
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)**

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS E BACTÉRIAS PRESENTES NA
SUPERFÍCIE DOS OVOS E NOS OVÁRIOS NA REGULAÇÃO DE OVIPOSIÇÃO
DE DUAS ESPÉCIES DE MOSCAS-VAREJEIRAS DE IMPORTÂNCIA FORENSE**

THIAGO DE LIMA

**Rio Claro - SP
2021**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)**

**AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS QUÍMICOS E BACTÉRIAS
PRESENTES NA SUPERFÍCIE DOS OVOS E NOS OVÁRIOS NA
REGULAÇÃO DE OVIPOSIÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE
MOSCAS-VAREJEIRAS DE IMPORTÂNCIA FORENSE**

THIAGO DE LIMA

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do Câmpus de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de doutor em Ciências Biológicas
(Zoologia)

Orientador: Prof. Dr. Claudio José Von
Zuben

Rio Claro – SP

2021

L732a	<p>Lima, Thiago</p> <p>Avaliação de compostos químicos e bactérias presentes na superfície dos ovos e nos ovários na regulação de oviposição de duas espécies de moscas-varejeiras de importância forense / Thiago Lima.</p> <p>-- Rio Claro, 2021</p> <p>131 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro</p> <p>Orientador: Claudio José Von Zuben</p> <p>1. Entomologia forense. 2. Ecologia química. 3. Micro-organismos. 4. Comportamento. I. Título.</p>
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMPOSTOS QUÍMICOS E BACTÉRIAS PRESENTES NA SUPERFÍCIE DOS OVOS E NOS OVÁRIOS E REGULAÇÃO DE OVIPOSIÇÃO DE DUAS ESPÉCIES DE MOSCAS-VAREJEIRAS DE IMPORTÂNCIA FORENSE

AUTOR: THIAGO DE LIMA

ORIENTADOR: CLAUDIO JOSÉ VON ZUBEN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA), pela Comissão Examinadora:

Claudio José Von Zuben

Prof. Dr. CLAUDIO JOSÉ VON ZUBEN (Participação Virtual)
Departamento de Zoologia / UNESP - Instituto de Biociências de Rio Claro - SP

Jose Mauricio
Prof. Dr. JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia / ESALQ - USP - Piracicaba/SP

Wesley Augusto Conde Godoy
Prof. Dr. WESLEY AUGUSTO CONDE GODOY (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP

Milene Ferro
Profa. Dra. MILENE FERRO (Participação Virtual)
Pós-Doutoranda do Centro de Estudos de Insetos Sociais / Instituto de Biociências de Rio Claro

Henrique Ferreira
Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Rio Claro, 27 de janeiro de 2021

TÍTULO ALTERADO PARA:

Avaliação de compostos químicos e bactérias presentes na superfície dos ovos e nos ovários na regulação de oviposição de duas espécies de moscas-varejeiras de importância forense

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio José von Zuben, por ter compartilhado todo o seu conhecimento ao longo desses anos, mostrando não somente como ser um excelente pesquisador e profissional, mas também um ótimo ser humano.

Ao Prof. Dr. Henrique Ferreira e ao Prof. Dr. José Maurício Simões Bento por terem feito com que eu me sentisse em casa ao realizar minha pesquisa em seus laboratórios e pelos conselhos valiosos.

À Prof. Dra. Milene Ferro por ser um exemplo de dedicação e competência e por sempre estar mais do que disposta a resolver meus problemas e a responder minhas dúvidas da maneira mais esclarecedora possível.

Às Professoras Doutoras Michele Castro de Paula e Kamylla Balbuena Michelutti por terem me ajudado com tanto empenho e profissionalismo, foi uma satisfação enorme trabalhar com vocês.

À Arodí Prado Favaris pela colaboração durante este ano tão turbulento, sem sua contribuição, não seria possível terminar a pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Paulo Leite Guadanucci por ter acompanhado meu projeto desde o início e por todas as sugestões que ajudaram a moldá-lo no que é hoje.

Ao Prof. Dr. José Sílvio Govoni por ter feito com que eu gostasse mais de matemática e estatística ao me mostrar suas aplicações na minha tese.

Aos meus pais, Francisco Edson de Lima e Maria Soely Bortoli de Lima, e ao meu irmão, Erick de Lima, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões.

A todos os professores, funcionários e colegas que tive contato no IB-Unesp.

RESUMO

A escolha do local de oviposição em moscas-varejeiras é de suma importância para um desenvolvimento adequado das larvas e futuros adultos, essa escolha geralmente é feita analisando pistas químicas, voláteis ou não, e micro-organismos presentes no ambiente. E independentemente do substrato, as moscas-varejeiras sempre optam por colocar seus ovos agregados à ovos coespecíficos, pois isso garante vantagens à prole. Porém, o motivo pelo qual as fêmeas realizam esse comportamento ainda não é completamente compreendido. Uma das hipóteses é que os ovos e os ovários contêm semioquímicos e bactérias que auxiliam na regulação desse comportamento. Os objetivos desta pesquisa foram descobrir se extratos de ovos em diferentes estágios de desenvolvimento e ovários coespecíficos provocam atração em fêmeas de *C. megacephala* e *C. albiceps* e, em caso positivo, traçar o perfil químico dessas estruturas e, em seguida, descrever a comunidade bacteriana da superfície desses ovos e ovários para averiguar a presença de possíveis compostos e micro-organismos que possam afetar o comportamento reprodutivo de alguma maneira, especialmente o de oviposição. Os resultados mostraram que alguns extratos, principalmente em éter, provocam atração em fêmeas e que tanto os compostos químicos encontrados, uma mistura complexa de hidrocarbonetos e ácidos graxos, como as bactérias podem ter um papel na regulação de oviposição, desde a atração ao local até a agregação de adultos e ovos.

PALAVRAS-CHAVE: Calliphoridae; semioquímicos; bactérias, comportamento de oviposição

ABSTRACT

The choice of oviposition site in blowflies is extremely important for an appropriate development of the larvae and future adults, this choice is usually made by analyzing chemical clues, volatile or not, and microorganisms present in the environment. Regardless the substrate, blowflies always choose to lay their eggs attached to co-specific eggs, since this behaviour guarantees advantages to their offspring. However, the reason why females carry out this behavior is not yet fully understood. One hypothesis is that eggs and ovaries contain semiochemicals and bacteria that help regulate this behavior. The objectives of this research were to find out if egg extracts at different stages of development and conspecific ovaries produce attraction in females of *C. megacephala* and *C. albiceps* and, if so, to describe the chemical profile of these structures and then describe the bacterial community on the surface of these eggs and ovaries to verify the presence of possible compounds and microorganisms that may affect reproductive behavior in some way, especially oviposition. The results showed that some extracts, mainly in ether, produce attraction in females and that the chemical compounds found, a complex mixture of hydrocarbons and fatty acids, as well as bacteria can play a role in the oviposition regulation, from attraction to the site to the aggregation of adults and eggs.

KEYWORDS: Calliphoridae; semiochemicals; bacteria, oviposition behavior

SUMÁRIO	PÁGINA
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 <i>Chrysomya megacephala</i>	21
1.2 <i>Chrysomya albiceps</i>	22
2 OBJETIVOS	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Coleta e manutenção dos indivíduos	24
3.2 Coleta dos extratos de ovários e ovos	25
3.3 Bioensaios	26
3.4 Identificação dos compostos	30
3.5 Coleta do material genético bacteriano	32
3.6 Pré-processamento de <i>reads</i> , classificação taxonômica e análises de associação	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Bioensaios	36
4.1.1 Extratos de ovos	36
4.1.2 Extratos de ovários	44
4.2 Perfil químico	48
4.3 Comunidade bacteriana	56
4.3.1 Ovários e superfície dos ovos de <i>Chrysomya megacephala</i>	56
4.3.2 Ovários e superfície dos ovos de <i>Chrysomya albiceps</i>	61
4.3.3 Comparação entre comunidade bacteriana de <i>C. megacephala</i> e <i>C. albiceps</i>	67
6 CONCLUSÕES FINAIS	83
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
A.1 APÊNDICE A — Introdução complementar	116
B.1 APÊNDICE B — Resultados complementares	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — APÊNDICE A	129

1 INTRODUÇÃO

Insetos são encontrados em quase todos os habitats e graças a isso, aproximadamente 1 milhão de espécies de insetos foram descritas até hoje; porém, é provável que 4 milhões ainda precisem ser catalogadas. Esse alto número de espécies se deve, em grande parte, às especializações de tipos de alimentação, capacidade de dispersão e possibilidades de evitar a predação, associados à evolução do voo (PECHENIK, 2016).

Diptera (califorídeos, sarcófagídeos, mutucas, moscas comuns, mosquitos, dentre outros) é uma das ordens mais antigas entre os insetos holometábolos; está entre as quatro ordens mega-diversas de insetos e, entre elas, é a melhor catalogada em todas as regiões biogeográficas (RAFAEL, 2012). Compreende atualmente cerca de 153.000 espécies descritas (sem incluir as conhecidas de fósseis) em cerca de 160 famílias (THOMPSON, 2008), o que representa de 10 a 15% de toda a biodiversidade mundial (YANG et al., 2007). Porém, esses valores são iniciais e o número de espécies deve ser ainda maior (BROWN et al., 2009). Na região Neotropical, existem mais de 31 mil espécies em 118 famílias (AMORIM, 2010). No Brasil, são 8.700 espécies, no entanto, estima-se haver 400 mil espécies no mundo e quase 60 mil no Brasil (RAFAEL, 2012).

Dentro dessa Ordem, a família Calliphoridae, com representantes conhecidos popularmente como moscas-varejeiras, facilmente reconhecíveis por sua cor metálica geralmente verde ou azul (CARVALHO e MELLO-PATIU, 2008), tem grande importância médica, veterinária e sanitária (NORRIS, 1965; GUIMARÃES et al., 1999), pois várias espécies são causadoras de miíases, uma infestação em humanos e animais vertebrados vivos por larvas que, por um certo período, se alimentam de tecidos vivos (primárias) ou mortos (secundárias) e substâncias corporais líquidas do hospedeiro (ZUMPT, 1965; LANE e CROSSKEY, 1993; GUIMARÃES et al., 1999; STEVENS, 2003; STEVENS e WALLMAN, 2006; SINGH e SINGH, 2015). Quando não estão se alimentando de tecido de vertebrados, podem se alimentar de matéria orgânica em decomposição, como carcaças, fezes e vegetação podre, auxiliando na ciclagem de nutrientes (BYRD e CASTNER, 2001; ALVES et al., 2014).

Além de causar miíases, algumas são vetoras de bactérias patogênicas; a Administração Federal de Alimentos e Drogas dos EUA já identificou 21 espécies de moscas-varejeiras como ameaças à saúde humana (OLSEN, 1998). *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Musca domestica* (Linnaeus), por exemplo, podem conter, respectivamente, até 551 e 228 espécies de bactérias espalhadas pelo corpo (JUNQUEIRA et al., 2017), sendo que essas moscas também

podem abrigar e transferir bactérias resistentes a antibióticos, algumas com resistência a múltiplas drogas (GRAHAM et al., 2009).

Por outro lado, imaturos de algumas espécies, como *Cochliomyia macellaria* (Fabricius), *C. megacephala* e *Lucilia cuprina* (Wiedemann), são utilizados na terapia larval (NASSU e THYSSEN, 2015; PINHEIRO et al., 2015; LIMSOPATHAM et al., 2017), que consiste em aplicar larvas de moscas vivas e estéreis em lesões cutâneas necróticas para auxiliar na cicatrização de feridas (THYSSEN et al., 2013). Essa técnica já se mostrou bastante eficiente em diversos casos, de úlceras a queimaduras primárias (COURTENAY, 1999; SCAVÉE et al., 2003; PARNÉS e LAGAN, 2007; PINHEIRO et al., 2015).

Indivíduos dessa família também impactam a economia, tanto positivamente como negativamente. Muitos califorídeos são importantes polinizadores (SAEED et al., 2016), podem ser alternativas às abelhas na polinização de brássicas (FAULKNER, 1962; HEATH, 1982), algumas flores (FAEGRI e VAN DER PIJL, 2013), morangos (PORTER, 1977; HERRMANN et al., 2019), pimenta doce (JARLAN et al., 1997), cenoura (HOWLETT, 2012) e manga (REDDY et al., 2014; SAEED et al., 2016). Outra maneira de contribuir com a economia é incorporar esses insetos, principalmente os imaturos, na alimentação; essa prática já ocorre em algumas culturas e regiões, embora ainda seja bem restrita (HEATH, 1982). Outros, porém, trazem enormes prejuízos para a economia por serem pragas, como dito anteriormente, podendo causar miíases em gado (AXTELL, 1986), ovelhas (ASHWORTH e WALL, 1994; FISHER et al., 1998), aves (AXTELL e ARENDS, 1990) e se alimentar ou ovipor em peixes, principalmente em bacalhau que é atacado quando está secando ao sol para ser comercializado (AAK et al., 2010; AAK et al., 2010b; AAK et al., 2011). O prejuízo é tanto que muitas pesquisas visam a criação de iscas para controle populacional (URECH et al., 2009; AAK et al., 2010).

Essas moscas também podem ser utilizadas na Entomologia Forense, pois são uma grande ferramenta em investigações sobre tráfico de entorpecentes, maus tratos e morte violenta (GOMES, 2010). Nos casos de morte violenta, os insetos podem prestar esclarecimentos quanto à identidade do morto, causa da morte, local onde ocorreu a morte e, principalmente, a cronotanatognose, que é o intervalo de tempo entre a morte e o momento de encontro do cadáver (IPM) (VON ZUBEN et al., 1996; GRASSBERGER et al., 2003; LEFEBVRE e PASQUERAULT, 2004; GOMES et al., 2005; GOMES, 2010). Outro ramo da Entomologia Forense em que as moscas-varejeiras são utilizadas é a entomotoxicologia, que é a detecção de toxinas e substâncias controladas ou não nos insetos presentes na decomposição do corpo

(BYRD e TOMBERLIN, 2019), que pode ajudar na investigação de casos de morte relacionados ao uso de narcóticos (NOLTE et al., 1992; GOFF e LORD, 1994; MILLER et al., 1994; BYRD e TOMBERLIN, 2019).

Recentemente, os hidrocarbonetos cuticulares têm se mostrado uma ferramenta interessante na ciência forense (AMENDT et al., 2010); estudos demonstraram que a composição do perfil de hidrocarboneto da cutícula de larvas ou pupas não é fixa, mas muda com o tempo. Se essas alterações ocorrerem como parte do desenvolvimento de larvas em adultos e se puderem ser incorporadas a um modelo, esses hidrocarbonetos podem se tornar muito úteis para estimar a idade de uma larva ou pupa e, portanto, aumentar a precisão do IPM (ZHU et al., 2006, 2007; YE et al., 2007; ROUX et al., 2009; AMENDT et al., 2010).

Nos insetos, o olfato é de extrema importância em diferentes estágios da vida, utilizado para localizar alimento ou substratos para oviposição, assim como na interação com outros indivíduos durante a procura por parceiros sexuais (HANSSON, 1999). A capacidade de localização do alimento em dípteros deve-se a órgãos sensitivos altamente adaptados para a detecção de odores, as sensilas, presentes nas antenas (SHIELDS e HILDEBRAND, 2001; JOHNSON e BORROR, 2005). Cada sensila abriga dendritos que detectam substâncias químicas voláteis (SHIELDS e HILDEBRAND, 2001); esses dendritos inserem informações diretamente no sistema nervoso central e isso induz a uma resposta comportamental no inseto (HANSSON, 2002; ZHOU et al., 2004). Em moscas-varejeiras, essas estruturas são bem desenvolvidas, já que esses insetos estão entre os principais consumidores de carcaça (REED, 1958; BRAACK, 1987; MOHR e TOMBERLIN, 2014) e são geralmente os primeiros a chegar após a morte e permanecer no local durante os estágios de decomposição (CATTS e GOFF, 1992; LECCESE, 2004; SILVA et al., 2014).

