 0,019	0,114 0,017	- -			
14	<i>O. albuquerquei</i>	0,112 0,017	0,115 0,018	0,140 0,021	0,107 0,017	0,104 0,019	0,104 0,018	0,131 0,020	0,134 0,020	0,132 0,021	0,099 0,017	0,104 0,018	0,135 0,020	0,069 0,013	- -		
15	<i>P. intermutans</i>	0,134 0,020	0,121 0,019	0,145 0,021	0,121 0,019	0,127 0,020	0,127 0,020	0,130 0,019	0,129 0,019	0,133 0,019	0,121 0,019	0,117 0,019	0,163 0,023	0,142 0,021	0,122 0,020	- -	
16	<i>S. chlorogaster</i>	0,079 0,014	0,095 0,016	0,119 0,019	0,101 0,017	0,089 0,015	0,89 0,015	0,116 0,018	0,114 0,019	0,132 0,020	0,084 0,019	0,078 0,014	0,102 0,016	0,132 0,019	0,121 0,020	0,151 0,022	- -

A análise dos resultados obtidos proporcionou a verificação do padrão sucessório destas espécies no processo de decomposição de *Sus scrofa*. Assim,

na fase fresca houve o predomínio dos Calliphoridae, principalmente *Lucilia eximia*, seguida por *Chrysomya megacephala* e *Musca domestica*. Na fase seguinte, cromática, ocorreram *L. eximia*, *C. albiceps*, *Peckia intermutans*, *Ophyra aenescens* e *O. albuquerquei*. Na fase enfisematosa foram encontrados imaturos de *C. megacephala*, *C. albiceps*, *Peckia intermutans*, *Musca domestica*, *L. cuprina*, *L. sericata*, *L. cluvia*, *L. coeruleiviridis*, *L. mexicana* e *L. porphyrina*. Na fase coliquativa ocorreram *C. albiceps*, *C. megacephala*, *S. chlorogaster* e *M. domestica*. Na fase final de decomposição – esqueletização, pôde-se observar *M. domestica* e *C. albiceps*; além de outros insetos pertencentes a ordens como Coleoptera, Hemiptera e Dermaptera, predominam neste período (Tabela 5).

Tabela. 5. Distribuição de indivíduos de cada espécie, durante as diferentes fases de decomposição de *Sus scrofa*.

FRESCA	CROMÁTICA	ENFISEMATOSA	COLIQUATIVA	ESQUELETIZAÇÃO
<i>Lucilia eximia</i>	<i>L. eximia</i>	<i>C. megacephala</i>	<i>C. albiceps</i>	<i>Musca domestica</i>
<i>Chrysomya megacephala</i>	<i>C. albiceps</i>	<i>C. albiceps</i>	<i>C. megacephala</i>	<i>C. albiceps</i>
<i>Musca domestica</i>	<i>Peckia intermutans</i>	<i>Peckia intermutans</i>	<i>S. chlorogaster</i>	
	<i>Ophyra aenescens</i>	<i>Musca domestica</i>	<i>Musca domestica</i>	
	<i>O. albuquerquei</i>	<i>L. cuprina</i>		
		<i>L. thatuna</i>		
		<i>L. sericata</i>		
		<i>L. clúvia</i>		
		<i>L.coeruleiviridis</i>		
		<i>L mexicana</i>		
		<i>L. porphyrina</i>		

Figura 3. Fases de decomposição. Em A, fase fresca, em B, fase cromática, em C fase enfisematosa, em D, fase coliquativa e em E, fase de esqueletização.

A - Fase fresca



B – Fase cromática



C – fase enfisematosa



D – fase coliquativa



E – fase esqueletização



Com relação aos padrões sucessórios estabelecidos nas diferentes estações do ano, foi verificado que durante o período chuvoso compreendido entre novembro a março que a decomposição ocorreu em um intervalo de tempo maior quando comparado com o período de seca, compreendido entre os meses de abril a maio, mas que as espécies coletadas foram as mesmas; pôde-se avaliar que estes são extremamente semelhantes, havendo variação apenas no tempo transcorrido entre as fases fresca e de esqueletização. No período chuvoso a decomposição total ocorreu em doze dias. Por outro lado, no período de seca este processo foi mais acelerado, e a decomposição ocorreu, em média, em nove dias.

Foi observado que as espécies associadas aos estágios de decomposição, tiveram maior preferência pelas fases fresca e cromática. Na fase fresca, poucas espécies foram encontradas. Na cromática e na coliquativa a colonização foi mais evidente, *M. domestica* foi encontrada em quase todas as fases menos na cromática, contudo, não foi muito expressiva.

O. aenescens e *O. albuquerquei* foram atraídas na fase cromática. Nesse estágio, *C. albiceps* teve maior abundância. Na fase enfisematosa, foi observado que houve uma abundância no número de indivíduos, com a presença da maioria das espécies o que demonstrou que o mesmo apresenta uma maior atração, com a predominância de *L. clúvia*, *C. albiceps* e *C. megacephala*. Mesmo no período chuvoso os indivíduos tiveram um índice considerável, com a presença de *L. eximia*, *M. doméstica* e *C. megacephala*, o que também foi observado para o período chuvoso. Na fase fresca foi verificada a presença de *L. eximia*, *M. doméstica* e *C. megacephala*. O período coliquativo mostrou-se bastante atrativo

com aparecimento de um número expressivo de espécies. Na fase de esqueletização o número de espécies apresentadas foi bem reduzido, com a presença de *M. doméstica* e *C. albiceps*.

Quanto a presença de *C. megacephala* e *C. albiceps* foi muito frequente em quase todos os estágios de decomposição, só não foi verificada a presença de *C. megacephala* na fase cromática e de esqueletização, enquanto que *C. albiceps* não foi verificada na fase fresca e coliquativa. Das principais famílias de importância forense, Calliphoridae foi a mais abundante em número de espécimes capturados, sendo representados por 11 espécies: *S. chlorogaster*, *C. albiceps*, *C. megacephala*, *L. cluvia*, *L. coeruleiviridis*, *L. cuprina*, *L. eximia*, *L. mexicaa*, *L. porphyrina*, *L. sericata*, *L. thatuna*.

Dentre as três principais famílias de importância forense coletadas, Sarcophagidae quase não apresentou expressividade no presente trabalho, apenas uma espécie *P. intermutans*.

5 DISCUSSÃO

Os primeiros a utilizarem as diferenças de sequências de nucleotídeos na investigação das relações evolutivas foram Woese e Fox (1997), trabalhando com sequências conservadas de RNA ribossômico (Herbert *et al.*, 2009). No entanto John Avise (1987) foi o primeiro a reconhecer que as divergências na sequência de mtDNA fornecem um registro da história evolutiva dentro da espécie, interligando assim genética de populações e sistemática. Hoje, a análise genética em animais tem sido utilizada com vários objetivos, tais como em estudos do processo de especiação, análise de parentesco, identificação de registro de raça e identificação específica (Budowle *et al.*, 2005). O mais trivial para o sucesso na identificação de uma espécie, baseando-se em um banco de dados, é que sua sequência esteja depositada nesse banco para ser comparada. O Genbank, apesar de deter muitas sequências, estas decorrem de várias regiões do gene (Herbert *et al.*, 2004), o que pode levar a uma comparação entre regiões não homólogas. Inicialmente foi realizado no Genbank uma análise da abundância dos genes mitocondriais Cytb e COI das espécies aqui estudadas, com auxílio da ferramenta de busca do software Geneious v5.3.

Devido a existência de um impedimento taxonômico (identificação de imaturos através da taxonomia, o que pode incorrer em resultados errôneos), foi usada a técnica de DNA *Barcode* de identificação de seres eucarióticos, baseada na utilização de um fragmento padronizado da citocromo c oxidase subunidade I (COI), para a identificação de dípteros de interesse forense das famílias Calliphoridae e Muscidae, totalizando 16 espécies. A proposta, utilizando um valor de corte de 3% para diferenciação intra e (Hebert *et al.* 2003) interespecíficas,

mostrou-se válida para a identificação de dípteros de interesse forense: foram separadas das demais *Ophyra albuquerquei* e *O. aenescens*, bem como *Sarconesia chlorogaster*, *Lucilia thatuna*, *L. cluvia*, *L. porphyrina* e *L. caesar*. As diferenças entre os gêneros foram maiores que 3% em todos os casos, indicando a efetiva separação dessas espécies. Mas em alguns casos a monofilia das seqüências de DNA mitocondrial aqui analisadas não foi comprovada. Não foi possível a separação de *L. cuprina* e *L. sericata*, que se comportaram como pertencentes a uma mesma espécie, bem como *L. coeruleiviridis* e *L. mexicana*, que foram agrupadas como haplótipos diferentes de *L. eximia*.