A maioria dos insetos responde não apenas a compostos isolados, mas também a misturas de compostos. Com a combinação correta de compostos, plantas ou animais são reconhecidos como hospedeiros (BRUCE et al., 2005). Os insetos também detectam gradientes químicos, fornecendo informações vitais sobre a localização de uma fonte de odor (VICKERS, 2000). Eles detectam compostos químicos voláteis que indicam a adequação do hospedeiro e também a presença de potenciais predadores ou competidores (PICKETT et al., 1998; SHIELDS e HILDEBRAND, 2001).

Os compostos captados pelas antenas são chamados de semioquímicos, voláteis por natureza que podem ser detectados a longas distâncias por diferentes organismos (SELBY,

2004). A palavra “semioquímico” é ampla e refere-se não somente às substâncias químicas responsáveis pelo fornecimento de informação, mas também às toxinas; por esse motivo, é mais adequado o uso da palavra “infoquímico”, quando se quer tratar apenas de substâncias químicas envolvidas no processo de comunicação (VILELA e DELLA LÚCIA, 2001). Os infoquímicos são classificados funcionalmente em dois grupos principais, feromônios e aleloquímicos (NORDLUND e LEWIS, 1976; BLIGHT, 1990; ZARBIN et al., 2009). Os feromônios são compostos que causam interações entre indivíduos da mesma espécie (intraespecíficas), como por exemplo, feromônios de acasalamento, marcadores de trilha, alarme, dispersão, oviposição e agregação (NORDLUND e LEWIS, 1976; AGELOPOULOS et al., 1999), enquanto os aleloquímicos geram interações entre espécies diferentes (interespecíficas) e são divididos em quatro subgrupos: alomônios, cairomônios, sinomônios e apneumônios (AGELOPOULOS et al., 1999).

A primeira parte da sequência do processo de colonização pelas moscas-varejeiras começa com os aleloquímicos, em especial os apneumônios, pois eles são os voláteis liberados durante a decomposição de hospedeiros vertebrados não vivos, como por exemplo as carcaças, que permitem às moscas localizá-las, aumentando as chances de encontrar um sítio de oviposição adequado, um parceiro sexual, e alimento para a progênie (SMITH, 1986). A decomposição começa quase que imediatamente após a morte e acredita-se que os semioquímicos sejam produzidos logo no início (VASS et al., 1992; DIX e GRAHAM, 1999; VASS et al., 2002; DENT et al., 2004). A putrefação ocorre quando as bactérias, já presentes no intestino grosso, destroem os tecidos moles, resultando na produção de líquidos e gases (sulfeto de hidrogênio, dióxido de carbono, metano, amônia, dióxido de enxofre e hidrogênio) (VASS, 2001). Além desses gases, uma grande variedade de compostos orgânicos voláteis, os “VOCs”, são produzidos (STATHEROPOULOS et al., 2005), mais especificamente, os “BVOCs” (bacterial volatile organic compounds ou compostos orgânicos voláteis bacterianos), que são considerados a comunicação química entre micro-organismos e insetos (LEROY et al., 2011; ENGL e KALTENPOTH, 2018).

Muitos compostos produzidos durante a decomposição de vertebrados já foram relatados nos vertebrados e, aparentemente, voláteis diferentes são percebidos por califorídeos diferentes (PACZKOWSKI e SCHÜTZ, 2011) e através dos voláteis emitidos pela carcaça, as moscas são capazes de perceber substratos em diferentes períodos de decomposição, mesmo sem contato visual ou gustativo (JOHANSEN et al., 2013).

Em *Lucilia cuprina* e *L. sericata* (Meigen), por exemplo, a orientação até o substrato é mediada principalmente por compostos ricos em enxofre, em *L. sericata*, particularmente por uma mistura de dimetil trissulfeto etanotiol e sulfito de hidrogênio, produzidos por infecções bacterianas no hospedeiro (ASHWORTH e WALL, 1994; WALL e FISHER, 2001). Compostos sulfurosos também são atrativos para *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (AAK et al., 2010; AAK et al., 2011; PACZKOWSKI e SCHÜTZ, 2011), enquanto altos níveis de ácidos, característicos de estágios avançados da decomposição, parecem atrair *Phormia regina* (Meigen), que aparece na carcaça após dias (ERZINÇLIOĞLU, 1996; BYRD e TOMBERLIN, 2019). *Musca autumnalis* (De Geer), *Haematobia irritans* (Linnaeus), *Hydrotaea irritans* (Fallen), *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus) e *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner), todas parasitas de gado, mostraram respostas frente à 1-octen-3-ol, 6-metil-5-hepten-2-ona, (Z)-3-hexen-1-ol e ao naftaleno, entre outros (BIRKETT et al., 2004). *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) e *Lucilia sericata* são atraídas por dissulfureto de dimetilo, trissulfureto de dimetilo, fenol, p-cresol e indol, todos produzidos por bactérias isoladas de feridas de animais (CHAUDHURY et al., 2015; ZHU et al., 2017).

Muitas vezes, não é necessário o atrator ser um “BVOC” produzido pela decomposição da carcaça; muitos estudos indicam que a simples presença de bactérias pode ativar uma resposta de atração (CHAUDHURY et al., 2012; WELCH e ALVAREZ, 2002; TOMBERLIN et al., 2017). Estudos anteriores demonstraram que espécies diferentes de moscas preferem depositar ovos em ambientes ricos em micro-organismos, em oposição a ambientes estéreis e que a espécie e a quantidade de bactéria podem alterar drasticamente a oviposição no substrato, o que pode influenciar significativamente o desenvolvimento, tamanho e composição de uma massa larval (DEVANEY et al., 1973; HOUGH et al., 1981, 1982; HOUGH-GOLDSTEIN e BASSLER, 1988).

Dois mecanismos potenciais de atração mediados por bactérias já foram identificados: 1) secreção de compostos que atraem diretamente insetos (citados anteriormente) e 2) secreção de substâncias de “acondicionamento” no substrato para aumentar a atração. Além dos compostos, também foi demonstrado que as bactérias secretam proteínas (LAUZON et al., 2000; ROBACKER e LAUZON, 2002) e metabólitos (EMMENS e MURRAY, 1982; EISEMANN e RICE, 1987; HAMMACK, 1990; CHAUDHURY et al., 2010) que atuam no recrutamento de fêmeas grávidas.

Uma cultura combinada de *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *P. vulgaris* e *Providencia rettgeri* (esta última, sendo atrativa até mesmo sozinha) se mostrou altamente

atrativa para *C. hominivorax* (EDDY et al., 1975). *Cochliomyia macellaria* pousa mais em substratos contendo *P. mirabilis* (CHAUDHURY et al., 2016), que também é atrativa para *Lucilia cuprina* e *L. sericata* (EMMENS e MURRAY, 1982; MA et al., 2012), assim como para *Calliphora stygia* (Fabricius) e *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (MORRIS et al., 1998). Armadilhas de controle biológico com culturas de *Proteus mirabilis* e *Morganella morganii* atraíram mais indivíduos de *Phormia regina* do que armadilhas contendo apenas ágar esterilizado (URIEL et al., 2020). Owings et al. (2009) sugerem uma tendência maior de visitas em armadilhas de fígado bovino que não é tratado com antibióticos. *Klebsiella spp.* e *Bacillus subtilis* produzem compostos não-sulfurosos como acetato de etila, tetrametilpirazina e n-haptanal que são atrativos para *Lucilia cuprina* (EMMENS e MURRAY, 1982).

Embora existam substâncias ou micro-organismos que ajam, supostamente, como atrativos, outros podem ter o efeito contrário no comportamento do inseto. Por exemplo, Birkett et al. (2004) e Logan et al. (2008, 2009) constaram que quando hospedeiros vertebrados não são atrativos para os insetos, há elevados níveis de certos semioquímicos que podem agir como repelentes, possivelmente “mascarando” os componentes de atração, ou seja, reduzindo a sensibilidade das moscas-varejeiras a esses atrativos. Altos níveis de ácidos, por exemplo, reduzem a atração e o pouso de *Calliphora vicina* sobre o substrato (AAK et al., 2010b; AAK et al., 2011; PACZKOWSKI e SCHÜTZ, 2011).

Além da atratividade olfativa do substrato ter um papel fundamental na escolha do sítio de oviposição (BROWNE, 1960), o valor nutricional do mesmo e a qualidade, podem influenciar na decisão de postura (ZUCOLOTO, 1991). As espécies *Calliphora vicina* e *C. megacephala* têm preferências distintas por substratos: a primeira prefere ovipor em mamíferos, enquanto a segunda opta por peixe (ERZINÇLIOĞLU, 1996; KNEIDEL, 1984; ESSER, 1990, 1991). *Lucilia cuprina* deposita seus ovos preferencialmente em cavidades com lã úmida nas ovelhas (VARTIB-BROWNE, 1958), mas *Lucilia sericata* parece não demonstrar preferência por nenhum tipo de substrato (SILVA; ZANETTE; MONTEIRO, 2008). No entanto, o valor nutricional da carcaça, como um todo, pode mudar rapidamente como resultado da decomposição e alimentação larval, e dessa maneira, as fêmeas que chegaram depois vão ter que selecionar locais diferentes dos previamente selecionados por outras, para que sua prole tenha um desenvolvimento adequado (ARCHER e ELGAR, 2003).

Kennedy et al. (1959a, 1959b, 1961a, 1961b) e outros autores afirmam que a detecção e posterior aceitação do meio de oviposição envolvem atratividade olfativa e também a visual,

em conjunto (SPIVAK et al., 1991; WALL e FISHER, 2001). A visão é outro sentido importante para os insetos, mas a capacidade visual de um inseto geralmente não é tão importante quanto sua capacidade olfativa. Insetos enxergam com olhos compostos, sendo que cada olho é composto por um número de omatídeos, que varia de acordo com a espécie e o sexo (RIVERS e DAHLEM, 2014). Uma vez próximas ao substrato alimentar, as moscas adultas vão avaliar sua dimensão, e em seguida, pistas visuais irão auxiliar no pouso: em *C. megacephala*, o odor do substrato parece orientá-las até a fonte, mas a decisão do pouso está mais fortemente ligada com a presença ou não de algo visualmente destacado (GOMES et al., 2007). *Lucilia sericata* também se orienta por compostos liberados pelo substrato, mas escolhe pousar nos locais que possuem pistas visuais mais escuras (vermelho e preto) (BRODIE et al., 2014). Muitas espécies que colonizam cadáveres humanos tendem a observar locais no corpo com sinais de trauma ou com presença de pelos e orifícios naturais, como boca, cavidades nasais e ânus (BYRD e TOMBERLIN, 2019).

Alcançada a fonte de odor, depois de uma análise olfativa e visual, as moscas avaliam o substrato através de receptores existentes no labelo, tarso e ovipositor (WALLIS, 1962; ERZINÇLIOĞLU, 1996). Os estímulos, nesse momento, são causados por substâncias no estado líquido ou por soluções com concentrações relativamente altas ao entrar em contato direto com o inseto. Esse processo é chamado de quimiorrecepção e também é realizado por sensilas, que diferem das sensilas olfativas (estruturalmente), pois possuem menos células sensoriais. A quimiorrecepção por contato tem grande importância no reconhecimento final do alimento, do local de oviposição e da escolha do parceiro (CHAPMAN e CHAPMAN, 1998).

Estudos de quimiorrecepção em Diptera mostram que as pernas de diversas moscas como *Calliphora vicina*, *Phormia regina* e *M. domestica* possuem função gustativa (WOLK, 1978; LAKES e POLLACK, 1990). Estudos eletrofisiológicos indicam que os insetos conseguem diferenciar substâncias doces, salgadas, ácidas e amargas; *Phormia regina* protraí sua probóscide quando seu tricórdio é estimulado com açúcar e prefere ovipor em locais com sacarose (NAKAGAWA et al., 1994). Misturas e diferentes concentrações dessas substâncias estimulam o inseto em níveis diferentes (CHAPMAN e CHAPMAN, 1998). A última espécie citada possui sensilas com quatro células quimiorreceptoras de contato e uma célula mecanorreceptora em seu labelo. Três das quatro células são chamadas receptoras de açúcar, sal e de água, respectivamente, e acredita-se que a quarta célula identifique substâncias alimentares tóxicas (OZAKI et al., 2003). Em *Musca autumnalis*, células sensoriais são

encontradas na região anal e do ovipositor, com possível função olfativa (HOOPER et al., 1972).

Lucilia cuprina possui 22 sensilas localizadas próximas ao ovipositor, dois pelos táteis longos, cinco pelos táteis médios, sete pelos táteis pequenos, uma sensila campaniforme, duas olfativas e cinco pelos gustativos, que parecem funcionar como quimiorreceptores de contato, participando na regulação do comportamento de deposição de ovos (RICE, 1976). Essa espécie tende a depositar seus ovos em locais úmidos, via detecção de umidade, colocando receptores presentes no tarso em contato com o substrato (ARCHER e ELGAR, 2003) e também em locais presentes com compostos ricos em amônia (ASHWORTH e WALL, 1994; BRODIE et al., 2015). O mesmo parece ocorrer em *P. regina*, *Chrysomya nigripes* (Aubertin) e *C. megacephala* (WALLIS, 1962; NGERN-KLUN et al., 2007; CHAIWONG et al., 2008).

Em *C. megacephala* existem cinco tipos de sensila na antena, três na probóscide e ovipositor, duas na cabeça e perna e apenas uma na asa, incluindo mecanorreceptores por todo o corpo (LI et al., 2016). Já *Chrysomya nigripes* tem quatro tipos diferentes de sensila na região do ovipositor (NGERN-KLUN et al., 2007). Soluções salinas e alcalinas também estimulam a oviposição, sendo detectadas por órgãos sensoriais presentes no ovipositor das fêmeas (WALLIS, 1962; EMMENS e MURRAY, 1983).

Toda essa meticulosa análise do substrato para oviposição é feita para selecionar um local que favoreça a progênie, provendo proteção contra dessecação e inimigos naturais, além do fornecimento do alimento (ARCHER e ELGAR, 2003). Como dito anteriormente, as moscas-varejeiras buscam feridas ou cavidades no substrato ou na carcaça, pois esses locais são geralmente mais úmidos e impedem a dessecação das larvas. Além da proteção, o fornecimento de um alimento adequado e o conteúdo deste é muito importante, e as bactérias também parecem ter um papel fundamental nas larvas, muitas delas têm relações mutualísticas com os califorídeos (TOMBERLIN et al., 2017).

Larvas de moscas-varejeiras já mostraram ser dependentes de bactérias e seus metabólitos para crescimento e desenvolvimento (SCHMIDTMANN e MARTIN, 1992; ZUREK et al., 2000). Na maioria dos estudos, as larvas mostram melhores taxas de desenvolvimento em ambientes não esterilizados ou com uma mistura de bactérias, sendo que algumas espécies de bactérias intensificam o desenvolvimento e as taxas de sobrevivência de diferentes espécies de moscas: *Escherichia coli* e *Lactobacillus plantarum* em *Musca*

autumnalis (HOLLIS et al., 1985); *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus sp. e. coli* em *Musca domestica* (SCHMIDTMANN e MARTIN, 1992; WATSON et al., 1993; ZUREK et al., 2000) e *Acinetobacter sp.*, *Flavobacterium odoratum*, *Citrobacter freundii* e *Serratia fanticola* em *Stomoxys calcitrans* (LYSYK et al., 1999; ROMERO et al., 2006).

Zurek et al. (2000) sugerem que diferentes bactérias auxiliam estágios diferentes de desenvolvimento na mosca-doméstica: *Bacillus sp.*, *Staphylococcus lentus*, *Lactococcus garviae* entre 13 outras, ajudam no crescimento larval até a fase de pupa, enquanto *Streptococcus sanguis* e *Sphingobacterium spiritivorum* ajudam no crescimento até a fase adulta. Outra maneira de auxiliar no desenvolvimento é protegendo os imaturos de bactérias patogênicas; *Proteus mirabilis* aumenta o pH do substrato reduzindo o número de outros organismos, sendo que essa bactéria é assimilada pela larva e permanece no trato digestivo de *L. sericata* durante a fase adulta (TOMBERLIN et al., 2017).

Aparentemente, a taxa acelerada de peristaltismo ao longo das regiões do intestino anterior e do intestino médio, durante a alimentação larval, seja responsável pela assimilação e rápida disseminação das bactérias nos insetos (GRENBERG e KUNICH, 2002), porém há poucos dados sobre o(s) mecanismo(s) específico(s) através dos quais os insetos adquirem esses simbiontes (THOMPSON et al., 2013).

Após escolher o substrato, o processo de oviposição começa. As posturas de ovos de moscas-varejeiras são geralmente agregadas; Esser (1990, 1991) e Lima (2016) confirmaram que locais com ovos frescos de *C. megacephala* atraem de maneira mais eficiente outras fêmeas do que substratos sem ovos; a preferência é tão marcante que geralmente depositam mais ovos ou larvas do que o recurso pode suportar (LIMA e VON ZUBEN, 2016). *Lucilia cuprina*, *Musca autumnalis*, *Musca domestica*, *Lucilia sericata* e *Phormia regina* realizam o mesmo comportamento (BARNHART e CHADWICK, 1953; BAY e PITTS, 1977; A FENTON et al., 1999; BRODIE et al., 2015).

Esse comportamento de agregação pode apresentar tanto consequências positivas como negativas para a progênie (RIVER et al., 2011). Alguns pontos positivos são: a digestão cooperativa, pois uma grande massa larval quebra e consome os tecidos da carcaça mais rapidamente do que indivíduos isolados ou massas menores (BYRD e TOMBERLIN, 2019), a regulação de temperatura, resultado do calor produzido pelas massas, que parece aumentar a taxa metabólica (WIGGLESWORTH, 2012) e, portanto, a assimilação do alimento (HANSKI,

1976, 1977; WILLIAMS e RICHARDSON, 1984) e, finalmente, proteção contra predadores e parasitos (RIVERS; THOMPSON; BROGAN, 2011).

Como pontos negativos de uma oviposição muito agregada, pode-se citar a atração química que esses ovos têm frente a predadores e parasitos, pois os mesmos semioquímicos que provocam a agregações intraespecíficas podem chamar a atenção de uma variedade de insetos (BYRD e CASTNER, 2001; VOSS et al., 2009); o estresse térmico, já que à medida que a massa larval aumenta de tamanho, larvas individuais podem ser expostas a temperaturas crescentes que se aproximam dos limites superiores da zona de tolerância específicos da espécie (WITHERS, 1992; RICHARDS e VILLET, 2008), sendo que antes mesmo de atingir esse limite, as larvas já podem sentir sinais deletérios (FEDER et al., 1997) e a superpopulação, que significa diminuição da disponibilidade de alimentos por indivíduo, o que, por sua vez, deve aumentar o tempo de desenvolvimento larval, pois afeta o tempo necessário para adquirir o peso/nutrientes críticos associados à próxima muda. Algumas vezes, a superpopulação pode acelerar o tempo de desenvolvimento (IRELAND e TURNER, 2006), mas sempre vai gerar indivíduos menores (Ullyett, 1950; WILLIAMS e RICHARDSON, 1984; SAUNDERS et al., 1999).

A(s) causa(s) do processo de agregação é(são) discutível(eis), sendo que alguns autores afirmam que isso acontece devido a (1) feromônios produzidos nos ovários das primeiras fêmeas a depositarem ovos, que se mantêm associados aos ovos, tornando-os atrativos a outras (JIANG et al., 2002); já LAM et al. (2007) afirmam que a concentração populacional de uma bactéria (*Klebsiella oxytoca*) transmitida pela fêmea para o ovo regula a atratividade de oviposição intraespecífica; (2) feromônios produzidos e liberados por fêmeas no momento da oviposição que estimulam outras a depositar seus ovos em locais próximos, no mesmo substrato (NORRIS, 1965; BROWNE, 1960; HANSKI, 1987), como por exemplo no caso de *M. domestica* (BARNHART e CHADWICK, 1953); (3) Emmens (1981) relatou que extratos cuticulares de *L. cuprina* têm um papel na oviposição em grupo; (4) semioquímicos provenientes de micro-organismos ou enzimas digestivas produzidos/localizados na glândula salivar de fêmeas que se alimentam no local (TELFORD et al., 2012; BRODIE et al., 2015) ou (5) possivelmente, como ocorre em outros dípteros, por voláteis produzidos por micro-organismos associados aos ovos depositados por outras fêmeas (HOUGH et al., 1982; JUDD e BORDEN, 1992), sendo que há poucas evidências desse processo em califorídeos, mas existem dados indicando que fêmeas de *Chrysomya rufifacies* e *Cochliomyia macellaria* usam pistas das primeiras colonizadoras para avaliar a qualidade dos recursos e que essas pistas podem ser

provenientes da fisiologia do ovo ou de semioquímicos produzidos por bactérias, ou uma combinação dos dois (BRUNDAGE, 2012).

Independentemente da localização dos micro-organismos ou da origem dos semioquímicos atrativos ou repelentes, a forte influência deles na regulação da oviposição (colonização inicial ou agregação) em Diptera e outras ordens é amplamente conhecida: na mosca da couve, *Delia radicum* (Linnaeus), sinais químicos voláteis do complexo substrato-raiz contendo micro-organismos associados à decomposição da planta estimulam a oviposição (KOSTAL et al., 2000); em *Delia platura* (Meigen), bactérias específicas como *Flavobacterium sp.*, *Erwinia herbicola* e *Xanthomonas* também estimulam a deposição de ovos; os odores provaram ser o fator atrativo, pois as fêmeas preferiam substratos inoculados, mesmo na ausência de contato direto (HOUGH-GOLDSTEIN e BASSLER, 1988); a oviposição agregada por *Delia antiqua* (Meigen) é causada por estímulos associados à oviposição de fêmeas, ovos recém-depositados ou ambos (JUDD e BORDEN, 1992); fêmeas de *Rhagoletis pomonella* (Walsh) são atraídas por compostos bacterianos produzidos na maçã, e essas mesmas bactérias são encontradas no trato digestivo da mosca, indicando que ela pode ser transferida de uma fruta para outra, atraindo novas fêmeas (LAUZON et al., 1998); essa atratividade e agregação por odores microbianos também parece ser bastante difundida e conhecida em moscas *Drosophila* (BARKER e STARMER, 1999).

Outros insetos demonstram comportamento semelhante: *Blattella germanica* (Linnaeus), por exemplo, tem seu comportamento de agregação, que serve para acelerar desenvolvimento e maturação da ninfa, controlado por semioquímicos produzidos por bactérias presentes em seu intestino; esse processo se chama agregação fecal (WADA-KATSUMATA et al., 2015).

A presença de bactérias no ovo pode não ser somente um sinal de regulação de oviposição, mas pode também ser benéfica para a futura larva. Algumas bactérias isoladas ou grupos de bactérias presentes nos ovos de *M. domestica* conseguem impedir o crescimento de fungos no substrato, por depleção de nutrientes ou pela liberação de metabólitos antifúngicos (LAM et al., 2009). Goebel e Brundage (2017) sugerem que a esterilização de ovos de *L. cuprina* por agitação ocasiona taxas de eclosão significativamente mais baixas do que os ovos que não sofreram esse processo, o que pode estar relacionado ao papel de proteção que essas bactérias desempenham contra patógenos ou predadores. Por exemplo, as larvas de *Plautia stali* (Scott) (Pentatomidae) morrem devido a infecções oportunistas causadas por fungos e bactérias quando privadas de micro-organismos, ao eclodirem de ovos esterilizados (ABE; MISHIRO;

TAKANASHI, 1995). Besouros do gênero *Paederus* produzem uma substância, a pederina, que evita ataques do seu predador a sua larva; esse composto é produzido por endossimbiontes que são transmitidos às superfícies de seus ovos (KELLNER, 1997, 1998, 1999).

Como já é de conhecimento, níveis elevados de agregação podem causar condições desfavoráveis para as larvas e futuros adultos (DE JONG, 1976; JONG, 1978; RIVERS et al., 2011; LIMA e VON ZUBEN, 2016) e, portanto, é provável que as fêmeas de alguns insetos sejam capazes de avaliar o substrato, diminuindo o tamanho de suas oviposições em locais muito saturados com ovos ou larvas, ou procurando outro local para ovipor (IVES, 1991).

A mesma bactéria que atrai novas fêmeas de *M. domestica* a depositarem ovos em locais com ovos frescos, *Klebsiella oxytoca*, também emite sinais que indicam idade avançada dos ovos e sua presença no local, fazendo com que a mosca procure outro local para ovipor (LAM et al., 2007). Não é interessante para a fêmea ovipor em locais colonizados há algum tempo, pois seus ovos podem servir de alimento para a prole estabelecida inicialmente. Moscas de fruta de cerejeira, *Rhagoletis cerasi* (Linnaeus) e da maçã, *Rhagoletis pomonella*, colocam feromônios que imediatamente desencorajam outros indivíduos, que entraram em contato com essa substância, a oviporem, eles são chamados de “Oviposition Deterrent Pheromones” (ODP) (AVERILL e PROKOPY, 1987; STÄDLER et al., 1994). A mosca-de-fruta *Ceratitis capitata* (Wiedemann) deposita extratos metanólicos na superfície do local para impedir oviposições coespecíficas (ARREDONDO e DÍAZ-FLEISCHER, 2006); *Atherigona soccata* (Rondani) e *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) têm comportamento semelhante (RAINA, 1981; PROKOPY et al., 1982).

Pode-se observar relatos parecidos em Lepidoptera. A oviposição de *Lobesia botrana* (Denis e Schiffermüller) pode ser inibida por ácidos graxos e ésteres de ácidos graxos extraídos do ovo da própria espécie (THIÉRY et al., 1992); *Choristoneura rosaceana* (Harris) evita ovipor em locais já colonizados para evitar superpopulação (POIRIER e BORDEN, 1991); às vezes, os compostos de uma espécie podem bloquear oviposições de várias outras, sendo o caso de compostos encontrados em ovos de *Ostrinia nubilalis* (Hübner), que inibem o comportamento de *Aphomia sociella* (Linnaeus), *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) e *Lobesia botrana* (Denis e Schiffermüller) (THIÉRY et al., 1992).

Algumas espécies de Coleoptera também produzem “ODPs”: *Lasioderma serricorne* (Fabricius), *Callosobruchus maculatus* (Fabricius), *Monochamus alternatus* (Hope) e algumas espécies de *Coccinella* depositam essas substâncias para espaçar as oviposições e diminuir as

taxas de competição intraespecífica (KOHNO et al., 1986; MESSINA et al., 1987; CREDLAND e WRIGHT, 1990; IMAI et al., 1990; ANBUTSU e TOGASHI, 1996; MISHRA et al., 2012)

Todos os semioquímicos citados, sejam voláteis ou reconhecidos apenas por contato direto (semi-voláteis ou não voláteis), têm a intensidade de suas mensagens diminuída com o passar do tempo, sendo mensagens com função atrativa ou de repelência, ou seja, suas concentrações são geralmente alteradas com o tempo, através da evaporação ou degradação do composto (HÖLLER et al., 1991; HURST et al., 1998)

Além da importância na entomologia forense, os hidrocarbonetos que são encontrados em todos os estágios de vida dos artrópodes têm a função primária de proteção contra dessecação (LOCKEY, 1988), também podem ser usados na identificação intraespecífica (SINGER, 1998; BLOMQUIST e BAGNÈRES, 2010) e como sinais de regulação reprodutiva, sinais, muitas vezes, associados e transmitidos pelos ovos (ENDLER et al., 2004).

Sabe-se que *L. cuprina* parece atrair outras fêmeas com um lipídio cuticular (EMMENS, 1981), mas outros grupos podem agir de maneira diferente. Por exemplo, alguns cupins possuem lisozima em seus ovos, que funcionam como um feromônio de reconhecimento de ovos de cupins (TERP); os operários reconhecem esses ovos e iniciam seu transporte e “grooming” na colônia (MATSUURA et al., 2007). A formiga *Dinoponera quadriceps* (Santschi) consegue discriminar membros adultos e ovos coespecíficos com auxílio de hidrocarbonetos (TANNURE-NASCIMENTO et al., 2009), sendo que *Formica fusca* (Linnaeus) apresenta um comportamento parecido (HELANTERÄ et al., 2014).

Em dípteros, a existência e o papel de feromônios, aleloquímicos, micro-organismos e hidrocarbonetos originados em ovos ou substratos foi demonstrada em algumas famílias (ANDERSON, 2002; MCCALL, 2002; WERTHEIM et al., 2005) e ainda que existam muitas informações a respeito disso em Calliphoridae, é necessário conhecer mais detalhes sobre a comunidade bacteriana e a diversidade de semioquímicos encontrados nos ovos e nos ovários de espécies como *C. megacephala* e *C. albiceps*, (Wiedemann) que possam afetar o comportamento de oviposição, de agregação e de escolha do substrato pelas fêmeas adultas.

1.1 *Chrysomya megacephala*

Chrysomya megacephala, originária da Australásia, foi introduzida acidentalmente no Continente Americano, provavelmente, através de navios (GUIMARÃES et al., 1978; GUIMARÃES et al., 1979), tendo sido descoberta no Sudeste brasileiro nos anos 70 junto com *C. albiceps* e *C. putoria* (Wiedemann) (IMBIRIBA et al., 1977; GUIMARÃES et al., 1978; GUIMARÃES et al., 1979).

O adulto apresenta uma coloração azul-verde metálica em seu tórax e abdômen e seus olhos compostos na tonalidade vermelha (CARVALHO e MELLO-PATIU, 2008). Tem desenvolvimento holometábolo, apresentando quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto (TRIPLEHORN e JOHNSON, 2011). O tempo de vida varia de um a dois meses, desde estágio de ovo até adulto (GABRE et al., 2005; BARROS-CORDEIRO e PUJOL-LUZ, 2010).

Essa espécie está associada principalmente à matéria orgânica em decomposição em áreas urbanas, sendo considerada assim uma espécie sinantrópica (D'ALMEIDA e D'ALMEIDA, 1993; MENDES e LINHARES, 1993; CAMPOS e BARROS, 1995; D'ALMEIDA e ALMEIDA, 1998). São moscas-varejeiras comuns perto de habitações humanas e causam incômodo em mercados de carne e peixe, matadouros, latrinas e fossas (SMITH, 1986).

Em condições laboratoriais, essa espécie pode se desenvolver em uma variedade de substratos como bacalhau, sapos, rãs, lagartos, e pombos (ROY e DASGUPTA, 1971; ESSER, 1990, 1991), mas também pode ser atraída por frutas, alimentos doces, urina e fezes (BYRD e TOMBERLIN, 2019). No Brasil, D'Almeida (1986, 1988, 1989, 1993) concluiu que tanto em áreas urbana, rural e litorânea, *C. megacephala* prefere depositar seus ovos em sardinha e fígado.

Embora não possua o mesmo status de peste no Brasil como em outros países, *C. megacephala*, assim como outros integrantes do gênero *Chrysomya*, possui importância forense (WELLS e GREENBERG, 1992; VON ZUBEN et al., 1996; CARVALHO et al., 2000) e médico-veterinária (ZUMPT, 1965; FURLANETTO; CAMPOS; HARSÍ, 1984; GUIMARÃES et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2002).

1.2 *Chrysomya albiceps*

Muito comum e abundante no sul da Europa, regiões Afrotropical, Oriental (da Índia à China) e Neotropical (América Central e do Sul) (HALL e SMITH, 1993), *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) também se encontra na região Paleártica (RAFAEL, 2012).

Essa espécie apresenta coloração verde-metálica, gena branca amarelada, e o que a diferencia de *C. megacephala*, principalmente, é o espiráculo anterior que é mais claro; suas larvas (“larvas peludas”) são muito semelhantes às de *C. rufifacies* e são morfologicamente muito distintas de todas as outras larvas de Calliphoridae, possuindo saliências proeminentes ao longo do corpo (CARVALHO e MELLO-PATIU, 2008).

Devido à alta capacidade reprodutiva e agressividade das larvas dessa espécie, ela tem apresentado vantagens sobre espécies nativas, especialmente *Cochliomyia* e *Lucilia*, sendo que a agressividade das larvas é tanta que elas podem preda larvas de *C. megacephala*, *C. putoria* e, em alguns casos, se tornarem canibais (FARIA et al., 1999; RAFAEL, 2012).