A variabilidade gênica entre as espécies é, em parte, decorrente de eventos mutacionais que se acumulam ao longo do tempo. No caso das mutações pontuais, onde há troca de um único nucleotídeo por outro, a ocorrência de uma transversão (troca de uma base purínica por uma pirimidínica ou o inverso - C/T $\leftrightarrow$ A/G) é menos comum que a ocorrência de uma transição (troca de uma base purínica ou pirimidínica por outra do mesmo grupo - A $\leftrightarrow$ G / C $\leftrightarrow$ T) (Freese, 1959). Estimativas de tempo de divergência entre espécies são baseadas na taxa de substituição entre as linhagens, desta forma, é coerente esperar que haja maior similaridade entre indivíduos da mesma espécie que entre indivíduos do mesmo gênero. Diferentes estimativas de taxas de frequência têm sido estipuladas (Miyaki *et al.* 2010),

As diferenças interespecíficas variaram entre 13.6% para *L. mexicana* e *M. domestica* e 0.1% para *L. cuprina* e *L. cuprina Hawaii*. E na diferença intraespecífica, *L. eximia* tem diferenciação em mais de 3%. No dendograma estão representados apenas os valores suporte acima de 50%. O gene COI deu suporte para formação de clados importantes. Percebeu-se que os grupos

taxonômicos específicos ficaram geralmente bem separados. No grupo maior onde tem *L. eximia*; *L. mexicana*; *L. cluvia* e *L. coeruleiviridis* talvez seja necessário um estudo filogenético molecular incluindo mais genes mitocondriais e nucleares para consolidar esse resultado. Ainda assim, *L. mexicana*, *L. cluvia* e *L. coeruleiviridis* estão bem separadas e com alto índice suporte. A alta diferenciação em *L. eximia* provavelmente necessita uma revisão própria do grupo em estudos futuros.

Após estudar detalhadamente a decomposição de inúmeros cadáveres de vertebrados incluindo o de humanos, por mais de uma década, Freire (1921) pôde concluir que “é fácil compreender que não existe o exclusivismo de frequência do inseto em cada período da decomposição”. Isso pode ser verificado quando se observam os resultados deste estudo, o que, por sua vez, também destaca o fato de que as fases da decomposição não são cronologicamente precisas.

Qualquer inseto pode ter importância forense, dependendo das circunstâncias em que se encontram. Entretanto, com base em sua biologia, os insetos com maior potencial para a entomologia forense são aqueles que se criam em carcaças ou cadáveres (Catts & Goff 1992; Goff 2000; Byrd & Castner 2010).

Os Dípteros constituem, em conjunto com os Coleoptera, os principais insetos necrófagos, representando a maior porção da fauna encontrada durante os processos de decomposição cadavérica, o que foi observado por (Carvalho e Linhares 2001, Sukontason *et al.* 2004). Neste sentido, os dípteros Sarcophagidae, Calliphoridae e Muscidae têm sido comumente citados em estudos científicos a este respeito (Carvalho *et al.*, 2004, Rosa *et al.*, 2009), de forma que o presente trabalho corrobora tal dado.

Os adultos de califorídeos são os primeiros a colonizar as carcaças, devido à sua agilidade, e depositam seus ovos logo após a morte do animal. Assim como no presente trabalho, representantes desta família têm sido frequentemente encontrada por outros autores, como (Carvalho et al. 2000, Carvalho e Linhares 2001, Oliveira-Costa et al. 2001 e Souza et al. 2008).

Entre as espécies de Diptera encontradas em cadáveres humanos pelo país, sete já foram utilizadas como ferramenta complementar na elucidação de fatos durante inquéritos policiais, particularmente auxiliando na estimativa do IPM, são elas: *Chrysomya albiceps*, *C. megacephala*, *Cochliomyia macellaria*, *Hemilucilia segmentaria*, *Hermetia illucens* Linnaeus, 1758, *Ophyra aenescens* e *Paralucilia fulvinota* (Bigot, 1877) (Oliveira-Costa & Lopes 2000; Oliveira-Costa & Melo-Pattiu 2004; Pujol-Luz et al. 2006; Kosmann et al. 2011). Dentre essas, três estão presentes neste estudo, e são consideradas como sendo de maior relevância para a entomologia forense em Cuiabá-mt.

As espécies do gênero *Chrysomya*, *C. albiceps*, *C. megacephala* (Fabricius, 1794) e *C. putoria* (Wiedemann, 1818), foram introduzidas no país a partir da década de 1970 (Guimarães et al. 1978). Segundo Guimarães (1984), *C. putoria* foi a primeira a ser registrada, por volta de 1975, e as outras espécies foram registradas na sequência, de forma que até o final da década já tinham se espalhado por todo o país, chegando até o continente americano. Existem registros de *C. megacephala* até o sudeste dos Estados Unidos, nos estados da Georgia e South Carolina (Tomberlin et al. 2001). O registro mais recente de uma espécie do gênero no Brasil é o de *C. rufifacies* (Macquart, 1843), coletada no Maranhão (Silva et al. 2012). Prado e Guimarães (1982), advertiram que a presença dessas espécies indica que há um perigo maior do que aquele

representado por *Musca domestica*, com relação à transmissão de doenças entéricas.

Foi verificado nesse estudo, uma grande abundância de *C. albiceps* e *C. megacephala* que são reconhecidas na literatura por apresentar essa característica, isso foi observada em carcaças em decomposição no Brasil (Carvalho & Linhares 2001; Carvalho *et al.* 2000; Biavati *et al.* 2010). Oliveira & Vasconcelos (2010), em estudos feitos no Rio Grande do Norte, verificou a presença dessas espécies. No presente estudo elas também tiveram uma grande representatividade, e dessa forma elas consolidam sua importância para estudos forenses. Dentre as espécies coletadas, *L. eximia*, apresenta a maior distribuição geográfica, ocorrendo em quase todo Brasil, principalmente em ambientes naturais (Mello 1961). Normalmente, é encontrada em carcaças de animais e é uma das primeiras colonizadoras desse substrato (Grisales *et al.* 2010). Tal espécie, apresentou o mesmo comportamento no presente estudo. Biavati *et al.* (2010) registraram 22 indivíduos dessa espécie. De acordo com Moura *et al.* (1997), em Curitiba, Paraná, mesmo sob baixos níveis populacionais, *L. eximia* pode servir como uma espécie-chave na determinação do IPM.

No presente estudo foram registradas duas espécies da família Muscidae, *M. domestica* e *O. aenecens* em comum com o descrito por Rosa *et al.* (2011),

A presença de *M. domestica* e *C. megacephala* na fase fresca (primeiras 18h após a morte) foi relatada também por Carvalho *et al.* (2004), que trabalharam com padrão sucessório de insetos em porcos no estado de São Paulo. A presença de *L. eximia* nesta fase corrobora os dados obtidos por Souza e colaboradores (2008), assim como sua presença em todas as estações do ano.

A verificação da presença significativa de califorídeos na fase enfisematosa corrobora com Gomes e Zuben, (2004), que já propunham o seu uso como “relógio biológico” indireto, capaz de indicar quanto tempo transcorreu entre a morte e a descoberta do cadáver.

Em estudos realizados no Nordeste do Brasil, apenas, (Oliveira & Vasconcelos 2010, Farias 2012) registraram a presença de sarcófagídeos em estudos com foco forense. Os sarcófagídeos foram relatados por Barros e colaboradores (2008) no período que compreende as fases enfisematosa e coliquativa, de forma que sua presença na fase enfisematosa neste estudo corrobora os dados da literatura. Oliveira & Vasconcelos (2010) encontraram em cadáveres provenientes de alguns municípios de Pernambuco a presença de *O. riograndensis* e *R. belforti* em dois cadáveres. E em experimentos, com iscas, conduzidos no Instituto de Medicina Legal do Recife, Pernambuco, os autores registraram sete espécies, e no presente estudo somente *P. intermutans* mas que provavelmente ocorreu um erro nesta identificação.