Chrysomya albiceps tem sido relatada como agente de miíase, especialmente em bovinos (LEITE et al., 1983) e frequentemente provoca miíase secundária em ovelhas, após uma colonização inicial por *Lucilia sp.*, mas os casos de miíase em humanos não são conhecidos (ZUMPT, 1965; GRASSBERGER et al., 2003). Há bastante tempo é considerada uma ferramenta importante para a Entomologia Forense (OLIVEIRA-COSTA, 2008; BYRD e TOMBERLIN, 2019).

2 OBJETIVOS

Utilizando como exemplares espécies de *C. megacephala* e *C. albiceps*, o principal objetivo do trabalho foi:

— Analisar se existe compostos químicos ou micro-organismos que possam participar na regulação do comportamento de oviposição dessas moscas-varejeiras. Para isso, foi necessário observar se (1) extratos de ovos e de ovários, em diferentes solventes e períodos de desenvolvimento, desempenham papel atrativo frente às fêmeas; e, (2) em caso positivo de atração, traçar o perfil químico dos ovários e da superfície dos ovos em cromatografia gasosa para identificar os compostos que possam desempenhar funções atrativas ou participar do comportamento de oviposição; e por fim (3), descrever a comunidade bacteriana dos ovários e das superfícies dos ovos e descobrir possíveis bactérias que possam influenciar no comportamento de atração e oviposição nas espécies.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e manutenção dos indivíduos

Exemplares de *C. megacephala* e *C. albiceps* foram coletados nos arredores do Instituto de Biociências (IB) da UNESP, em Rio Claro, SP, Brasil, (22°23'48.5"S - 47°32'52.4"O) utilizando uma armadilha com matéria orgânica em decomposição (carne moída bovina) como isca (Figura 1). Os exemplares foram separados e mantidos em gaiolas teladas (30 x 30 x 30 cm) (Figura 1) em sala climatizada com temperatura de 27 ± 1 °C, 60% de umidade relativa e fotófase de 12 horas. Água e açúcar foram administrados *ad libitum*.

Para a criação de novas gerações, as fêmeas adultas coletadas foram alimentadas com uma mistura de levedo de cerveja, leite em pó e açúcar (1:1:1) por quatro dias e fígado bovino fresco por mais dois dias. Após mais seis dias, o ciclo gonotrófico se completava (LINHARES, 1988). Para coleta de oviposição dessa geração, carne moída foi utilizada.

Os ovos foram separados e colocados em frascos de vidros de aproximadamente 750 ml, também contendo carne moída (Figura 1). Os mesmos foram tampados com organza e mantidos em câmaras climáticas (B.O.D.s). Para *C. megacephala*, a temperatura da câmara ficava constante em 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12h; já em *C. albiceps*, para cada nova geração criada, dois frascos eram feitos e um deles era mantido em 22 ± 1 °C e o outro em 27 ± 1 °C, ambos com fotoperíodo de 12h. Essa diferença no processo de criação foi necessária, pois *C. albiceps*, de acordo com observações feitas no laboratório, necessita de uma temperatura mais baixa para desenvolver machos e mais alta para o desenvolvimento de fêmeas, enquanto *C. megacephala* parece respeitar a razão sexual de 50% a 25 °C. Em seguida, ao atingirem o terceiro instar, as larvas foram transferidas para potes maiores, de aproximadamente 2,5 litros, contendo serragem de madeira e novamente levados à câmara climática, que ficaram nas mesmas temperaturas das larvas.

Quando o estágio de pupa foi atingido, estas foram transferidas para as gaiolas teladas na sala climatizada, encerrando o ciclo de criação. A fim de manter a padronização nos resultados, apenas as gerações F2 e F3 foram utilizadas nos experimentos, por estas serem progênies de uma geração cujo desenvolvimento ocorreu inteiramente em condições laboratoriais controladas.



Figura 1 Armadilha com carne moída em decomposição utilizada na captura da geração parental (esquerda), gaiola utilizada para armazenar os adultos (canto superior direito) e frasco de vidro com carne moída para desenvolvimento dos imaturos na câmara climática (Fonte: Thiago de Lima).

3.2 Coleta dos extratos de ovários e ovos

Dez fêmeas grávidas (11 dias depois do primeiro contato com fonte proteica) foram anestesiadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos. Após esse período, os ovários foram removidos e colocados à temperatura ambiente ($25\text{-}27\text{ }^{\circ}\text{C}$) por cinco minutos. Dessa maneira, pode-se considerar que os ovários estavam frescos.

Depois desses cinco minutos, 10 ovários foram colocados em um frasco (10 ml), e o solvente foi adicionado (2 ml). Após 10 minutos, o solvente foi removido e colocado em um *vial* de 2 ml. Duas extrações foram realizadas, uma com 2 ml de éter dietílico (composto polar) e outra com 2 ml de hexano (composto apolar) para cada espécie. Os extratos foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso. Ao todo, foram feitos 2 *vials* de extrato de ovário para cada espécie, 1 *vial* com 2 ml de éter e outro com 2 ml de hexano.

Para isolar os compostos dos ovos, o processo foi muito semelhante. Massas de ovos frescos (0,4-0,5 g) foram coletadas imediatamente após a oviposição. Cada massa de ovo ficou exposta ao ambiente por um determinado tempo a $25\text{-}27\text{ }^{\circ}\text{C}$: 0 h (5 minutos), 5 h e 10 h; depois disso, cada massa foi colocada em um frasco de 10 ml, e o solvente foi adicionado. Duas extrações foram realizadas, uma com 2 ml de éter e outra com 2 ml de hexano, para cada tempo

por espécie. Os extratos também foram armazenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o uso em *vials* de 2 ml. Ao todo, foram feitos 6 *vials* para cada espécie de mosca-varejeira (2 ml de 0 h, 5 h e 10 h de éter e outros 2 ml de cada tempo de hexano).

3.3 Bioensaios

Para verificar se as fêmeas têm preferência por locais com extrato de ovos ou ovários sobre locais controle (apenas com o solvente equivalente), considerando, principalmente, a percepção olfativa e a química por contato delas, foram realizados ensaios de dupla escolha (Figura 3) (RINKER et al., 2013).

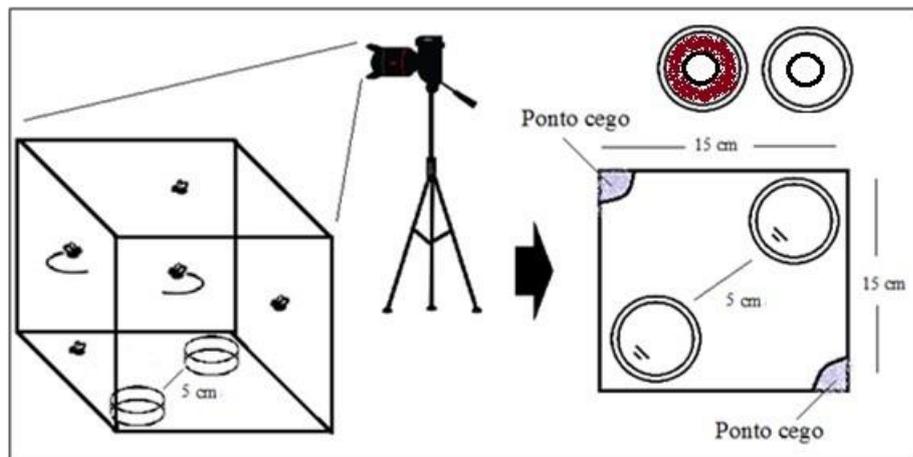


Figura 2 Esquema do ensaio de dupla escolha. À esquerda, uma visão geral e lateral do ensaio, com a câmera sendo posicionada para gravar a parte superior da gaiola. À direita, a visão da câmera. As duas placas de petri acima da visão da câmera ilustram uma placa de petri apenas com o papel filtro, sem substrato (direita) e uma com substrato, posicionado em volta do papel filtro (esquerda). A gaiola foi rotacionada em 180° a cada quatro repetições, para evitar efeitos tendenciosos.

Cinco fêmeas grávidas foram liberadas em uma gaiola (15 cm X 15 cm X 15 cm) contendo duas placas de Petri em duas extremidades opostas; as placas ficavam separadas por 10 cm, cada uma contendo um disco de papel filtro, onde foi adicionado 0,2 ml do extrato ou do controle (apenas solvente). Os tratamentos foram divididos em cenários sem substrato e com substrato, no caso, carne moída bovina. Cinquenta gramas de substrato, quando presente, foram posicionados ao redor do papel filtro com extrato ou o solvente, fora desse papel, mas ainda dentro da placa de petri. Para manter uma padronização, o substrato adquirido ficava na geladeira por um dia inteiro para poder ser utilizado nos ensaios. Foram realizadas oito

repetições para cada tratamento com ovos (Tabela 1), ovários e tratamentos controle (Tabela 2) por espécie, nas tabelas, cada letra corresponde a um tratamento. Cada repetição foi filmada por duas horas; depois desse período, o extrato, o solvente controle e as fêmeas foram trocados para iniciar uma nova repetição.

Não foi possível posicionar a câmera de uma maneira que pegasse a gaiola inteira, então dois pequenos pontos cegos foram criados nas imagens das gravações (Figura 2), o que não afetou as observações. A cada quatro repetições, a gaiola era virada 180° (trocando as posições da placa com extrato e da placa controle) a fim de evitar alguma tendência. A cada dia, duas repetições eram realizadas de manhã, das 6 às 10 horas da manhã, e duas no período da tarde, das 12 às 18 horas, totalizando oito repetições em dois dias. Caso houvesse oviposição durante o processo, os ovos eram pesados. Os seguintes itens foram observados nos vídeos para cada cenário: (nv) número de visitas (é considerada uma visita se o indivíduo permanecer no mínimo 10 segundos no papel filtro), o (tpv) tempo (em minutos) que demorou para ocorrer a primeira visita (no papel filtro) e o (tv) tempo (em minutos) de cada visita (no papel filtro).

Tabela 1 Tratamentos realizados nos ensaios de dupla escolha com os extratos de ovos. Cada letra indica um tratamento, “A”, por exemplo, é o tratamento com *C. megacephala*, sem substrato, realizado com éter que compara o extrato de ovo de 0 horas e seu respectivo controle (sem o extrato, apenas o solvente). Ao todo, foram 96 repetições em 12 tratamentos por espécie.

Letra	Tratamento		
	Solvente	Cenário	Espécie
A	Éter	Controle vs Extrato de ovos 0 h sem substrato	<i>C. megacephala</i>
B	Éter	Controle vs Extrato de ovos 0 h com substrato	<i>C. megacephala</i>
C	Éter	Controle vs Extrato de ovos 5 h sem substrato	<i>C. megacephala</i>
D	Éter	Controle vs Extrato de ovos 5 h com substrato	<i>C. megacephala</i>
E	Éter	Controle vs Extrato de ovos 10 h sem substrato	<i>C. megacephala</i>
F	Éter	Controle vs Extrato de ovos 10 h com substrato	<i>C. megacephala</i>
G	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 0 h sem substrato	<i>C. megacephala</i>
H	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 0 h com substrato	<i>C. megacephala</i>
I	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 5 h sem substrato	<i>C. megacephala</i>
J	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 5 h com substrato	<i>C. megacephala</i>
K	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 10 h sem substrato	<i>C. megacephala</i>
L	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 10 h com substrato	<i>C. megacephala</i>
M	Éter	Controle vs Extrato de ovos 0 h sem substrato	<i>C. albiceps</i>
N	Éter	Controle vs Extrato de ovos 0 h com substrato	<i>C. albiceps</i>
O	Éter	Controle vs Extrato de ovos 5 h sem substrato	<i>C. albiceps</i>
P	Éter	Controle vs Extrato de ovos 5 h com substrato	<i>C. albiceps</i>
Q	Éter	Controle vs Extrato de ovos 10 h sem substrato	<i>C. albiceps</i>
R	Éter	Controle vs Extrato de ovos 10 h com substrato	<i>C. albiceps</i>
S	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 0 h sem substrato	<i>C. albiceps</i>
T	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 0 h com substrato	<i>C. albiceps</i>
U	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 5 h sem substrato	<i>C. albiceps</i>
V	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 5 h com substrato	<i>C. albiceps</i>
W	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 10 h sem substrato	<i>C. albiceps</i>
X	Hexano	Controle vs Extrato de ovos 10 h com substrato	<i>C. albiceps</i>

Todos os testes foram realizados entre setembro e abril, os meses mais quentes do ano, que são as épocas de maior atividade desses insetos, já que a maioria das moscas-varejeiras é considerada diurna e relativamente inativa à noite (PAYNE, 1965; BYRD e TOMBERLIN, 2019). Para manter a padronização, todos os tratamentos foram conduzidos dentro de B.O.D.s com a temperatura constante de 25 ± 1 °C e 60% de umidade relativa.

Tabela 2 Tratamentos realizados nos ensaios de dupla escolha com ovários (A' a H') e os ensaios controle, apenas com os solventes (A1 a H1). Nos tratamentos controle, os dois cenários comparados eram iguais e não tinham extratos, apenas solventes. Ao todo, 36 repetições em 4 tratamentos por espécie para ovário e mais 36 para o controle.

Letra	Tratamento		
	Solvente	Cenário	Espécie
A'	Éter	Controle vs Extrato de ovários sem substrato	<i>C. megacephala</i>
B'	Éter	Controle vs Extrato de ovários com substrato	<i>C. megacephala</i>
C'	Hexano	Controle vs Extrato de ovários sem substrato	<i>C. albiceps</i>
D'	Hexano	Controle vs Extrato de ovários com substrato	<i>C. albiceps</i>
E'	Éter	Controle vs Extrato de ovários sem substrato	<i>C. megacephala</i>
F'	Éter	Controle vs Extrato de ovários com substrato	<i>C. megacephala</i>
G'	Hexano	Controle vs Extrato de ovários sem substrato	<i>C. albiceps</i>
H'	Hexano	Controle vs Extrato de ovários com substrato	<i>C. albiceps</i>
A1	Éter	Controle vs Controle sem substrato	<i>C. megacephala</i>
B1	Éter	Controle vs Controle com substrato	<i>C. megacephala</i>
C1	Hexano	Controle vs Controle sem substrato	<i>C. albiceps</i>
D1	Hexano	Controle vs Controle com substrato	<i>C. albiceps</i>
E1	Éter	Controle vs Controle sem substrato	<i>C. megacephala</i>
F1	Éter	Controle vs Controle com substrato	<i>C. megacephala</i>
G1	Hexano	Controle vs Controle substrato	<i>C. albiceps</i>
H1	Hexano	Controle vs Controle com substrato	<i>C. albiceps</i>

Os tratamentos com ovário e os tratamentos controle também foram realizados nas mesmas condições mencionadas acima. Os tratamentos controles foram realizados com o objetivo de averiguar se apenas as placas de petri (só com o papel filtro) ou o substrato, quando presente, já seria suficiente para atrair as fêmeas, a fim de comparar seus resultados com os cenários controles de todos os outros tratamentos. Apesar desses ensaios serem considerados ensaios de dupla escolha, o protocolo utilizado para os bioensaios desta pesquisa foi modificado e, conseqüentemente, desenvolvido pelo autor para melhor se adequar às espécies envolvidas, testes preliminares foram realizados sem câmera (observação visual) e sem placa de petri (extratos e substrato colocados diretamente no papel filtro), por exemplo, e não se mostraram eficazes.

Após gerar as médias para todos os itens observados (nv, tpv e tv), em todos os tratamentos, dois testes foram aplicados para avaliá-las.

O teste de Hipótese de Proporção Bilateral foi utilizado para comparar o número de visitas (nv) que cada extrato e seu respectivo controle recebeu, tanto para cenários com ovos, ovários e os tratamentos controles (nesse caso, sem extratos, apenas solventes). Esse teste

consiste em uma regra de decisão utilizada para aceitar ou rejeitar uma hipótese estatística com base em elementos amostrais, comparando-se o parâmetro “z” encontrado com o “z” tabelado (FONSECA e MARTINS, 1996). Nesse caso, para se aceitar a hipótese nula, o valor do módulo de “z” encontrado deve ser menor que o valor de “z” tabelado (1,96 para $\alpha = 5\%$) e para rejeitar essa hipótese, o valor do módulo de “z” encontrado deve ser maior que o valor de “z” tabelado nas mesmas condições, tendo como hipótese nula, a não preferência por nenhuma situação apresentada.

E o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Student-Newman-Keuls) (TRIOLA, 2005) foi utilizado para comparar o tempo da primeira visita (tpv) e o tempo de cada visita (tv) que os extratos e seus respectivos controles obtiveram, tanto para ovos, para ovários e os tratamentos controles. Esse teste compara amostras independentes, identificando grupos diferentes para $p < 0,05$ e grupos iguais para $p \geq 0,05$.

Após as análises individuais (cada item dentro de seu tratamento), o teste de Kruskal-Wallis (Student-Newman-Keuls) também foi utilizado para fazer outras comparações: (1) foi analisado, para “tpv”, “tv” e “nv”, se há diferenças entre os tempos dos extratos no mesmo solvente (por exemplo, comparar “tpv” entre os extratos de 0 h, 5 h e 10 h em éter) apenas para os extratos de ovos, já que nos cenários com ovários, há somente um tempo (fresco, 0 h); (2) foi analisado se há diferença entre o mesmo tempo de extrato para solventes diferentes (por exemplo, comparar “tpv” nos extratos de 0 h entre éter e hexano) tanto para ovos, ovários e tratamentos controles; e (3) comparar os cenários sem substrato e com substrato no mesmo solvente (por exemplo, comparar “tpv” nos locais sem substrato e com substrato no éter). Todos os testes foram feitos através do programa Bioestat 5.0 (SANTOS e AYRES, 2007).

Em alguns casos, ao utilizar o teste de Kruskal-Wallis, o número de visitas, o tempo da primeira visita e o tempo de cada visita, podem assumir valores que resultam em postos idênticos (na etapa de determinação de postos da fórmula do cálculo), isso resulta em um erro no programa, porém isso apenas significa que o grupo de dados é igual e pode-se assumir que o valor de p é igual ou maior que 0,05 ($p = 1$ para ser mais exato).

3.4 Identificação dos compostos

As amostras de hexano e éter utilizadas nos bioensaios foram analisadas em um sistema de Cromatografia Gasosa com detecção por ionização de chamas (CG-DIC; GC2010 Shimadzu

Corp., Kyoto, Japão) equipado com coluna capilar apolar Rtx-1 (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm; Restek, Bellefonte, PA, USA). Um microlitro de cada amostra foi injetado a 250 °C em modo “splitless” por meio de um injetor automático (AOC-20i, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), em uma programação de 40 °C por 5 min, elevando-se a 10 °C/min até 280 °C onde permaneceu por 30 min. O hélio foi utilizado como gás de arraste a 1,3 ml/min em velocidade linear de 30,3 cm/s. Após análise exploratória das amostras dos bioensaios, novas amostras foram coletadas para quantificação. Para isso, foram amostradas cinco repetições de 400 µl para cada tratamento (0 h, 5 h e 10 h para superfície dos ovos). Em uma alíquota de 100 µl de cada amostra foram adicionados 5 µl de uma solução de octadecano (1000 ppm) como padrão interno. Os mesmos parâmetros iniciais de análise em CG-DIC foram utilizados e a quantificação consistiu no cálculo da porcentagem das áreas de pico dos analitos em relação à área do pico do padrão interno.

A identificação dos compostos foi realizada por meio da cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS; GC-2010QP Ultra, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão), tendo hélio como gás de arraste a 1,3 ml/min em velocidade linear de 41,1 cm/s. As amostras foram injetadas conforme as condições de temperatura de injeção e de forno realizadas nas análises por GC-FID. A fonte de íons bem como a interface foram mantidas a 280 °C. Os espectros de massas foram gerados por impacto de elétrons a 70eV, e os íons analisados no intervalo de 35-300 *m/z*. Um padrão de alcanos (C₇-C₃₀) foi injetado nas mesmas condições de análise para o cálculo do índice de retenção de Kovats (VAN DEN DOOL e KRATZ, 1963). Para a identificação, utilizou-se a base de dados da biblioteca NIST 11, bem como os índices de Kovats, como referência externa, considerando os tempos de retenção relatados na literatura (MOORE, 2013; XU et al., 2014; BARBOSA et al., 2017; PAULA et al., 2017, 2018; LUNAS et al., 2019).

Compostos com área percentual relativa igual ou maior que 5% foram considerados majoritários para o perfil químico analisado de ambas as espécies estudadas.

Para avaliar se existe diferença significativa no perfil de compostos das três idades de ovo estudadas, para *C. megacephala* e *C. albiceps*, utilizamos a análise discriminante aplicando as áreas relativas de todos os compostos detectados pela análise cromatográfica. Ela é indicada por revelar um conjunto de variáveis que melhor diferenciam os grupos avaliados (QUEEN; QUINN; KEOUGH, 2002). Nessa análise, o valor de “P” é considerado significativo quando apresenta resultado igual ou inferior a 0,05. Já o Wilks’ Lambda é utilizado como medida da diferença entre os grupos, sendo que valores próximos a zero indicam não sobreposição dos

ambientes, enquanto valores próximos a 1 indicam a sobreposição e assim inexistência de diferença significativa entre eles (MANLY e ALBERTO, 2008).

3.5 Coleta do material genético bacteriano

Para cada espécie, três fêmeas grávidas (11 dias depois do primeiro contato com fonte proteica) foram anestesiadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos. Após esse período, os ovários foram removidos e colocados à temperatura ambiente ($25\text{-}27\text{ }^{\circ}\text{C}$) por cinco minutos. Cada par de ovário foi colocado em um cadinho esterilizado, onde nitrogênio líquido foi adicionado. Os ovários foram macerados com um pistilo esterilizado até atingirem a aparência de um pó bem fino. Foram utilizados 20 mg do material macerado no kit *Cells and Tissue DNA Isolation Kit*, da Norgen Biotek Corporation, seguindo as etapas 1A – 2 – 3 – 4 e 5 do manual do fabricante. No total, três extrações foram realizadas.

A extração no substrato teve um método semelhante: cinquenta gramas de substrato (carne bovina moída) foram colocados em uma gaiola de *C. megacephala* e outros 50 g em uma gaiola de *C. albiceps* por 30 minutos (nas mesmas condições dos bioensaios), o substrato não tinha contato com os indivíduos, estava apenas no mesmo local e nas mesmas condições. Após esse acondicionamento, 2 g do substrato foram retirados, congelados com nitrogênio líquido e macerados até atingirem a aparência de um pó bem fino, que passou pelo mesmo processo descrito para os ovários. No total, três extrações foram realizadas para cada espécie.

Realizar a identificação das bactérias no substrato tem como objetivo um controle adequado da comunidade bacteriana dos ovários e da superfície dos ovos de ambas as espécies, foi realizada para ajudar na identificação das bactérias presentes apenas nessas estruturas, portanto, todas as espécies de bactérias comuns ao substrato, aos ovários e à superfície dos ovos para cada espécie de mosca-varejeira não foram incluídas nas descrições da comunidade bacteriana de *C. megacephala* e *C. albiceps* (Apêndice B — Resultados complementares [Comunidade bacteriana dos substratos de *C. megacephala* e *C. albiceps*]).

E para finalizar, como apenas as bactérias das superfícies dos ovos eram de interesse para a pesquisa, o seguinte método de extração foi desenvolvido.

Uma massa de ovos pesando entre 0,08-0,1 grama foi colocada dentro de um tubo de centrifugação, junto com 0,75 ml de solução tampão (cobrindo completamente a massa de

ovos), em seguida, o tubo foi levado a um sonicador e ficou no banho por 30 minutos. O banho ajuda a separar as bactérias da superfície dos ovos. Outra vantagem desse método é que ele não rompe a parede dos ovos e afeta somente os micro-organismos de sua superfície. Após o banho, uma pequena quantidade de pérolas de vidro e 300 µl de uma solução tampão de lise foram adicionados ao tubo, que foi levado a um agitador vortex por 10 minutos para concluir e completar o processo de ruptura da parede celular dos micro-organismos. Como a parede celular das bactérias é rígida, as pérolas proporcionaram um maior poder de quebra das ligações químicas presentes nessa parede, facilitando a liberação do material genético da bactéria (HIRAI et al., 2017). Depois desse processo, a solução resultante foi separada dos ovos e utilizada nas etapas 1D – 2 – 3 – 4 e 5 do manual do fabricante do kit *Cells and Tissue DNA Isolation Kit*, da Norgen Biotek Corporation. No total, cinco extrações como essa foram realizadas para cada espécie. Como não há na literatura protocolos de extração em tais estruturas dessas espécies de moscas-varejeiras, ambos os protocolos (ovários e superfície dos ovos) foram desenvolvidos pelo autor para atenderem às espécies em questão, testes preliminares utilizando diferentes metodologias não atingiram adequadamente os objetivos de extração de DNA.

Após obtenção do material genético (mais detalhes no Apêndice B — Resultados complementares [Extração de DNA]), as amostras foram enviadas para a empresa MacroGen Inc. (Coreia do Sul), onde houve a construção de bibliotecas de amplicon das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA, seguido de sequenciamento na plataforma MiSeq Illumina (paired-end 2x 300pb).

3.6 Pré-processamento de *reads*, classificação taxonômica e análises de associação

Todas as amostras obtidas foram inicialmente analisadas no programa de controle de qualidade FASTQC version 0.11.5, Babraham Bioinformatics (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). Verificada a alta qualidade do sequenciamento obtido, considerando valor mínimo de Phred 20, as amostras passaram para a etapa de classificação taxonômica no programa web MG-RAST (Metagenomic Rapid Annotations using Subsystems Technology - Anotação Rápida Metagenômica utilizando Tecnologia de Subistemas) (AZIZ et al., 2008). O programa MG-RAST realiza a análise de dados metagenômicos, assim pode-se analisar tanto bibliotecas metatranscriptômicas como de

amplicons (16S, ITS, 18S). Para as análises dos amplicons 16S foram usados como entrada arquivos no formato FASTQ para cada amostra. Inicialmente, o programa realiza uma análise e filtragem por qualidade, que inclui retirada de *reads* duplicados artificialmente. As *reads* são agrupadas por similaridade considerando-se identidade mínima de 97% para realizar o agrupamento de sequências. A maior sequência de cada *cluster* é selecionada como sequência representativa e é usada para a classificação taxonômica usando o programa BLAT (KENT, 2002) contra a base de dados M5rna (disponível na plataforma do MG-Rast) a qual integra os bancos de dados SILVA, Greengenes e RDP (Ribosomal Database Project) (Apêndice A), todos utilizados nesta pesquisa para classificar as sequências. Com esses resultados foram obtidos diferentes gráficos e tabelas dos grupos taxonômicos identificados, curvas de rarefação e diagramas de Venn (BARDOU et al., 2014).

Para analisar uma possível relação entre as bactérias existentes nos ovários e nos ovos para cada espécie, foram utilizados coeficientes de correlação lineares e não lineares, que ajudam a medir e a entender como duas variáveis se comportam em cenários distintos (LARSON e FARBER, 2015), nesse caso, as variáveis são as quantidades de sequências agrupadas em um táxon, que indicam a abundância do grupo taxonômico na amostra.

O coeficiente de correlação de Pearson ou *r* de Pearson mede o grau da correlação linear entre duas variáveis quantitativas (representado pela letra “*r*”). Esse índice varia de -1 a 1, que refletem a intensidade da relação entre as variáveis (FILHO, 2009).

$r = 1$ - correlação perfeita positiva entre as duas variáveis.

$r = -1$ - correlação negativa perfeita entre as duas variáveis, ou seja, se uma aumenta, a outra sempre diminui.

$r = 0$ - as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra.

A tabela 3 resume como interpretar valores do coeficiente de Pearson (VARGAS; MALDONADO-MACIAS; GARCÍA-ALCARAZ, 2017).

Tabela 3 Valores de “*r*” e como interpretá-los.

Valor de <i>r</i> (+ ou -)	Interpretação
0,00 a 0,19	Correlação muito fraca
0,20 a 0,39	Correlação fraca
0,40 a 0,69	Correlação moderada
0,70 a 0,89	Correlação forte
0,90 a 1,00	Correlação muito forte

No entanto, pode existir uma outra dependência que seja "não linear". Assim, resultados próximos de $r = 0$ devem ser investigados por outros meios.

O coeficiente de correlação de Spearman, representado pela letra “ ρ ” (rho), é uma medida de correlação não-paramétrica, utilizada para investigar correlações não existentes no método linear (VARGAS; MALDONADO-MACIAS; GARCÍA-ALCARAZ, 2017), avalia o quão boa a relação entre duas variáveis pode ser descrita usando uma função monótona. Também varia seu índice de -1 a 1, que é interpretado seguindo os valores da Tabela 3.

O coeficiente de correlação de Kendall, τ (tau), é uma medida de associação para variáveis ordinais. Uma vantagem de τ sobre o coeficiente de Spearman é que τ pode ser generalizado para um coeficiente de correlação parcial (VARGAS; MALDONADO-MACIAS; GARCÍA-ALCARAZ, 2017). Esse coeficiente também varia de -1 a 1 e segue as interpretações de valores da Tabela 3.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Bioensaios

4.1.1 Extratos de ovos

As tabelas a seguir mostram as médias para os itens “tpv” (tempo da primeira visita, em minutos), “nv” (número de visitas) e “tv” (tempo de cada visita, em minutos), seus desvios padrões e os valores das análises estatísticas, “p” para “tpv” e “tv” e “z” para “nv”, que comparam os cenários com extrato e sem extrato. Também foi utilizado Kruskal-Wallis (p) para saber se existiu diferença estatística entre os diferentes extratos (0 h, 5 h e 10 h).

Tabela 4 Valores encontrados para “tpv” (minutos), “nv” e “tv” (minutos) para todos os tratamentos de *C. megacephala* em éter. Para $p < 0,05$, há diferença entre os cenários. Para $z \geq 1,96$, há preferência por um cenário.

<i>C. megacephala</i>					
A-Controle vs Extrato ovos 0 h em éter sem substrato			B-Controle vs Extrato ovos 0 h em éter com substrato		
p = 0,3	z = 4,4	p = 0,04	p = 0,07	z = 2,74	p = 0,02
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato
59,1±25,2	47±22,7	0,3±0,7	2±1,7	9,2±0,3	41±0,6
C-Controle vs Extrato ovos 5 h em éter sem substrato			D-Controle vs Extrato ovos 5 h em éter com substrato		
p = 1	z = 1,6	p = 0,3	p = 0,1	z = 0	p = 0,8
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato
22,4±22,9	28,5±9,6	0,2±0,7	0,6±0,9	3,5±0,1	85,6±2,3
E-Controle vs Extrato ovos 10 h em éter sem substrato			F-Controle vs Extrato ovos 10 h em éter com substrato		
p = 1	z = 3	p = 0,3	p = 0,04	z = 0,32	p = 0,8
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato
83±0	10,3±7,3	0,1±0,3	1±1,6	1,8±0,08	41,2±0,9
50,5±8,6	76,4±17,9	1,2±1,7	1,1±1,5	6,9±12,5	2,9±3,5

Na tabela 4, observado primeiramente os tratamentos sem substrato (esquerdo da tabela, A, C e E) pode-se observar que não houve diferenças estatísticas significativas entre os cenários com extrato e seus controles para “tpv”. Também não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,053$), ou seja, as moscas demoraram o mesmo tempo, em média, para chegar pela primeira vez nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h. Para “nv”, houve diferença estatística significativa entre os cenários com extratos e seus controles nos tratamentos A e E, os cenários com extratos receberam mais visitas do que seus respectivos controles, porém não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,18$), ou seja, as moscas visitaram igualmente os extratos de 0 h, 5 h e 10 h. E para “tv”, houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento A, a visita no cenário com extrato dura

mais tempo, porém não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,82$), ou seja, as moscas passaram o mesmo tempo por visita nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h.