Deve-se considerar que a fase enfisematosa, para o processo de decomposição na região de Cuiabá, corresponde ao terceiro dia pós-morte no período chuvoso e segundo dia no período de seca.

A decomposição mais acelerada no período de seca, quando comparada com o período de chuva, já havia sido observada por Carvalho e Linhares (2001) e por Fraga (2004), que justificam que isto ocorre em função da alta temperatura, além da umidade relativa do ar. No entanto, o período total de decomposição difere do encontrado pelos autores supra citados, que obtiveram valores em torno de 24 dias para o período chuvoso e 11 para o de seca.

Não se percebeu diferença na velocidade da decomposição entre os mesmos períodos climáticos nos dois experimentos. Entretanto, a decomposição foi dois dias mais lenta nos períodos chuvosos, quando comparada aos períodos de seca, especificamente na fase coliquativa. No período de seca, a fase pôde ser percebida apenas no Dia 4, ao passo que nos períodos chuvosos, a fase se estendeu até o quinto dia.

Foi constatada no presente estudo uma sobreposição de espécies, principalmente nas fases cromática, enfisematosa e coliquativa. Creão-Duarte *et al.* (2012) estudando a amplitude e a sobreposição de nicho de membracídeos, constatou que as espécies desenvolvem formas de se correlacionarem e explorarem recursos escassos, mesmo em ambiente adverso como na Caatinga.

Desta forma, é observado que essa sobreposição entre duas espécies não traduz, obrigatoriamente uma relação de competição. Ela pode refletir, de certa forma também, a coexistência das diferentes espécies com o uso do mesmo recurso. Os baixos valores de sobreposição de nichos podem refletir competição espacial pelo mesmo recurso, sobressaindo as espécies predadoras. (Schoereder & Coutinho 1991; D'Almeida & Almeida 1998).

O trabalho vem ao encontro da necessidade da perícia criminal do Estado de Mato Grosso em agilizar o processo investigatório, já que a utilização do Barcode democratiza e facilita as buscas pelas espécies, mesmo sendo imaturos ou fragmentos dos mesmos. A rápida identificação das espécies, a perfeita correspondência entre as espécies reconhecidas pelo uso do enfoque morfológico e as designações baseadas em DNA Barcode, o uso de pequenos fragmentos, fazem com que o uso dessa técnica seja cada dia mais empregada e foi a metodologia escolhida para a realização deste trabalho. É importante destacar

que para distinguir espécies de forma confiável, usando a análise do DNA só é possível se existir uma condição de monofilia recíproca para as espécies. Contudo, o uso da Biologia Molecular na Entomologia Forense deve se limitar a grupos com posição filogenética bem estabelecida, uma vez que erros na identificação podem levar à obstrução da justiça (Kosmann, 2009). É também imprescindível dispor de um banco de dados abrangendo amplas extensões geográficas para detectar variações entre populações, e conhecer a distribuição das espécies envolvidas (Wells et al., 2007). Além disso, o uso de ferramentas moleculares deve, sempre que possível, estar associado à Taxonomia clássica, bem como avaliar o maior número de marcadores possíveis para garantir identificação precisa das espécies.

O acréscimo de mais espécies exemplares daqueles oriundos do GenBank pode ajudar no esclarecimento de algumas dificuldades taxonômicas que foram encontradas no presente trabalho. Quando falamos em trabalhos que utilizam o *barcode*, esses devem, abranger a maior área possível, expandido inclusive um maior número de área e de espécies, para dar uma maior credibilidade aos resultados.

Entre varias justificativas do projeto *Barcode of Life*, uma delas é que, em 250 anos de existência, a taxonomia tradicional descreveu menos de 15% da diversidade animal do planeta. Os zoólogos justificam-se dizendo que esse progresso é lento porque a sistemática é uma ciência que possui uma complexibilidade, que não é tão simplista como a comparada em apenas 650 pb. Eles dizem que a metodologia do barcode é muito reducionista. Desta forma, uma espécie é caracterizada por um grupo de organismos que possui uma diferença entre os

seus nucleotídeos em um fragmento de 650 pb maior que 3% para com quaisquer outros grupos (Solé-Cava & Wörheide 2007).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível aplicar, de forma prática, a técnica de sequenciamento de DNA na identificação de dípteros de interesse forense

A aplicação de técnicas moleculares à rotina da Entomologia Forense encontra limitações, especialmente em relação à Taxonomia e Filogenia. Para vencer tal barreira é necessário incentivar estudos regionais para determinar variações inter e intra-específicas, aumentando os bancos de dados para permitir comparações, visto que os estudos desenvolvidos em outros países não podem ser diretamente aplicados no Brasil, por esse ser o país que apresenta maior diversidade do planeta, fato que também vale para a fauna associada a cadáveres.

A identificação proposta por Hebert e colaboradores (2003a), que se baseia num fragmento padronizado da COI, mostrou-se de fácil amplificação e sequenciamento utilizando iniciadores universais, o que pode promover a rápida geração de dados de *barcode* e a imediata identificação das espécies. Essa metodologia foi eficiente na identificação das espécies de dípteros utilizadas no presente trabalho.

É necessário promover uma aliança entre a taxonomia e a Biologia molecular, fazendo com que essa ferramenta desempenhe um papel importante em prol de um bem maior que é ajudar a sociedade na identificação e talvez solução de crimes contra pessoas, ajudando a identificar imaturos encontrados em cadáveres diminuindo o tempo da identificação do IPM e consequentemente auxiliando no processo investigatório, o presente trabalho é pioneiro dentro do Estado na área da entomologia, sendo provavelmente o ponto de partida para

vários outros dentro do Estado de Mato Grosso e em outras áreas da Segurança pública.

A implantação de cursos de capacitação visando o treinamento de profissionais na identificação molecular e taxonômica de insetos, poderá facilitar a estimativa do IPM, ajudando assim a pericia criminal do Estado de Mato Grosso.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim, D.S.; V.C. Silda & M.I.P.A. Balbi. 2002. Estado do conhecimento dos Diptera Neotropicais, p. 29-36. In: Costa, C.; S.A. Vanin; J.M. Lobo & A. Melic (eds). Proyecto de Red Iberoamericano de Biogeografía y Entomología Sistemática PRIBES. Zaragoza. m3m-Monografias Tercer Milenio, vol. 2, 329p.

Amorim, J.A. 2009. Levantamento de sarcófagídeos (Diptera) do Brasil incluindo a caracterização molecular de *Peckia* (Patonella) *intermutans* (Walker). Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. 89 p.

Amorim, J.A. & O.B. Ribeiro. 2001. Distinction among the Puparia of Three Blowfly Species (Diptera: Calliphoridae) Frequently Found on Unburied Corpses. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 96: 781-784.

Anderson G. 2001. Insect succession on carrion and its relationship to determining time of death. In: Byrd JH, Castner JL. editors, Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations, Boca Raton: CRC Press. p. 143-175.

Andrade, H. T. A.; Varella-Freire, A. A.; Batista, M. J. A.; Medeiros, J. F. Calliphoridae (Diptera) Coletados em Cadáveres Humanos no Rio Grande do Norte. *Neotropical Entomology*, v. 34, n. 5, p. 855-856, 2005.

Avise, J.C, Arnold, J.;Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.;Reeb, C. A.; Saunders, N. C.1987. Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics. Rev. Ecol.Syst. 18:489-522.

Barros, R. M.; C. A. Mello-Patiu e J. R. Pujol-Luz. 2008. Sarcophagidae (Insecta, Diptera) associados à decomposição de carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) em área de Cerrado do Distrito Federal, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia. 52: 606–609.

Benecke, M. 2001. A brief history of forensic entomology. Forensic Sci. Int. 120: 2-14.

Biavati, G.M.; F.H.A. Santana e J.R. Pujol-Luz. 2010. A checklist of Calliphoridae blowflies (Insecta, Diptera) associated with a pig carrion in Central Brazil. Journal of Forensic Sciences 55: 1603–1606.