Também na tabela 4, observa-se os resultados para os tratamentos B, D e F, éter com substrato. Observa-se para “tpv” que houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento F, o cenário com extrato de 10 h demorou mais para receber a primeira visita do que seu controle, porém não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,06$), ou seja, as moscas demoraram o mesmo tempo, em média, para chegar pela primeira vez nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h. Para “nv”, houve diferença estatística significativa no tratamento B, o número de visitas é maior no cenário sem extrato, porém não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,53$), ou seja, as moscas visitaram igualmente os extratos de 0 h, 5 h e 10 h. E para “tv”, apenas em B houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle, as fêmeas ficam mais tempo no cenário sem o extrato de 0 h. Também não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,39$), ou seja, as moscas passaram o mesmo tempo por visita nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h.

A tabela 5 abaixo mostra os resultados encontrados para *C. megacephala*, hexano como solvente, extratos de ovos, com e sem substrato.

Tabela 5 Valores encontrados para “tpv” (minutos), “nv” e “tv” (minutos) para todos os tratamentos de *C. megacephala* em hexano. Para $p < 0,05$, há diferença entre os cenários. Para $z \geq 1,96$, há preferência por um cenário.

<i>C. megacephala</i>					
<u>G- Controle vs Extrato ovos 0h em hexano sem substrato</u>			<u>H- Controle vs Extrato ovos 0h em hexano com substrato</u>		
$p = 1$	$z = 0,3$	$p = 0,6$	$p = 0,6$	$z = 3,6$	$p = 0,04$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
<u>61,6±18,7</u>	<u>62,8±27,6</u>	<u>1±1,3</u>	<u>1±1,3</u>	<u>4±7</u>	<u>13,7±20,6</u>
<u>I- Controle vs Extrato ovos 5h em hexano sem substrato</u>			<u>J- Controle vs Extrato ovos 5h em hexano com substrato</u>		
$p = 0,7$	$z = 5,5$	$p = 0,4$	$p = 0,4$	$z = 0,8$	$p = 0,5$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
<u>39,2±27,4</u>	<u>31,6±12,7</u>	<u>0,6±0,7</u>	<u>3,6±3,7</u>	<u>0,2±0,3</u>	<u>3,4±3,6</u>
<u>K- Controle vs Extrato ovos 10h em hexano sem substrato</u>			<u>L- Controle vs Extrato ovos 10h em hexano com substrato</u>		
$p = \emptyset$	$z = \emptyset$	$p = \emptyset$	$p = 1$	$z = 0,8$	$p = 0,3$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
<u>55,5±34,7</u>	<u>\emptyset</u>	<u>0,6±0,9</u>	<u>0</u>	<u>0,2±0,3</u>	<u>0</u>
<u>56,4±38,2</u>	<u>59,6±43,4</u>	<u>1,3±1,5</u>	<u>1,7±2,7</u>	<u>6,4±12,4</u>	<u>1,6±2,6</u>

Na tabela 5, em tratamentos sem substrato, para “tpv”, pode-se observar que não houve diferenças estatísticas significativas entre os cenários com extrato e seus controles (no

tratamento K, o cenário com extrato de 10 h não recebeu visitas, portanto não foi possível analisá-lo estatisticamente em “tpv” nem “tv”). Também não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,083$), ou seja, as moscas demoraram o mesmo tempo, em média, para chegar pela primeira vez nos extratos de 0 h e 5 h. Para “nv”, houve diferença estatística significativa entre os cenários com extratos e seus controles no tratamento I, ocorrem mais visitas no cenário com extrato, porém não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,39$), ou seja, as moscas visitaram igualmente os extratos de 0 h e 5 h. E para “tv”, não houve diferença estatística significativa entre os cenários com extratos e seus controles em nenhum tratamento. Assim como não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,4$), ou seja, as moscas passaram o mesmo tempo por visita nos extratos de 0 h e 5 h.

Também na tabela 5, observa-se os resultados para os tratamentos H, J e L, hexano com substrato. Observa-se para “tpv” que não houve diferenças significativas entre os cenários com extrato e seus controles em nenhum tratamento, porém existiu diferença estatística entre os diferentes extratos, em 0 h demorou-se menos para acontecer a primeira visita do que nos extratos de 5 h e 10 h ($p = 0,0049$ e $0,0036$, respectivamente). Para “nv”, houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento H, no cenário com extrato ocorrem mais visitas, porém não existiu diferença para os números de visitas ao compará-los entre os diferentes extratos ($p = 0,15$), ou seja, as moscas visitaram igualmente os extratos de 0 h, 5 h e 10 h. E para “tv”, nota-se novamente diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento H, no cenário com extrato, as visitas duraram mais tempo. Mas ainda não existiu diferença estatística para os tempos de cada visita ao compará-los entre os diferentes extratos ($p = 0,27$), ou seja, as moscas passaram o mesmo tempo por visita nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h. Os resultados a seguir foram encontrados para *C. albiceps*.

A tabela 6 abaixo mostra os resultados das análises aplicadas para os tratamentos com *C. albiceps*, éter como solvente, extratos de ovos, com e sem substrato.

Tabela 6 Valores encontrados para “tpv” (minutos), “nv” e “tv” (minutos) para todos os tratamentos de *C. albiceps* em éter. Para $p < 0,05$, há diferença entre os cenários. Para $z \geq 1,96$, há preferência por um cenário.

<i>C. albiceps</i>					
M-Controle vs Extrato ovos 0 h em éter sem substrato			N-Controle vs Extrato ovos 0 h em éter com substrato		
$p = 0,7$	$z = 8,2$	$p = 0,01$	$p = 0,1$	$z = 1,1$	$p = 0,8$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato
<u>37,4±7,6</u>	<u>48,7±39,3</u>	<u>0,6±0,9</u>	<u>5,8±4,6</u>	<u>0,2±0,4</u>	<u>8,1±7,3</u>
O-Controle vs Extrato ovos 5 h em éter sem substrato			P-Controle vs Extrato ovos 5 h em éter com substrato		
$p = 0,1$	$z = 0,4$	$p = 0,5$	$p = 0,006$	$z = 1,87$	$p = 0,008$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato
<u>36,4±32,7</u>	<u>71,2±32</u>	<u>0,6±0,7</u>	<u>0,7±0,7</u>	<u>0,4±0,7</u>	<u>0,5±0,6</u>
Q-Controle vs Extrato ovos 10 h em éter sem substrato			R-Controle vs Extrato ovos 10 h em éter com substrato		
$p = 0,05$	$z = 6,1$	$p = 0,006$	$p = 0,56$	$z = 2,1$	$p = 0,4$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato	Controle Extrato
<u>93,3±17,4</u>	<u>31,2±46</u>	<u>1,2±0,8</u>	<u>5,1±2,7</u>	<u>4±5,7</u>	<u>31,2±20,8</u>
			<u>31,9±20,9</u>	<u>16,1±4,4</u>	<u>0,3±0,7</u>
			<u>1±1,7</u>	<u>0,1±0,2</u>	<u>2,4±4,9</u>

Na tabela 6, para tratamentos sem substrato, pode-se observar que não houve diferença estatística significativa entre os cenários e seus controles para “tpv”. Também não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,07$), ou seja, as moscas demoraram o mesmo tempo, em média, para chegar pela primeira vez nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h. Para “nv”, houve diferenças estatísticas significativas entre os cenários e seus controles nos tratamentos M e Q, nos cenários com extrato, o número de visitas foi maior. Também existiu diferença nos números de visitas ao compará-los entre os diferentes extratos, ou seja, houve um maior número de visitas em 0 h e 10 h em relação ao extrato de 5 h ($p = 0,007$ e $0,0065$, respectivamente). E para “tv”, houve diferenças estatísticas significativas entre os cenários e seus controles nos tratamentos M e Q, nos cenários com extratos, as visitas duram mais tempo. Também existiu diferença para os tempos de cada visita entre os cenários de 10 h e 5 h ($p = 0,003$), ou seja, as moscas passaram mais tempo por visita no nos extratos de 10 h.

Também na tabela 6, pode-se observar os resultados para os tratamentos N, P e R, éter como solvente, ovos e com substrato. Para “tpv”, houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento P, as fêmeas demoraram mais tempo para visitar o cenário com extrato. Também existiu diferença para os tempos da primeira visita entre os extratos de 5 h e 10 h ($p = 0,008$), em 10 h demorou-se menos para acontecer a primeira visita do que no extrato de 5 h. Para “nv”, houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento R, no cenário com extrato ocorreram mais

visitas. Porém, não existiu diferença entre os diferentes extratos ($p = 0,42$), ou seja, as moscas visitaram igualmente os extratos de 0 h, 5 h e 10 h. E para “tv”, houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento P, no cenário controle, as visitas duraram mais tempo, porém não existiu diferença entre os cenários de 0 h, 5 h e 10 h ($p = 0,45$), ou seja, as moscas passaram o mesmo tempo por visita em todos os extratos.

A tabela 7 abaixo mostra os resultados encontrados para *C. albiceps*, hexano como solvente, extratos de ovos, com e sem substrato.

Tabela 7 Valores encontrados para “tpv” (minutos), “nv” e “tv” (minutos) para todos os tratamentos de *C. albiceps* em hexano. Para $p < 0,05$, há diferença entre os cenários. Para $z \geq 1,96$, há preferência por um cenário.

<i>C. albiceps</i>					
<u>S - Controle vs Extrato ovos 0h em hexano sem substrato</u>			<u>T - Controle vs Extrato ovos 0h em hexano com substrato</u>		
$p = 1$	$z = 0,8$	$p = 0,7$	$p = 0,7$	$z = 1,2$	$p = 0,8$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
<u>35,5±0</u>	<u>48,3±28,8</u>	<u>0,1±0,6</u>	<u>0,2±0,4</u>	<u>0,09±0,2</u>	<u>0,1±0,2</u>
<u>U - Controle vs Extrato ovos 5h em hexano sem substrato</u>			<u>V - Controle vs Extrato ovos 5h em hexano com substrato</u>		
$p = 0,05$	$z = 2,4$	$p = 0,4$	$p = 0,08$	$z = 1,6$	$p = 0,5$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
<u>54,4±7</u>	<u>21±19,5</u>	<u>1,1±1,6</u>	<u>2,2±2,1</u>	<u>0,9±1,3</u>	<u>3,8±6,7</u>
<u>W - Controle vs Extrato ovos 10h em hexano sem substrato</u>			<u>X - Controle vs Extrato ovos 10h em hexano com substrato</u>		
$p = 0,1$	$z = 2,1$	$p = 0,5$	$p = 0,03$	$z = 1,97$	$p = 0,5$
tpv	nv	tv	tpv	nv	tv
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
<u>16,7±15,6</u>	<u>48,1±31,9</u>	<u>1,7±2,1</u>	<u>0,8±1,4</u>	<u>11,3±18,7</u>	<u>6,2±13,1</u>
<u>22,2±9,2</u>	<u>55,3±23</u>	<u>1,1±1,3</u>	<u>2±3,8</u>	<u>1,5±1,5</u>	<u>1,7±3,1</u>

Na tabela 7, em tratamentos sem substrato, para “tpv”, observa-se que não houve diferença estatística significativa entre os cenários e seus controles. Também não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,29$), ou seja, as moscas demoraram o mesmo tempo, em média, para chegar pela primeira vez nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h. Para “nv”, houve diferenças estatísticas significativas nos tratamentos U e W, o cenário com extrato em U recebeu mais visitas, o oposto ocorre no tratamento W. No entanto, não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,17$), ou seja, as moscas visitaram igualmente os extratos de 0 h, 5 h e 10 h. E para “tv”, houve diferenças estatísticas significativas entre os cenários e seus controles. Também não existiu diferença entre os diferentes extratos ($p = 0,25$), ou seja, as moscas passaram o mesmo tempo por visita nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h.

Também na tabela 7, pode-se observar os resultados para os tratamentos T, V e X, hexano como solvente, ovos e com substrato. Para “tpv”, observa-se que houve diferença estatística significativa entre o cenário com extrato e seu controle no tratamento X, no cenário com extrato, as fêmeas demoraram mais tempo para fazer a primeira visita, porém não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,19$), ou seja, as moscas demoraram o mesmo tempo, em média, para chegar pela primeira vez nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h. Para “nv”, houve diferença estatística no tratamento X, em que ocorreram mais visitas no cenário com extrato, porém não existiu diferença estatística entre os diferentes extratos ($p = 0,98$), ou seja, as moscas visitaram igualmente os extratos de 0 h, 5 h e 10 h. E para “tv”, houve diferenças estatísticas entre os cenários e seus controles. Também não existiu diferença entre os diferentes extratos ($p = 0,43$), ou seja, as moscas passaram o mesmo tempo por visita nos extratos de 0 h, 5 h e 10 h.

As tabelas a seguir (Tabelas 8 e 9) mostram um resumo dos resultados acima, elas indicam os tratamentos em que os valores obtidos para cada item foram estatisticamente maiores para os cenários com os extratos quando comparados com seus controles.

Tabela 8 Resumo dos resultados dos tratamentos para *Chrysomya megacephala*. O “o” indica que os valores obtidos nos cenários com extratos foram estatisticamente maiores que os encontrados nos controles. O “x” indica que não houve diferença.

<i>C. megacephala</i>				<i>C. megacephala</i>			
Sem substrato - Éter				Com substrato - Éter			
	A - 0 h	C - 5 h	E - 10 h		B - 0 h	D - 5 h	F - 10 h
tpv	x	x	x	tpv	x	x	o
nv	o	x	o	nv	x	x	x
tv	o	x	x	tv	x	x	o

Sem substrato - Hexano				Com substrato - Hexano			
	G - 0 h	I - 5 h	K - 10 h		H - 0 h	J - 5 h	L - 10 h
tpv	x	x	x	tpv	x	x	x
nv	x	o	x	nv	o	x	x
tv	x	x	x	tv	o	x	x

Para *C. megacephala*, os tratamentos sem substratos e realizados com éter mostraram diferenças em “nv” (0 h e 10 h) e “tv” (0 h), enquanto com hexano, apenas houve mais visitas no tratamento de 5 h.

Nos tratamentos com substrato e éter, apenas a primeira visita demorou mais para ocorrer no cenário de 10 h, enquanto com hexano, um valor maior de “nv” e “tv” foi observado nos tratamentos de 0 h.

Tabela 9 Resumo dos resultados dos tratamentos para *Chrysomya albiceps*. O “o” indica que os valores obtidos nos cenários com extratos foram estatisticamente maiores que os encontrados nos controles. O “x” indica que não houve diferença.

<i>C. albiceps</i>				<i>C. albiceps</i>			
Sem substrato - Éter				Com substrato - Éter			
	M - 0 h	O - 5 h	Q - 10 h		N - 0 h	P - 5 h	R - 10 h
tpv	x	x	x	tpv	x	o	x
nv	o	x	o	nv	x	x	x
tv	o	x	o	tv	x	x	x

Sem substrato - Hexano				Com substrato - Hexano			
	S - 0 h	U - 5 h	W - 10 h		T - 0 h	V - 5 h	X - 10 h
tpv	x	x	x	tpv	x	x	o
nv	x	o	x	nv	x	x	o
tv	x	x	x	tv	x	x	x

Na tabela 9, os tratamentos sem substrato e realizados com éter mostraram maiores valores de “nv” e “tv” para os tratamentos de 0 h e 10 h, enquanto que para os realizados com hexano, o “nv” em 5 h foi maior. Nos tratamentos com substrato realizados com éter, um maior valor para “tpv” foi encontrado no cenário de 5 h, enquanto com hexano, no cenário de 10 h o valor de “nv” e “tv” foi maior.

As tabelas a seguir mostram se os resultados dos extratos diferem entre os solventes para “tpv”, “nv” e “tv”.

Tabela 10 Comparação entre os extratos em diferentes solventes. O símbolo "x" indica que não houve diferença entre os dados ($p \geq 0$), o "e" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no éter foi maior que no hexano, e o "h" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no hexano foi maior que no éter.