Bolzan, A.R. 2011. Ciências naturais e exatas: DNA Barcode de drosófilídeos micófagos Pertencentes Aos gêneros *Hirtodrosophila*, *Mycodrosophila* e *Zygothrica*. Universidade Federal de Santa Maria Rio Grande do Sul. 74 f. Dissertação de Mestrado. Curso de Ciências Biológicas.

Bornemissza, G. F. 1957. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. Australian Journal of Zoology 5: 1–12.

Byrd J. e Castner L. 2001. Insects of Forensic Importance. In: Byrd JH, Castner JL. editors, Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations, Boca Raton: CRC Press. p. 43-79.

Byrd, J. H. e Castner, J. L. 2010. Forensic entomology – the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press LLC, Boca Raton, Florida. 681p.

Budowle, B.; Garofano, P.; Hellman, A.; Ketchum, M.; Kanthaswamy, S.; Parson, W.; Haeringen, W. V.; Fain, S.; Broad, T. 2005. Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal Legal Medicine*, v. 119, p. 295-30.

Cainé, L.M.; F.C. Real; M.I. Saloña-Bordas; M.M. de Pancorbo; G. Lima; T. Magalhães & F. Pinheiro. 2009. DNA typing of Diptera collected from human corpses in Portugal. **Forensic Science International**, 184: 21-23.

Cainé, Laura Sofia Ramos Mendes. Entomologia Forense: Identificação Genética de Espécies em Portugal. 2010. 98 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências da Saúde, Ramo de Ciências Biomédicas, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

Catts. E.P, Goff. M.L. Forensic entomology in criminal investigations.1992. Annu Ver. Entomol 37: 253-272.

Carmo, R. R. 2011. Identificação de Animais Silvestres de Interesse Criminal da Fauna Matogrossense por meio de DNA Mitocondrial. Tese de Mestrado. Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava.89p.

Carvalho, C. J. B. e Couri, M. S. 2002a. Key to the neotropical genera of Muscidae. In: Carvalho, C. J. B. (ed.). Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy. Editora Universidade Federal do Paraná, Curitiba, pp. 21–37.

Carvalho, C. J. B. 2012. Biodiversidade e conservação. In: Rafael, J. A.; Melo, G. A. R.; Carvalho, C. J. B.; Casari, S. A. & Constantino, R. (eds.). Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia. Holos, Editora. Ribeirão Preto, SP, pp. 133–138.

Carvalho, L.M.L. e Linhares, A.X.2001. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil. J Forensic Sci, v.46 (3), p.604-608.

Carvalho, L.M.L., Thyssen, P.J., Linhares, A.X., Palhares, F.A.B., 2000. A Checklist of Arthropods Associated with Pig Carrion And Human Corpses in Southeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 95 n. 1, p. 135-138.

Carvalho, L. M. L.; P. J. Thyssen; M. L. Goff & A. X. Linhares. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban of southeastern Brasil. Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology 5: 33–39.

Carvalho, S. L. 2006. Redescritção das larvas de terceiro ínstar de cinco espécies de dípteros Califorídeos (INSECTA, DIPTERA) de importância para Entomologia Forense. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal na Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biologia Animal sob a orientação do Professor Doutor José Roberto Pujol Luz.

Carvalho, B. J. C.; Ribeiro, B. P. 2000. Chave de Identificação das espécies de Calliphoridae (DIPTERA) do Sul do Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, (Brazil. J. Vet. Parasitol.) ed. 9, v.2, 169-173.

Carvalho, B.J.C.; Mello-Patiu A. C Z. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Díptera in South America. Revista Brasileira de Entomologia 52 (3): 390-406.

Carreira, G.A.; Arantes, L. C.; Lima, L. H. C. e Queiroz, P. R. 2008. Levantamento e caracterização da dipterofauna necrófaga em uma localidade de Brasília. Brasília: Universitas: Ciências da Saúde, v. 6, n. 2, p. 87-102, jul./dez.

Carvalho, E. C. T.; Queiroz, P. R. 2010. Descrição das principais famílias de díptera utilizadas na entomologia forense. 5ª Mostra de Produção Científica da Pós-graduação *Lato Sensu* da PUC Goiás, v. 01, p. 47 – 47.

Centeno, N.; Almorza, D.; Arnillas, C. 2004. Diversidade de Calliphoridae (Insecta: Díptera) em Hudson, Argentina. Neotropical Entomology 33: 387-390.

Costa, Ervandil Corrêa et al. 2008. Entomologia florestal. Santa Maria: Ed. UFSM.

Craven, Lyndsey et al. 2012. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. Nature International Weekly Journal Of Science, Newcastle, UK, p. 82-85. 06 maio.

Creão-Duarte, A. J.; , Ulisses U. Anjos, U. U.; Santos, W. E. 2012. Diversidade de membracídeos (Hemiptera, Membracidae) e sobreposição de recursos tróficos em área do semi-árido. Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre, 102(4):453-458.

Croce, D.; Júnior, C. D. 2009. Manual de medicina legal. Ed. Saraiva. 864p.

Cruz, T. M.; S. D. Vasconcelos. 2006. Entomofauna de solo associada à decomposição de carcaça de suíno em um fragmento de Mata Atlântica de Pernambuco, Brasil. Biociências 14: 193–201.

D'Almeida, J. M. & Almeida, J. R. 1998. Nichos tróficos em dípteros caliptrados, no Rio de Janeiro, RJ. Revista Brasileira de Biologia 58: 563–570.

Estrada, A. D. ; Maicon D. G. ; Thyssen J. P. ; Arício X Linhares. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. Ecology, Behavior and Bionomics Neotropical Entomology 38(2):203-207.

Farias, R. C. A. P. 2012. Entomofauna associada a carcaças de *Sus scrofa* L. expostas em remanescente de Mata atlântica em João Pessoa, PB. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia), UFPB. 112 p.

Freese, E. (1959). The Specific Mutagenic Effect of Base Analogues on Phage T4. Disponível em: <<http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/en/Mutation>> Acesso em: 28 de. 2010.

Fraga, N. J. 2004. Comportamento de ovoposição de adultos, tempo de desenvolvimento e morfologia dos imaturos de Hemilucilia (Fabricius), *H. semidiaphana* (Rondani) e *Lucilia eximia* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, Brasil. Dissertação de Mestrado INPA-UFAM. 77pp.

Freire, O. 1921. Fauna cadavérica brasileira. In: Falcão, E. C. & Ferreira, A. A. (eds). 1968. Lições e conferências do prof. Oscar Freire – obra póstuma antecedita de um *In memoriam*. Fundação Valeparaibana de Ensino, São José dos Campos, SP, pp. 161–223.

Fontoura, P. *et al.* 2009. Check-list de imaturos de dípteros associados a carcaças de suíno *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758) em decomposição no Rio de Janeiro. in: Congresso de ecologia do Brasil, 9, 2009, São Lourenço. Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço. p.1-3.

Galloway A, Birkby WH, Jones A, Henry TE, Parks B. 1989. Decay rates of human remains in an environment. JFSCA 345: 607-616.

Galperin, M. Y.; Cochrane, G. 2011. The Nucleic Ácids Research Database issue and the online molecular Biology Database collection. *Nucleics Acids research*, vol.39, p. D1-D6.

Gennard, D. 2012. Forensic entomology: an introduction. 2 ed. Oxford: John Willey & Sons Ltd., 272 p.

Gomes, L. ; Zuben, V. J. C. 2004. Insetos ajudam a desvendar crime. Universidade Estadual Paulista (Rio Claro) 28 • CIÊNCIA HOJE • vol. 35 • nº 208.

Gomes, L.; Gomes, G.; Oliveira, G. H.; Sanches, R. M.; Zuben, V. J. C. 2006. Influence of photoperiod on body weight and depth of burrowing in larvae of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) and implications for forensic entomology. *Revista Brasileira de Entomologia* 50(1): 76-79.

Gomes, L., Zuben, C.J. 2005. Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *Forensic Sci Int*, v.55, p.61-64.

Goff, M. L.; Flynn M. 1991. Determination of posmortem interval by arthropod sucession: A case study from the Hawaiian islands. JFSCA 36:607-614.

Goff, M. L. 2000. A fly for the prosecution – How insect evidence helps solve crimes. Harvard University Press, Cambridge, MA. 225 p.

Greenberg B. 1985. Forensic Entomology: Case Studies. ESA31:25-28.

Greenberg, B. 1991. Flies as forensic indicators, Ecology, J. Med Entomol .28(5): 565-77.

Grisales, D.; M. Ruiz & S. Villegas. 2010. Insects associated with exposed decomposing bodies in the Colombian Andean Coffee Region. Revista Brasileira de Entomologia 54: 637–644.

Guimarães, J. H. 1984. Considerações gerais sobre moscas do gênero *Chrysomya* no Brasil. Agroquímica Ciba-Geigy 24: 8–12.

Hajibabaei, M, Singer, G. A. C., Hbert, P. D. N., Hickey, D. A. 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics, trends in genetics, 23, 167-172.

Hall R. 2001. Introduction: Perceptions and Status of Forensic Entomology. In: Byrd JH, Castner JL. editors, Forensic Entomology. The Utility of Arthropods in Legal Investigations, Boca Raton: CRC Press.1. p. 1-15.

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

Hebert, P.D.N.; A. Cywinska; S.L. Ball & J.R. Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of Royal Society of London. Series B, Biological Sciences 270: S569-S599.

Hebert, P.D.N.; Penton, E.H.; Burns, J.M.; Jansen, D.H.; Hallwachs, W. Ten species in one: DNA barcode reveals cryptic species in the Neotropical skipper butterfly *Astrates fulgerator*. PNAS, vol. 101, 14812-14817, 2004.

Hebert, P.D.N. & T.R. Gregory. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. Systematic Biology, 54: 852–859.

Hebert, P. D. N.; Waard, J. R.; Landry, J, F. DNA barcodes for 1/100 of the animal kingdom. 2009. Disponível em <
<http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/6/3/359.abstract> > acesso em: 03 jun. 2010.

Hebert, P.D.N; Ratnasingham, S.; Waard, J.R. 2010. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society. Series B, Biological Sciences 270: S96-S99.

Jirón, L. F. & V. M. Cartín. 1981. Insect succession in the decomposition of a mammal in Costa Rica. *Journal of New York Entomological Society* 89: 158–165.

Jirón LF, Vargas-Alvarado E. 1983. Four muscoid flies (Sarcophagidae and Muscidae) associated with human cadavers in Costa Rica. *Brenesia* 21:3-5.

Jobim, Maria Regina et al. 2012. Novos Testes de DNA na Investigação de Paternidade com Suposto Pai Falecido. Disponível em: http://www.dnareference.com.br/front_colunistas.asp>. Acesso em: 20 ago.

Keh, B. 1985. *Scope and Applications of Forensic Entomology*. *Annual Review of Entomology*, 30: 137-154.

Kosmann, C. (2009). Código de Barras (DNA Barcodi) de Dípteros de interesse Forense. Dissertação apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do Título do Grau de Mestre, 74.

Kosmann, C. et al. 2011. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the post-mortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Entomol*, v.55, p.621-623.

Leinonen, R.; Akhtar, R. Birney, E.; Bonfield, J.; Bower, L.; Corbett, M.; Cheng, Y.; Demiralp, F. 2010. Improvements to Services at the Europeannucleotide Archive. *Nucleic Acids Research*, vol. 38, p. D39-D45.

Litjens, P.: A.C. Lessinger & A.M.L. Azeredo-Espin. 2001. Characterization of the screwworm flies *Cochliomya hominivorax* and *Cochliomya macellaria* by PCR-RFLP of mitochondrial DNA. *Medical and Veterinary Entomology* 15: 183-188.

Lord, W. D. & J. R. Stevenson. 1986. Directory of forensic entomologists. 2 ed. Misc. Publ. Armed Forces Pest Mgt. Board, Washington, D.C, 42 pp.

Love, J. C. & Hamilton, M. D. 2011. Introduction to Forensic Anthropology. In: Mozayani, A. ; Noziglia, C. *The Forensic Laboratory Handbook Procedures and Practice*: Humana Press. 2. ed. New York, NY, USA. 2009. Cap. 19, p. 509- 537.

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

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

Martins, E.; J. A. Neves; T. C. Moretti. 2010. Breeding of *Ornidia obesa* (Diptera: Syrphidae: Eristalinae) on pig carcasses in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 47: 690–694.

Mazzanti M, Alessandrini F, Tagliabracci A, Wells J, Campobasso C. 2012. DNA degradation and genetic analysis of empty puparia: Genetic identification limits in forensic entomology. *Forensic Sci Int*; 195:99-102.

Méglin, P. 1894. La fauna de Cadaveres: application de L'Entomologie a La Medecine Légale. p. 214.

Mello, R. P. 1961. Contribuição ao estudo do gênero *Phaenicia* (R.D., 1863) (Diptera, Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 59: 259–278.

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

Meier, R. ; Shiyang, K. ; Vaidaya, G. ; Mg, K.L. 2006. DNA barcode in taxonomy in Diptera : a pale of righ intraspecif variability and low identification success. *Systematic Biology*, vol. 55, p. 715-728.

Méglin, P. 1894. La Faune dès Cadáveres. Paris: Encyclopédie Scientifique dès Aide-Memoire.

Miller, S. E. 2006. Consortium for the Barcode of Life: Support for Consortium Activities and Secretariat Office. Conference.

Miranda, G.; G. Jacques; M. P. Almeida & M. S. B. Silva. 2006. Coleta de amostras de insetos para fins forenses. Brasília, Ministério da Justiça, iv + 11 p.

Mise, K. M. 2006. Estudo da fauna de Coleoptera (Insecta) que habita a carcaça de *Sus scrofa* Linnaeus, 1758, em Curitiba, Paraná. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

Miyaki, C. Y.; Matioli, S. R.; Wajntal, T.; Burke, A. 2010. Parrot Evolution and Paleogeographical Events: Mitochondrial DNA Evidence. *Molecular Biology and Evolution*, v. 15, n. 5, p. 544-51.

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

Moura, M.O.; C.J.B. de Carvalho & E.L.A. Monteiro-filho. 1997. A Preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, state of Paraná. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92: 269-274.

Nelson, L.A.; J.F. Wallman & M. Downton. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 44-52.

Nuorteva, P. 1977. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators, p.1072-1095. In C.G. Tedeshi, W.G. Eckert & L.G. Tedeshi (eds.), *Forensic medicine: A study in trauma and environmental hazards*. Philadelphia, Saunders, 1680p.

Oliveira-Costa, J.; G.S. Dias & I. Gomes. 2007. Padrão de Sucessão no Brasil. in: J. Oliveira-Costa. *Entomologia forense: quando os insetos são vestígios*. millenium, campinas, p. 420.

Oliveira-Costa, J. 2003. *Entomologia Forense - Quando os insetos são vestígios*. Campinas, Sp: Millennium. 257 p.

Oliveira-Costa, 2011. J. *Entomologia forense: quando os insetos são vestígios*. 3 ed. São Paulo: Editora Millenium, 502p.

Oliveira, T. C.; e Vasconcelos, S. D. Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology. *Forensic Science International*. vol. CXXVIII, p.97–102, 2010.

Packer et al 2009.

Payne, J. A. 1965. A summer carrion study of the baby pig *sus scrofa* Linnaeus. *Ecology*, 46(5): 592-602.

Pradeep Kumar N, Krishnamoorthy N, Sahu SS, Rajavel AR, Sabesan S, Jambulingam P. 2013. DNA Barcodes indicate members of the *Anopheles fluviatilis* (Diptera: Culicidae) species complex to be conspecific in India. *Mol Ecol Resour*. 13(3):354-61.

Prado, A. P. Guimarães, J. H. 1982. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na Região Neotropical (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 26(3): 225–231.

Prosdocimi, F.; Cerqueira, G. C.; Binneck, E.; Silva, A. F.; Reis, A. N.; Junqueira, A. C. M.; Santos, A. C. F. 2011. *Bioinformática - manual do usuário*. *Bioteχνologia, Ciência e Desenvolvimento*. 2010. Disponível em: <<http://web.cena.usp.br/apostilas/Fiueira/2008/Trabalhos/bioinformatica.pdf>> Acesso em: 04 jan.

Puzol-Luz, R. J. ; Arantes, C. L; Constantino, R. 2008. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008).