<i>C. megacephala</i>							
Éter vs Hexano							
	Sem substrato			Com substrato			
	0 h	5 h	10 h		0 h	5 h	10 h
tpv	x	x	x	tpv	h	x	x
nv	x	x	x	nv	e	x	x
tv	x	x	x	tv	e	x	x

Na tabela 10, não houve diferenças estatísticas entre os extratos para solventes diferentes em cenários sem substrato, enquanto nos cenários com substrato, em 0 h, o valor de “tpv” foi maior em hexano (demorou mais tempo para ocorrer a primeira visita) e os valores de “nv” e “tv” foram maiores em éter (mais visita e maior tempo de visita).

Tabela 11 Comparação entre os extratos em diferentes solventes. O símbolo "x" indica que não houve diferença entre os dados ($p \geq 0$), o "e" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no éter foi maior que no hexano, e o "h" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no hexano foi maior que no éter.

<i>C. albiceps</i>							
Éter vs Hexano							
Sem substrato				Com substrato			
	0 h	5 h	10 h		0 h	5 h	10 h
tpv	x	e	x	tpv	x	e	h
nv	e	x	e	nv	e	x	x
tv	e	x	e	tv	e	x	x

Na tabela 11, houve diferença estatística entre os extratos para solventes diferentes em cenários sem substrato para “tpv” em 5 h, onde o valor em éter foi maior e para “nv” e “tv” em 0 h e 10 h, onde os valores de éter também foram maiores, enquanto nos cenários com substrato, o extrato de 5 h teve maior valor para “tpv” novamente em éter e maior valor em 10 h para hexano, e nos extratos de 0 h observa-se maiores resultados de “nv” e “tv” no solvente éter.

Para os extratos dos ovos, também foi comparado se há diferenças entre os cenários sem substrato e com substrato no mesmo solvente.

Tabela 12 Comparação entre os cenários sem substrato e com substrato para éter (acima) e hexano (abaixo) para *Chrysomya megacephala*. O símbolo "x" indica que não houve diferença entre os dados ($p \geq 0$), o "s/s" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no cenário “sem substrato” foi maior, e o "c/s" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no cenário “com substrato” foi maior.

<i>C. megacephala</i>						
Éter						
sem substrato vs com substrato						
	0 h	valor p	5 h	valor p	10 h	valor p
tpv	c/s	0.002	x	0.0831	c/s	0.0339
nv	s/s	0.004	x	0.5272	x	0.7517
tv	x	0.092	x	0.4622	x	0.2936

Hexano						
sem substrato vs com substrato						
	0 h	valor p	5 h	valor p	10 h	valor p
tpv	s/s	0.006	x	0.8065	x	∅
nv	c/s	0.0117	x	0.8738	x	∅
tv	x	0.8336	x	0.4622	x	∅

Nota-se pela tabela 12 tempos maiores para localizar pela primeira vez o extrato nos cenários com substrato em éter e mais visitas no cenário sem substrato (0 h), enquanto o oposto ocorre em hexano. Praticamente, não há diferença nos cenários de 5 h e 10 h. O “Ø” indica que não foi possível fazer a comparação, pois no tratamento com hexano sem substrato em 10 h, não houve visitas.

Tabela 13 Comparação entre os cenários sem substrato e com substrato para éter (acima) e hexano (abaixo) para *Chrysomya albiceps*. O símbolo "x" indica que não houve diferença entre os dados ($p \geq 0$), o "s/s" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no cenário “sem substrato” foi maior, e o "c/s" indica que houve diferença ($p < 0$) e que o valor para o determinado item no cenário “com substrato” foi maior.

<i>C. albiceps</i>						
Éter						
sem substrato vs com substrato						
	0 h	valor p	5 h	valor p	10 h	valor p
tpv	x	0.7678	x	0.6242	x	0.3063
nv	s/s	0.0046	x	0.5603	s/s	0.0063
tv	s/s	0.0046	x	0.5286	s/s	0.0033
Hexano						
sem substrato vs com substrato						
	0 h	valor p	5 h	valor p	10 h	valor p
tpv	x	1	x	0.2733	x	0.8273
nv	x	0.2452	x	0.4616	x	0.8746
tv	x	0.248	x	0.9164	x	0.8748

O mesmo foi feito para *C. albiceps*. Nota-se muita diferença nos tratamentos sem substrato no éter, onde houve mais visitas e visitas mais longas nos extratos de 0 h e 10 h quando comparados com os cenários com substrato, enquanto não houve diferenças entre ausência e presença de substrato no hexano (Tabela 13).

4.1.2 Extratos de ovários

Para os tratamentos com ovários sem substrato, A', C', E' e G', o número de visitas não foi suficiente para qualquer análise estatística (valor de “nv” próximo de 0 para todos os tratamentos), como consequência, valores de “tpv” e “tv” também não puderam ser analisados, tanto para o cenário com extrato como para o controle. No entanto, os cenários com substrato receberam visitas o suficiente para as análises. A tabela 14 a seguir ilustra os resultados.

Tabela 14 Valores encontrados para “tpv” (minutos), “nv” e “tv” (minutos) para todos os tratamentos de ovário de *C. megacephala* e *C. albiceps* com substrato. Para $p < 0,05$, há diferença entre os cenários. Para $z \geq 1,96$, há preferência por um cenário.

<i>C. megacephala</i>						<i>C. albiceps</i>					
B' - Controle vs Extrato ovário em éter com substrato						F' - Controle vs Extrato ovário em éter com substrato					
p = 0,8		z = 0,3		p = 0,08		p = 0,3		z = 0,7		p = 0,7	
tpv		nv		tv		tpv		nv		tv	
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
25,8±24,5	19,4±22,3	1±0,7	0,8±0,7	0,8±0,7	0,9±0,0,9	41,8±20,2	37,2±15,8	1±0,6	0,7±1	2±1,5	2,2±2,1
D' - Controle vs Extrato ovário em hexano com substrato						H' - Controle vs Extrato ovário em hexano com substrato					
p = 0,4		z = 0,6		p = 0,9		p = 0,8		z = 0,3		p = 0,9	
tpv		nv		tv		tpv		nv		tv	
Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato	Controle	Extrato
8,9±7,4	18,2±6,7	1,1±1,7	1±2,2	2±1,9	2,6±1,8	25,1±23,7	24,8±22,9	1±1,1	0,8±1,1	1,3±1,5	1,9±,2

Como pode ser observado nessa tabela, para “tpv”, “nv” e “tv”, em ambas as espécies e solventes, não houve diferenças estatísticas entre o cenário com extrato de ovário e seu controle.

Em resumo, não existiu diferença entre os resultados encontrados nos cenários com extratos de ovários e seus controles na presença de substrato para ambas as espécies e solventes. Como não existiu diferença entre os extratos e controles, não houve a necessidade de comparar os resultados dos extratos entre os solventes.

Também não foi possível comparar os cenários sem substrato e com substrato, pois não houve visitas nos cenários sem substrato.

Para os tratamentos controle (Tabela 2), não foi possível uma análise estatística para os tratamentos A1, C1, E1 e G1, que são os tratamentos sem substratos, pois os valores de “nv” foram muito próximo de zero em todos eles, e como consequência, os valores de “tpv” e “tv” também não puderam ser analisados. Por outro lado, os tratamentos B1, D1, F1 e H1, tratamentos controle com substrato, obtiveram visitas suficientes para análise. Os resultados, tanto para *C. megacephala* como *C. albiceps*, não indicam diferenças estatísticas para “tpv”, “nv” e “tv” entre os cenários, pois os valores de “p” encontrados em todas as situações foram maiores ou iguais a 0,05 (valores semelhantes aos encontrados para os tratamentos com extratos de ovários na presença de substrato).

Como última observação, não foi encontrado oviposição em nenhum tratamento para nenhuma espécie.

Todos esses bioensaios foram realizados entre oito horas da manhã e seis horas da tarde, esse horário foi escolhido, pois são considerados os períodos de maior atividade das moscas-varejeiras. Geralmente, a oviposição ocorre nesse período e sua distribuição é crescente ao longo do dia, atingindo o pico entre três e seis horas da tarde (WIJESUNDARA, 1957; BYRD e TOMBERLIN, 2019).

As primeiras observações a serem feitas em relação aos resultados dos bioensaios são sobre os tratamentos com extratos de ovários: os tratamentos sem substrato não tiveram visitas suficientes para uma análise confiável em ambas as espécies, enquanto os tratamentos com substrato não apresentaram diferença entre os cenários com extrato e sem extrato. Para os tratamentos sem substrato, pode-se concluir que não existem compostos atrativos presente nos ovários dessas espécies, o que não confirma outros resultados encontrados em *M. domestica* (JIANG et al., 2002), em que o autor descreve vários compostos atrativos provenientes dos ovários dessa mosca. As visitas nos tratamentos com substratos podem ser explicadas pela própria presença do substrato, apesar de apenas as visitas no papel filtro (local de aplicação do extrato ou do solvente) terem sido contabilizadas, a influência do substrato através da liberação de compostos atrativos (BIRKETT et al., 2004; PICKETT et al., 1998) pode ter causado uma aproximação inicial dos indivíduos para, posteriormente, visitarem o papel filtro. O baixo número de visitas (maior média foi de 1,125) nesses tratamentos indica baixo interesse em visitar o papel filtro, tanto nos cenários controles como nos cenários com extratos.

Algo parecido ocorreu nos tratamentos controle (apenas solvente vs solvente em situações com ou sem substrato) onde os tratamentos sem substrato receberam praticamente nenhuma visita e os tratamentos com substrato receberam um número muito ínfimo de indivíduos no papel filtro, mas suficiente para os cálculos estatísticos, indicando novamente uma possível influência do substrato. Porém, os bioensaios controles ajudaram a demonstrar que apenas o papel filtro (com os solventes) e a placa de petri não foram suficientes para atrair as fêmeas expostas, pois sabe-se que em algumas ocasiões apenas pistas visuais já são o suficiente para atrair moscas-varejeiras (WALL e FISHER, 2001; GOMES et al., 2007; GOMES, 2010).

Resultados diferentes dos testes com extratos de ovários foram observados nos tratamentos com extratos de ovos, na presença ou na ausência de substrato. Nos tratamentos com substrato, em *C. megacephala*, houve mais visitas nos extratos de 0 h em hexano do que seu controle. Enquanto que para *C. albiceps*, houve mais visitas apenas nos extratos de 10 h no hexano do que seu controle. De 12 tratamentos totais feitos com substrato e extratos de ovos

(seis para cada espécie) apenas dois tiveram diferença no número de visitas quando comparados aos seus controles, indicando que os extratos foram pouco percebidos pelas fêmeas. Ao comparar éter vs hexano nos cenários com substrato, também não há muita diferença, apenas mais visitas e visitas mais demoradas nos extratos de 0 h em éter para ambas as espécies. A pouca diferença entre os extratos e seus controles e entre éter e hexano nos tratamentos com substrato podem ser explicados pela influência, já discutida, do próprio substrato. O odor do substrato libera uma ampla gama de compostos químicos intensos e muito voláteis (LEBLANC, 2008) que necessita do olfato para ser captada, um sentido extremamente desenvolvido nesses insetos (JOHNSON e BORROR, 2005), tornando a percepção desses semioquímicos muito fácil. Talvez o odor do substrato mascare possíveis compostos encontrados nos extratos aplicados ao papel filtro, dificultando a aproximação e conseqüentemente, o número de visitas.

Isso fica ainda mais evidente ao analisar os resultados encontrados nos tratamentos com extratos de ovos sem substrato presente, dos 12 tratamentos, nove (sete em éter) apresentaram diferenças em relação ao seu controle, olhando para o número de visitas (6 tratamentos) nos papéis filtros ou para a duração delas (3 tratamentos), e para *C. albiceps*, também se nota uma diferença clara entre os solventes, os extratos em éter parecem provocar mais visitas e visitas mais duradouras que os extratos em hexano. Solventes polares como o éter já foram sugeridos como mais adequados para esses tipos de testes com califorídeos (LAM et al., 2007), nos cenários com substrato (explicado anteriormente), os extratos de éter também provocaram um pouco mais de atividade nas fêmeas do que o hexano, corroborando com a ideia. Em *C. megacephala*, os extratos de 0 h e 10 h em éter sem a presença de substrato apresentaram maior número de visitas quando comparados aos controles e visitas mais longas em 0 h, enquanto para hexano, apenas houve mais visitas no extrato de 5 h. Para *C. albiceps*, mais visitas e visitas mais longas tanto para os extratos de 0 h como 10 h em éter, enquanto que para hexano, também houve mais visitas no extrato de 5 h, o mesmo observado para *C. megacephala*. No geral, ao compararmos cenários com extratos de ovos na ausência de substrato vs cenários com extratos na presença de substrato (obviamente, extratos do mesmo tempo), vê-se que as fêmeas de *C. megacephala* e *C. albiceps* visitaram mais o papel filtro e a duração de tais visitas foi maior nos cenários sem substrato em extratos de éter. Indivíduos dessas espécies parecem responder bem às extrações com solventes polares.

Agora, qual seria o motivo de não ocorrer diferenças entre controle e extrato de 5 h em éter para ambas as espécies? Levando em conta que isso ocorre com os extratos de 0 h e 10 h, especialmente no número de visitas. Apesar de estatisticamente não ocorrer diferença, tanto em

C. megacephala quanto em *C. albiceps*, o extrato de 5 h recebeu mais visitas e teve visitas mais longas que seus controles, talvez uma amostragem maior de bioensaios ajudasse a evidenciar resultados semelhante aos dos extratos de 0 h e 10 h.

Ao registrar maior número de visitas nos tratamentos descritos acima (extratos em éter e sem substrato), pode-se inferir que as fêmeas testadas foram atraídas mais vezes para o papel filtro com extrato, e quando isso aconteceu, na maioria das vezes, houve também uma maior média de tempo das visitas nesses locais, indicando que as fêmeas, possivelmente, passaram um tempo maior avaliando o extrato em questão. E no geral, extratos de ovos parecem ser mais atrativos do que extratos de ovários.

4.2 Perfil químico

Como não houve atividade das fêmeas frente aos extratos de ovários, seus extratos não passaram pelas análises do CG-EM e, portanto, seu perfil químico não foi analisado.

A análise exploratória dos extratos de ovos em hexano (restante das amostras utilizadas nos bioensaios) mostraram contaminação do solvente (Apêndice B – Resultados complementares [Análises dos extratos em hexano]), como resultado, apenas as amostras feitas em éter foram quantificadas e qualificadas.

A descrição de compostos químicos identificados nos ovos de *C. megacephala* e *C. albiceps* no éter pode ser observada na tabela 8. A análise feita para avaliar o perfil de ovos de diferentes horas de desenvolvimento mostraram que para o ovo de *C. megacephala* não houve diferença significativa de compostos (Wilks' lambda= 0.001; F= 2.787; P= 0.297) entre as diferentes horas de desenvolvimento analisadas. E apesar de não haver diferença significativa em *C. megacephala*, o gráfico de dispersão indica uma tendência de separação das horas de desenvolvimento (Figura 35). Para ovos da espécie *C. albiceps* a análise indicou diferença significativa (Wilks' lambda= 0.001; F= 8.178; P= 0.0272) entre as diferentes horas de desenvolvimento analisadas (compostos diferentes em horários de desenvolvimentos diferente) (Figura 36).

Foram identificados ácidos graxos, alcanos ramificados (metilados), alcanos lineares e alcenos. Dentre eles, os compostos majoritários para ambas as espécies foram o alcano linear octadecano e o alcano ramificado 2-methyloctacosano. Em *C. albiceps*, os compostos 9-

metilheneicosano e o nonacosano também foram considerados majoritários para o perfil de ovos da espécie (Tabela 15).

Tabela 15 Porcentagem dos compostos superficiais nos ovos de *C. albiceps* e *C. megacephala*. ND = Não presente na amostra. TR = Tempo de retenção. IRC = Índice de retenção calculado.