Rafael, J. A., Melo, G. A. R., Carvalho, C. J. B., casari, S. A. & Constantino, R. 2012. *Insetos do Brasil. Diversidade e taxonomia*. Holos, Editora. Ribeirão Preto, SP, pp. xiii–xiv.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2007. Bold: The Barcode of Life Data Systm. Molecular Ecology Notes. Vol. 7, p 355-364.

Rodriguez, W. C, Bass, W. M. 1983. Insect activity and its relationships to decay rates of human cadavers in East Tennessee. JFSCA 28: 423-432.

Rolo, E.A.; Oliveira, A.R.; Dourado, C.G.; Farinha, A.; Rebelo, M.T.; Dias, D. 2013. Identification of sarcosaprophagous Diptera species through DNA barcoding in wildlife forensics Forensic Science International Volume 228, Issue 1 , Pages 160-164.

Rosa, T. A., Babata, M. L. Y., Souza, C. M., Souza, D., Mello-Patiu, C. A., Vaz-de-ello, F. & Mendes, J. 2011. Arthropods associated with pig carrion in two vegetation rofiles of Cerrado in the State of Minas Gerais, Brazil. Revista Brasileira de Entomologia 55(3): 424–434.

Rosa, G.S. *et al* .2011. Population dynamics, life stage and ecological modeling in *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Neotrop Entomol, v.40, p.181-189.

Saigusa, K., M. Takamiya & Y. Aoki. 2005. Species identification of the forensically important flies in Iwate prefecture, Japan based on mitochondrial cytochrome oxidase gene subunit I (COI) sequences. Leg. Med. 7: 175–178.

Saitou, N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4: 406–425.

Sanches, R. M. 2007. Efeito do tipo de substrato para pupação na dispersão larval pós-alimentar de *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). Iheringia, Sér. Zool. Porto Alegre, 97(3):239-24.

Santana, A. R. F. 2006. Dipterofauna associada a carcaças *Sus scrofa* Linneaus em área de Cerrado do Distrito Federal, com ênfase na família Calliphoridae (Insecta, Diptera). Dissertação apresentada ao Programa de Pós- graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Schoederer, J. H. & Coutinho, L. M. 1991. Atividade forrageira e sobreposição de nichos tróficos em formigas do gênero *Atta* (Hymenoptera, Formicidae) em Cerrado. **Revista Brasileira de Entomologia** 35: 229–236.

Schroeder, h.; h. Klotzbach; S. Elias; C. Augustin & K. Pueschel. 2003. Use of PCR-RFLP for differentiation of calliphorid larvae (Díptera, Calliphoridae) on human corpses. Forensic Science International 132:76-81.

Silva, J. O. A.; F. S. Carvalho-Filho; M. C. Esposito, G. A. Reis. 2012. First record of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera, Calliphoridae) from Brazil. Revista Brasileira de Entomologia 56: 115–118.

Smith, K.G.V. 1986. *A manual of forensic entomology*. Oxford: University Printing House. 205p.

Smith KGV.1994. *A manual of forensic entomology*. Cornel University Press, Ithaca, New York, 205 pp.

Solé-Cava, A.M. & G. Wörheide. 2007. The perils and merits (or The Good, the Bad and the Ugly) of DNA barcoding of sponges a controversial discussion, p. 603-612. *In*: Custódio, M.R.; G. Lôbo-Hajdu; E. Hajdu & G. Muricy (Eds.). *Porifera Research - Biodiversity, Innovation and Sustainability*. Rio de Janeiro: Editora do Museu Nacional do Rio de Janeiro, v. 28.

Soltis, E. D; Soltis, PS. 2000. Contributions of plant molecular systematic to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology*. 42:45-75.

Souza, A. S. B.; F. D. Kirst & R. F. Kruger. 2008. Insects of forensic importance from Rio Grande do Sul state in southern Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 52: 641–646.

Sperling F.A.H., G.S. Anderson & D.A. Hickey. 1994. A DNA-based approach to the identification of insect species used for postmortem interval estimation. *J. Forensic Sci*. 39:418–427.

Sperling F, Anderson G, Hickey D. A. 1994. DNA-based approach to the identification of insect species used for post-mortem interval estimation. *J.Forensic Sci*; 39:418-427.

Stoeckle, M.; P.E. Waggoner & J.H. Ausubel. 2005. Barcoding Life, illustrated, Goals, Rationale, Results. Ppt v.1.3. Disponível em: <<http://phe.rockefeller.edu/PDF/FILES/BLIillustrated26jan04print%20v1-3.pdf>> Acesso em 10/03/2014.

Sukontason, K., Sukontason, K. L., Ngern-Klun, R. & Piangjai .2004. Differentiation of de third

Instar of forensically important fly species in Thailand. *Annals of entomological society of America* 97: 1069-1075.

Tamura, K.; Nei, M. 1993. Estimariion of the number of nucleotide substitutions in the controls of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, v. 3, n. 10, p. 512-526.

Thompson, J. D.; D.G. Higgins & T.J. Gibson 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weigting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Thompson J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D.G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25: 4876–4882.

Thompson, F. & A. C. Pont. 1993. Systematic database of *Musca*Names (Diptera). A catalog of names associated with the genus-group name *Musca* Linnaeus, with information on their classification, distribution, and documentation. Thesis Zoologicae 20. Koenigstein, Koeltz Scientific Books, 221 p.

Thyssen, P.J. 2005. Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância forense. Tese de doutoramento. Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP.

Thyssen, P.J.; A. C. Lessinger; A.M.L. Azeredo-Espin & A.X. Linhares. 2005. 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, 34: 777-784.

Tomberlin, J. K., Reeves, W. K. Sheppard, D. C. 2001. First record of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Georgia, U.S.A. Florida Entomologist 84(2): 300–301

Torres, M. C.; Kosmann, C.; Arantes, L. C. 2010. O futuro da entomologia forense: aliança entre taxonomia e biologia molecular. 5ª Mostra de Produção Científica da Pós-graduação *Lato Sensus* da PUC Goiás, v. 1, p. 77 – 77.

Triplehorn, C. A. & Johnson, N. F. 2005. Borror's introduction to the study of insects. 7ª ed. Florence, KY, E.U.A.: Brooks Cole. 888 p.

Tuimala, J. Using ClustalX for multiple sequence alignment. 2004. Disponível em: <http://www.clustal.org/doc/jarno_tuimala_clustalx.pdf> Acesso em: março. de 2011.

Ururahy, A. 2008. Distribuição Temporal de Calliphoridae (Diptera) Associados à Decomposição de *Sus scrofa Linnaeus* (Suidae) na Reserva Adolpho Duke, Manaus, Amazonas. 2008. 87 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, área de concentração em Entomologia, Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituição Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus, AM.

Valentini, A., Pompanon, F. e Taberlet, P. 2008. DNA Barcode for Ecologists. Trends in Ecology and Evolution, Vol. 24, p. 110-116.

VanLaerhoven S. e Anderson G. 1999. Insect succession on buried carrion in two biogeoclimatic zones of British Columbia. *J Forensic Sci*; 44(1):32-43.

Vasconcelos, S. D. & Araújo, M. C. S. 2012. Necrophagous species of Diptera and Coleoptera in Northeastern Brazil: state of the art and challenges for the forensic entomologist. Revista Brasileira de Entomologia 56(1): 7–14.

Vockeroth, J. R. 2002. Introducing the ubiquitous Diptera. *In*: Exploring the diversity of flies (Diptera). Skevington, J. H. & Dang, P. T. (eds.). Biodiversity3(4): 3–5.

Von Zuben, C. J.; Bassanezi, R. C. *et al.* 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: i. mathematical model of postfeeding larval dispersal. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, 120:379-382.

Von Zuben, C.J; Stangenhans, G.; Godoy, W.A.C. 2000. Competição larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): efeitos de diferentes níveis de agregação larval sobre estimativas de peso, fecundidade e investimento reprodutivo. *Revista Brasileira de Biologia*, v.60, n.2, p.195-203, 2000.

Von Zuben, C. J. 2001. *Zoologia aplicada: recentes avanços em estudos de entomologia forense*. *Entomol. Vec.*, Rio de Janeiro, 8(2):173-183.

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

Weels, J. D.; Lamotte, L.R. Estimating the postmortem interval. In: Byrd, J.H.; Castner, J.L. *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2009, Cap. 9, p.367-388.

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

Wells, J.D. & F.A.H.. Sperling. 2001. DNA-based identification of forensically important chrysomyinae (Diptera: calliphoridae). *Annals of the Entomological Society of America* 36: 222-226

Wells, J.D., R. Wall & J.R. Stevens. 2007. Phylogenetic analysis of forensically important *Lucilia* flies based on cytochrome oxidase I sequence: a cautionary tale for forensic species determination. *Int. J. Legal Med.* 121: 229–233.

Whitworth .T, Dawson, R. D., Magalan, H, e Baudry, E. 2007. DNA Barcode readily identify species of the blowfly genus *Protophormia*- Preceeding of of the Royal Society, vol. 274 p. 1731-1739.

Woese, C.R.; Fox, G.E. 1997. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.74, p. 5088-509..

Yassin, A.; Capy, P.; Med-ravazzy, L.; Ogereau, D. David, J.L. 2008. DNA barcode discovers two cryptic species and two geographical radiations in the invasive *Drosophila* *Zaprionus indianus*. *Molecular Ecology Researchs*, vol.8, p. 491-50.

Yassin, A. Amédégnato, C., Crudud, C., Venille, M. 2009. Molecular Taxonomy and species delimitation in *Andrena* *Schistocerca* (Orthoptera: Acrididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 53, p. 404-411.

Yassin, A., Marcow, T. A., Nauchari, A., O'Grady, P., De Salle, R. 2010. The genus *Drosophila* is a model for testing tree-and character-based methods of species identification using DNA Barcode. *Molecular phylogeneics and Evolution*. Doi: 10.1016/j.ympev. 2010.08.020.

Zehner, R., J. Amendt, S. Schutt, J. Sauer, R. Krettek & D. Povolny. 2004. Genetic identification of forensically important flesh flies (Diptera: Sarcophagidae). *Int. J. Legal Med.* 118: 245–247.

ANEXOS

Anexo 1. Sequências de bases nos segmentos dos genes mitocondriais **cwtb** e COI das espécies estudadas.

C. megacephala

TACTTTATATTTTCATTTTCGGAGCTTGATCCGGAATAGTAGGAACTTCATTAAGTATTT
TAATTCGAGCTGAATTAGGACACCCTGGAGCATTAAATTGGAGACGACCAAATTTATAA
TGTAATTGTAACAGCTCACGCTTTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATGCCAATTATAAT
TGGAGGATTTGGAAATTGACTAGTTCCTTTAATGTTAGGAGCTCCAGATATAGCTTTC
CCACGAATAAATAATATAAGTTTCTGACTTTTACCTCCTGCATTAACCTTTATTATTAGTA
AGTAGTATAGTAGAAAATGGGGCTGGAACAGGATGAACTGTTTACCCACCTTTATCTT
CTAATATTGCTCATGGAGGAGCATCAGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACACTTAGCA
GGAATTTCTTCAATTTTAGGAGCTGTAAATTTTATTACAACTGTAATTAATATACGATCT
ACAGGAATTACATTTGATCGAATACCTTTATTTGTATGATCTGTAGTTATTACTGCTCT
ATTATTATTATTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATATTATTAAGTCTG.

C. albiceps

CTTTTACCTCCTGCATTAACCTTTACTATTAGTAAGTAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGG
AACAGGATGAACTGTTTATCCACCTTTATCATCTAATATTGCTCATGGTGGAGCATCA
GTTGATTTAGCTATTTTTTCTTTACACTTAGCTGGAATTTTCATCAATTTTAGGAGCTGT
AAATTTTATTACAACTGTTATTAATATACGATCTACAGGAATCACATTTGATCGAATAC
CTTTATTCGTATGATCTGTAGTTATTACTGCTCTTCTTTTATTATTATCATTACCAGTAT
TAGCCGGTGCAATTACTATATTATTAAGTATCGAAATTTAAATACTTCATTCTTTGAT
CCAGCAGGAGGAGGAGATCCTATTTTATACCAACATTTATTTTGATTCTTTGGACATC
CAGAAGTTTATATTTTAATTTTACCTGGATTCGGAATAATTTCTCATATTATTAGTCAAG
AATCAGGAAAAAAGGAAACATTTGGATCTTTAGGAATAATTTATGCAATATTAGCTATT

GGTCTATTAGGATTTATTGTATGAGCTCATCATATATTTACTGTAGGAATGGATGTAGA
TACTCGAG

L. cluvia

GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACTTCTTTAAGAATTTTAATTCGAGCTGAATTAG
GGCACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGACCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTC
ATGCTTTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAATCGGGGGGTTTGGAATT
GATTAGTTCCTTTAATACTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATA
AGTTTTTGACTCCTCCCTCCTGCGTTAACTCTATTATTAGTAAGTAGTATAGTAGAAAA
CGGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCCTTATCTTCTAATATCGCCCATGG
AGGGGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTCTTACATTTAGCTGGAATTTCTTCAATT
TTAGGAGCAGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAACATACGATCAACAGGAATTACTTT
TGACCGAATGCCATTATTTGTTTGATCTGTAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATC
TTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAATCTTAATACTT
CATTCTTTGACCCTGCCGGAGGAGGA

L. coeruleiviridis

GGAGCTTGATCTGGTATAATCGGAACTTCTTTAAGAATTCTAATTCGAGCTGAATTAG
GGCACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
TGCTTTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAA
GTTTTTGACTCCTCCCTCCTGCATTAACCTTTATTATTAGTAAGTAGTATAGTAGAAAAC
GGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCATGGAG
GAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCCGGAATTTCTTCAATTTTA
GGAGCAGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTTGA
CCGAATGCCATTATTTGTTTGATCCGTAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCTTT

ACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGATCGAAATCTTAATACTTCAT
TCTTTGACCCTGCCGGAGGAGGA

L. cuprina

GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAATTCTAATTCGAGCTGAATTAG
GACACCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCA
TGCTTTTATTATAATTTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCATTAATACTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAA
GTTTTTGACTTTTACCTCCTGCATTAACCTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAAC
GGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCATGGA
GGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCAATTT
TAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTT
GATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCA
TTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACAGACCGAAATCTTAATACATC
ATTCTTTGATCCTGCAGGAGGAGGA

L. cuprina hawaii

GGAGCTTGATCCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAATTCTAATTCGAGCTGAATTAG
GACACCCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCA
TGCTTTTATTATAATTTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCATTAATACTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAA
GTTTTTGACTTTTACCTCCTGCATTAACCTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAAC
GGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCCCTATCTTCTAATATTGCTCATGGA
GGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTTCTTCAATTT
TAGGAGCTGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTT

GATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACAGCTTTATTGCTTTTATTATCA
TTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACAGACCGAAATCTTAATACATC
ATTCTTTGACCCTGCAGGAGGAGGA

L. eximia

GGGGCTTGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAATTCTAATTCGAGCCGAATTAG
GACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
TGCTTTTATTATAATTTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTG
ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAA
GTTTTTGACTCCTTCCCCCTGCATTAACCTTTACTATTAGTAAGTAGTATAGTAGAAAAC
GGGGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCCTTATCTTCTAATATCGCCCATGGT
GGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTCTCTACATTTAGCTGGAATTTCTTCAATTTT
AGGAGCAGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTTG
ATCGAATACCATTATTTGTTTATCTGTAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCTTT
ACCAGTATTAGCCGGGGCTATTACTATACTTTTAACTGACCAAATCTTAACACCTCATT
CTTTGACCCCGCTGGAGGAGGA

L. mexicana

GGAGCTTGATCCGGTATAATTGGAACCTTCTTTAAGAATTCTAATTCGAGCCGAATTAG
GACACCCCGGAGCACTAATTGGTGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
TGCTTTTATTATAATTTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTG
GTTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCCCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAA
GTTTTTGACTCCTCCCCCTGCATTAACCTTTACTATTAGTAAGTAGTARAGTAGAAAAC
GGGGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCCTTATCTTCTAATATCGCCCATGGT

GGAGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTTCCCTACATTTAGCTGGAATTTCTTCAATTT
 TAGGAGCAGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGGATTACTTTT
 GATCGAATACCATTATTTGTTTGATCTGTAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCT
 TTACCAGTATTAGCCGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACCTC
 ATTCTTTGACCCTGCCGGAGGAGGA

L. porphyrina

GGAGCTTGATCTGGTATGATCGGAACTTCATTAAGAATTTTAATTCGAGCTGAATTAG
 GACACCCTGGTGCACTAATTGGAGATGACAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCCAC
 GCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTGA
 TTAGTTCCTTTAATACTAGGAGCACCAGATATAGCCTTCCCTCGACTAAATAATATAA
 GATTTTGACTTTTACCTCCTGCACTAACTTTATTATTAGTAAGTAGTATAGTAGAAAAC
 GGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCCCCTTATCATCTAATATTGCTCATGGA
 GGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCAGGGATTTCCATCAATTC
 TAGGAGCCGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAATTACCTTT
 GACCGAATACCCTTATTTGTCTGATCAGTAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATC
 ACTACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAACTGACCGAAACCTTAATACTT
 CATTTTTTGATCCAGCAGGAGGAGGA

L. sericata

GGAGCTCGGAATAATTGGAACCTTCTTTAAGAATTCTAATTCGAGCTGAATTAGGACAT
 CCTGGAGCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCATGCTTT
 TATTATAATTTTTTTTATAGTAATGCCAATTATAATTGGAGGATTTGAAATTGATTAGTT
 CCATTAATACTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTG
 ACTTTTACCTCCTGCATTAACCTTTATTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAACGGAGCTG

GAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCTCTATCTTCTAATATTGCTCATGGAGGAGCTTC
 TGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCATTTAGCAGGAATTCCTTCAATTTTAGGAGCT
 GTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTTGATCGAATA
 CCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCATTACCAGTA
 TTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACAGACCGAAATCTTAATACATCATTCTTTGA
 CCCTGCAGGAGGAGGA

L. thatuna

GGAGCATGATCTGGTATAATCGGAACTTCTCTAAGAATTTTAATTCGAGCTGAATTAG
 GACACCCTGGAGCATTAAATTGGAGACGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCA
 TGCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTG
 ATTAGTTCCTCTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCATTTCTCGAATGAATAATATAA
 GTTTTTGACTTTTACCTCCTGCATTAACCTTTACTATTAGTTAGTAGTATAGTAGAAAAC
 GGAGCTGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCCCTTATCATCTAATATTGCTCATGGA
 GGAGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATTCCTTCAATTTT
 AGGAGCTGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTTG
 ATCGAATACCTTTATTTGTTTGATCAGTAGTAATTACAGCTTTATTACTTTTATTATCAT
 TACCAGTATTAGCAGGAGCTATTACAATACTTTTAACAGATCGAAATCTTAATACTTCA
 TTCTTTGACCCTGCGGGAGGAGGA

M. domestica

GGAGCATGATCTGGTATAGTAGGAACATCATTAAAGAATTTTAATTCGAGCTGAATTAG
 GACACCCTGGTGCTCTAATTGGAGACGATCAAATTTATAATGTTATTGTAACAGCTCA
 TGCTTTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCTATTATAATTGGAGGGTTTGGAAATTG

ATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCATTCCCTCGAATGAATAATATAA
 GTTTTTGATTATTACCTCCTGCATTAACCTCTATTATTAGTAAGAAGTATAGTAGAAAAG
 GGAGCTGGAACAGGTTGAACTGTTTATCCACCTTTATCATCAATTATTGCTCATGGTG
 GAGCTTCAGTTGATTTAGCTATTTTCTCTCTTCACTTAGCAGGAATTCCTTCATTTTA
 GGAGCAGTAAATTTTATTACAACCTGTTATTAACATACGATCAACAGGAATTACATTCGA
 TCGAATGCCTTTATTTGTTTGATCAGTTGTAATTACTGCATTATTATTATTATCTCT
 TCCTGTTCTTGCTGGAGCTATTACTATACTATTAAGTATCGAAATTTAAATACTTCAT
 TCTTTGACCCAGCTGGAGGAGGT

O. aenescens

GGAGCATGATCCGGAATAATTGGGACTTCATTAAGAATTTTAATTGAGCTGAATTAG
 GTCACCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTAACAGCTCA
 TGCTTTTATTATAATTTTCTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGAAATTG
 ATTAGTTCATTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAA
 GTTTTTGATTATTACCACCTGCACTAACTTTATTATTAGTTAGAAGAATAGTAGAAAAC
 GGGGCTGGTACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCATGGAG
 GAGCTTCTGTTGATTTAGCAATTTTCTCTTTACATTTAGCAGGAATTCCTTCTATTTTA
 GGAGCAGTAAATTTTATTACTACTGTAATTAATATACGATCTACTGGAATTACATTTGA
 TCGAATACCATTATTTGTTTGATCAGTAGTTATTACTGCTCTTTTATTATTATTATCTCT
 TCCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAAGTATCGAAATTTAAATACTTCAT
 CCTTTGACCCAGCAGGTGGAGGA

O. albuquerquei

GGAGCATGATCCGGAATAATTGGAACCTCTTTAAGAATTTTAATTGAGCAGAATTAG
 GTCATCCAGGTGCTCTTATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCAT

GCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGA
 TTAGTTCCATTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCTTTTCCTCGAATAAACAATATAAG
 TTTTGGATTATTACCTCCAGCATTAAACCCTATTATTAGTTAGAAGAATAGTAGAAAATG
 GAGCCGGAACAGGTTGAACTGTTTACCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCATGGAGG
 AGCTTCTGTTGATTTAGCAATCTTTTCTCTTCATTTAGCAGGAATCTCCTTCAATTTTA
 GGAGCAGTAAATTTTATTATTACAGTAATTAATATACGATCAACTGGAATTACTTTTGA
 TCGAATACCATTATTTGTCTGATCAGTAGTTATTACAGCTCTTTTATTATTATTATCTTA
 CCAGTATTAGCAGGAGCTATTACTATATTATTAAGTATCGAAATTTAAATACTTCATT
 CTTTGATCCTGCCGGAGGAGGA

S. chlorogaster

GGGGCTTGATCCGGAATAATCGGAACTTCTTTAAGAATTTTAATTGAGCTGAATTAG
 GACATCCTGGAGCATTAAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCAT
 GCTTTTATTATAATTTTTTTTATAGTAATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAACTGA
 TTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCTCCAGATATAGCATTTTCCTCGAATGAATAATATAAG
 TTTTGGACTTTTACCTCCTGCTTTAACTCTACTATTAGTAAGTAGTATAGTAGAAAATG
 GGGCTGGAACAGGATGAACTGTTTATCCTCCTTTATCTTCTAATATTGCTCATGGAGG
 AGCTTCTGTTGATTTAGCTATTTTCTCTTTACACTTAGCTGGAATTTCTTCAATTTTAG
 GAGCTGTAAATTTTATTACAAGTGAATTAATATACGATCAACAGGAATTACTTTTCGAT
 CGAATACCTTTATTTGTATGATCTGTTGTAATTACAGCTTTATTATTATTATTATCATT
 CCTGTATTAGCTGGAGCTATTACAATACTATTAACAGATCGAAATTTAAATACTTCATT
 TTTTGATCCTGCTGGAGGAGGA

P. intermutans.

ATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCAATTATACTAGGAGCCCCTGATATAGCCT
TTCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGACTTTTACCCCCAGCATTAAACCTTACTTCTT
GTAAGTAGAATAGTAGAAAATGGAGCTGGAACAGGATGAACTGTTTACCCTCCTTTAT
CATCTAATATTGCCCATGGAGGAGCATCTGTTGATTTGGCAATTTTTTCTCTTCATTTA
GCAGGAATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATTACTACAGTTATTAATATACG
ATCTACAGGAATCACATTTGACCGAATACCTTTATTTGTTTGATCTGTAGTAATTACAG
CTTTATTATTACTTCTTTCTTTACCAGTACTTGCCGGAGCAATTACTATATTATTAAGT
ACCGA

Anexo 2

Árvore de Figura 12 – Filograma consenso de 612pb obtido por análise de máxima parcimônia, utilizando sequencias da região do Citocromo C Oxidase Subunidade I +