TR	IRC	Compostos	<i>C. albiceps</i>	<i>C. megacephala</i>
20.995	1738	Ácido mirístico (C ₁₄)	0,08	ND
21.355	1771	3-metilheptadecano (3-MeC ₁₇)	ND	1,28
21.679	1800	Octadecano (C ₁₈)	71,96	48,97
23.070	1939	Ácido palmítico (C ₁₆)	3,65	4,86
23.428	1975	3-metilnonadecano (3-MeC ₁₉)	0,28	ND
24.950	2139	9-metilheneicosano (9-MeC ₂₁)	1,83	5,44
25.406	2191	Docoseno (C _{22:1})	1,22	0,79
26.387	2304	Tricosano (C ₂₃)	0,75	ND
26.695	2342	7-metiltricosano (7-MeC ₂₃)	0,39	0,34
27.094	2389	Tetracoseno (C _{24:1})	0,58	0,37
27.392	2434	8-metiltetracosano (8-MeC ₂₄)	ND	0,2
27.491	2440	11-metiltetracosano (11-MeC ₂₄)	0,36	ND
27.756	2473	9-pentacoseno (C _{25:1})	0,67	ND
27.946	2498	Pentacosano (C ₂₅)	0,24	ND
28.971	2636	12-metilhexacosano (12-MeC ₂₆)	ND	0,25
29.180	2665	2-metilhexacosano (2-MeC ₂₆)	0,7	2,82
29.455	2700	Heptacosano (C ₂₇)	2,07	1,4
29.730	2732	13-metilheptacosano (13-MeC ₂₇)	0,52	1,99
29.885	2753	5-metilheptacosano (5-MeC ₂₇)	ND	0,15
30.050	2763	9,13-dimetilheptacosano (9,13-DiMeC ₂₇)	0,57	0,55
30.300	2800	Octacosano (C ₂₈)	0,29	0,41
30.430	2813	3,7-dimetiloctacosano (3,7-DiMeC ₂₈)	0,95	ND
30.610	2831	14-metiloctacosano (14-MeC ₂₈)	ND	0,51
30.915	2860	2-metiloctacosano (2-MeC ₂₈)	7,14	18,28
31.020	2875	3-metiloctacosano (3-MeC ₂₈)	1,29	0,29
31.280	2900	Nonacosano (C ₂₉)	2,84	7,29
31.645	2929	9-metilnonacosano (9-MeC ₂₉)	ND	2,41
31.970	2956	5-metilnonacosano (5-MeC ₂₉)	ND	0,56
31.476	2972	3-metilhexacosano (3-MeC ₂₆)	0,49	ND
31.630	2929	9-metilnonacosano (9-MeC ₂₉)	0,95	ND
32.444	3000	Triacotano (C ₃₀)	0,2	0,51

As figuras 3 (*C. megacephala*) e 4 (*C. albiceps*) indicam que o perfil químico das duas espécies deve ser diferente nas diferentes horas analisadas, mas, de acordo com as análises estatísticas, a diferença só foi significativa para *C. albiceps*.

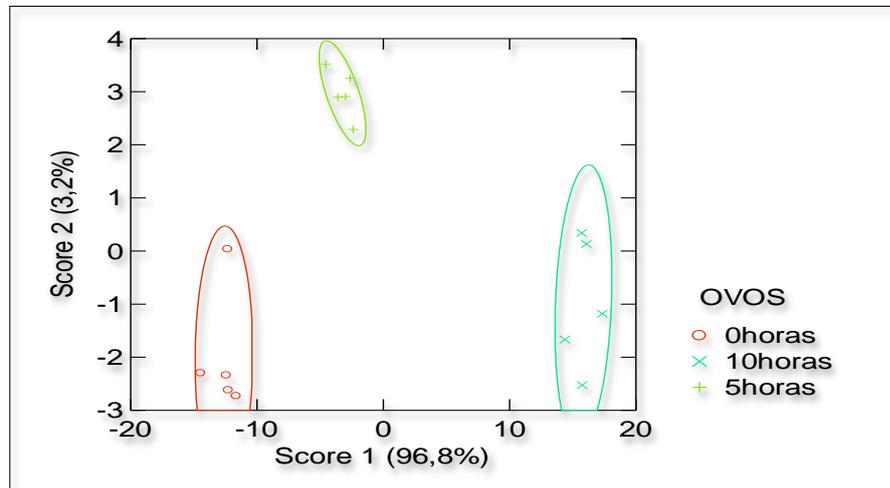


Figura 3 Gráfico de dispersão proveniente do perfil químico da superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* em diferentes horas de desenvolvimento.

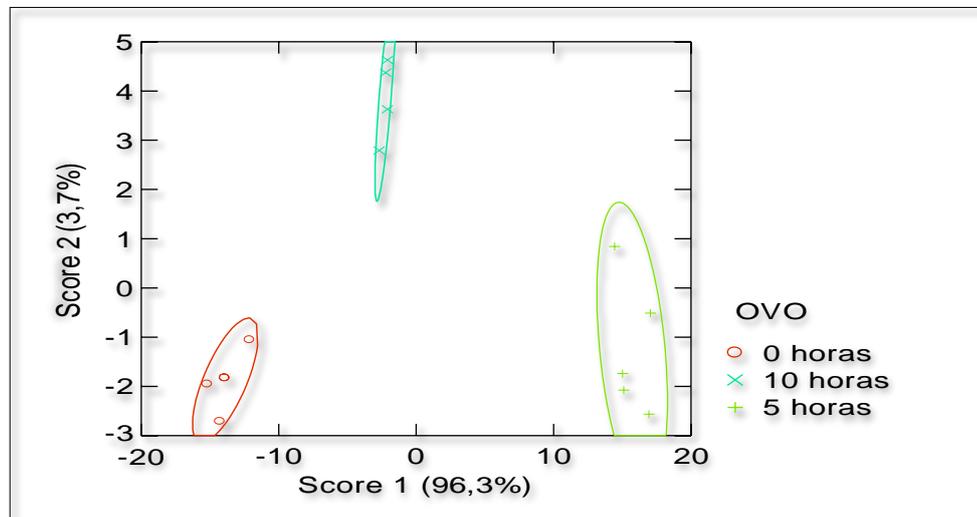


Figura 4 Gráfico de dispersão proveniente do perfil químico da superfície dos ovos de *Chrysomya albiceps* em diferentes horas de desenvolvimento.

Antes de discutir os perfis químicos encontrados nas superfícies dos ovos das espécies, as análises de CG-EM para o hexano podem ajudar a esclarecer o que foi encontrado nos bioensaios: nota-se que os resultados encontrados para o hexano são exatamente o oposto dos encontrados para éter (maior número de visitas das fêmeas nos extratos de 5 h, enquanto em éter, isso ocorre apenas em 0 h e 10 h) nos tratamentos sem substrato (nos cenários com

substrato, como já discutidos, os resultados foram muito semelhantes). A contaminação do hexano, evidenciada nas análises do CG-EM, não permite afirmar que todos os compostos encontrados nas extrações de éter estavam presentes também nas extrações de hexano durante os bioensaios, além de não saber a influência que seus contaminantes tiveram, o que impede uma análise mais confiável nos tratamentos com hexano, repetir os ensaios com um hexano não contaminado seria essencial para averiguar se resultados parecidos com os de éter aconteceriam ou se os mesmos resultados obtidos nesta pesquisa se repetiriam.

Sobre os perfis químicos da superfície dos ovos, uma grande variedade de compostos, incluindo as classes (em ordem decrescente de número de compostos) alcanos ramificados (metil), alcanos lineares, alcenos e ácidos graxos, foi encontrada na superfície dos ovos de *C. megacephala* e *C. albiceps* nos extratos de éter, e muitos deles podem estar envolvidos na regulação comportamental. Dos 31 compostos encontrados, apenas dois ainda não foram relatados em Calliphoridae, docoseno ($C_{22:1}$) e 3,7-dimetiloctacosano (3,7-DiMeC₂₈), os outros já foram relatados em adultos ou imaturos de califorídeos (STOFFOLANO et al., 1997; YE et al., 2007; BUTLER et al., 2009; MOORE et al., 2014; PAULA et al., 2017, 2018; LUNAS et al., 2019).

Ao comparar o perfil químico das duas espécies, nota-se 15 compostos em comum, nove exclusivos de *C. albiceps* e sete em *C. megacephala*, essas diferenças podem ajudar a identificar as espécies, pois geralmente cada espécie, e cada estágio diferente, possui uma “impressão digital” química (MOORE ET AL., 2014; PECHAL et al., 2014; BARBOSA et al., 2017; VOSS et al., 2017), ou seja, os diferentes perfis encontrados nos ovos podem ajudar a identificá-los como sendo de *C. megacephala* ou *C. albiceps*. Isso pode auxiliar em investigações forenses, pois permite identificar a espécie sem a necessidade de criação do ovo ou do imaturo encontrado na cena criminal.

Outra função relevante do perfil químico das espécies de importância forense é sua utilização para determinar a idade de indivíduos adultos (BERNHARDT et al., 2017) e imaturos (MOORE, 2013; MOORE et al., 2013, 2017; LUNAS et al., 2019; SHARMA et al., 2020). Conhecer a idade exata do estágio encontrado no cadáver permite um cálculo mais preciso do IPM. O perfil químico das espécies tende a mudar, tanto qualitativamente quanto quantitativamente, portanto, idades diferentes de um mesmo estágio, podem conter percentagens diferentes de um mesmo composto (ZHU et al., 2006; FREDERICKX et al., 2012; MOORE et al., 2013; BERNHARDT et al., 2017; BUTTERWORTH et al., 2020). No entanto, para a espécie *C. megacephala*, não foi identificada diferença significativa nos compostos

detectados em ovos de diferentes períodos de desenvolvimento. Já para *C. albiceps*, a análise discriminante indicou que há uma diferença significativa no perfil dos ovos de diferentes períodos de desenvolvimento, dessa maneira, seria possível identificar a idade do ovo com base nos compostos encontrados, tornando a espécie uma importante ferramenta forense. E, apesar do perfil químico de *C. megacephala* não ter apresentado uma diferença significativa entre os tempos de desenvolvimento dos ovos, o gráfico de dispersão demonstra que há uma separação entre eles, talvez um maior número de amostras possa provar que o perfil químico dos ovos dessa espécie também seja alterado com o passar do tempo.

Começando pelos ácidos graxos presentes, poucos foram encontrados em ambas as espécies. Nos insetos, eles geralmente estão nas camadas externas da epicutícula de adultos e imaturos, sua principal função é estabelecer uma barreira passiva à evaporação da água (HADLEY, 1994; GIBBS et al., 1998), isso minimiza a transpiração, protegendo contra a dessecação. Os lipídios cuticulares também estão frequentemente envolvidos na comunicação química intra e interespecífica (HOWARD, 1993; SINGER, 1998). Alguns pesquisadores também estão começando a utilizar esses compostos na quimiotaxonomia de insetos (LOCKEY, 1988; NELSON et al., 1995; LUNAS et al., 2019).

O único ácido graxo encontrado em *C. megacephala* foi o ácido palmítico (C₁₆), que também já foi encontrado nos ovos das mariposas *Ostrinia furnacalis* (LI e ISHIKAWA, 2005; GUO et al., 2009), *Lobesia botrana* (GABEL e THIERY, 1994), *Helicoverpa armígera* (LIU et al., 2008) e *Ostrinia scapulalis* (LI e ISHIKAWA, 2005), assim como nas fezes de larvas de *Helicoverpa armígera* (XU et al., 2006), *Spodoptera littoralis* (AHMED et al., 2015), *Pectinophora gossypiella* (SHAH et al., 2020) e *Phthorimaea operculella* (ZHANG et al., 2019), todas espécies de mariposas. Foi encontrado inclusive nos ovos de moscas-varejeiras (LUNAS et al., 2019). Esse ácido, agindo sozinho ou em uma mistura com outros ácidos graxos tem o papel de inibir fêmeas a depositarem ovos no local, sendo que esse sinal é reconhecido pela mesma espécie ou no caso de *L. botrana*, pode afetar também *Cydia pomonella* (Lepidoptera), evitando colonização simultânea e, conseqüentemente, competições intra e interespecíficas por espaço e recurso. Também pode ajudar a combater infecções por bactérias e fungos (ANANTH e MANI, 2015).

Em *C. albiceps*, além do ácido palmítico, o ácido mirístico (C₁₄) também foi encontrado. Assim como o ácido palmítico (C₁₆), ele pode funcionar como “ODP”, inibindo oviposições de outras fêmeas no mesmo local, o que ocorre nos ovos de *Cydia pomonella* (THIÉRY et al., 1995), *Helicoverpa armígera* (LIU et al., 2008), *Bactrocera carambolae* (Diptera) (MURYATI

et al., 2017) e em fezes de larvas de quatro espécies de *Ostrinia* (LI e ISHIKAWA, 2004). De fato, o ácido palmítico, junto com outros ácidos, é destacado como ácidos graxos comuns em insetos em geral (STANLEY-SAMUELSON et al., 1988).

Nota-se que a função de “ODP” geralmente ocorre entre indivíduos da mesma espécie, mas esses ácidos podem ter funções diferentes ao analisar interações interespecíficas: O ácido palmítico, por exemplo, atrai *Caryedon serratus* (Coleoptera) até sua fonte de alimento (PANDAY et al., 2011), podendo atrair diretamente parasitoides até o hospedeiro (MURALI-BASKARAN et al., 2020) ou indiretamente, como ocorre em *Cotesia glomerata* (Hymenoptera), que utiliza pistas químicas como esse ácido para encontrar a planta (no caso, o repolho) e localizar seu hospedeiro, a borboleta *Pieris rapae*, uma praga do repolho (HORIKOSHI et al., 1997). O ácido mirístico (C₁₄) também pode divergir da função previamente apresentada: ele é um conhecido atrativo para mosquitos *Aedes* e *Culex* presente na pele humana ou no sangue (ALLAN et al., 2006; SEENIVASAGAN et al., 2014) ou presente em misturas com mais ácidos que atraem outros insetos como *Ceratitis capitata* (Diptera) (ROSA et al., 2018) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera) (ADHIKARY et al., 2016).

Com relação aos hidrocarbonetos, geralmente em insetos, eles são cuticulares e a maioria deles tem baixa volatilidade, o que significa que são detectados principalmente por contato, por exemplo, ao tocar a superfície com suas antenas, peças bucais, pernas ou ovipositor (DRIJFHOUT et al., 2013). Os hidrocarbonetos podem ser encontrados na forma saturada (alcanos) e insaturada (alcenos) e podem ter um ou mais grupos metil ligados ao comprimento da cadeia (ramificados ou metilados), o que os tornam um pouco mais voláteis. A grande variedade desses compostos faz com que cada um possa ter uma função fisiológica diferente no comportamento dos insetos, sendo primeiramente utilizados como agentes impermeabilizantes (impedir a perda ou absorção d'água) e também como sinais de comunicação. E está ficando cada vez mais evidente que uma das principais funções dos hidrocarbonetos em artrópodes é servir como sinais de reconhecimento entre dois ou mais indivíduos. Basicamente, atuam como uma pista química primária que responde a um determinado inseto se outro indivíduo é da mesma espécie, do mesmo sexo, se faz parte do mesmo ninho ou colônia, a qual casta pertence, se é um predador ou apenas um estranho (HOWARD e BLOMQUIST, 2005).

Os alcenos são hidrocarbonetos que possuem uma ligação dupla em sua estrutura, podendo em alguns casos formar isômeros com diferentes funções, eles estão geralmente envolvidos com a comunicação sexual da espécie (HOWARD e BLOMQUIST, 2005; DRIJFHOUT et al., 2013).

Em *C. megacephala*, foram encontrados somente dois alcanos, o tetracoseno ($C_{24:1}$) e o docoseno ($C_{22:1}$). O $C_{24:1}$ funciona como sinal de reconhecimento de parceiros de ninho em *Manuelia postica* (Apidae) (FLORES-PRADO et al., 2008), enquanto o $C_{22:1}$ parece atrair *M. domestica* (MERESZ e MOZSGAI, 1976), também já foi descrito em glândulas de feromônio de fêmeas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera), funcionando como feromônio sexual (EL-GASHINGY et al., 2018) e em plantas do gênero *Clusia*, parece ter uma função atrativa em insetos polinizadores (DE L. NOGUEIRA et al., 2001).

Em *C. albiceps*, além do $C_{22:1}$, o 9-pentacoseno ($C_{25:1}$) também estava presente e tanto ele como seu isômero aparentam ter funções variadas entre os insetos, entre elas o de feromônio de agregação em *M. domestica* (RICHTER et al., 1976), *Harmonia axyridis* (Coleoptera) (DURIEUX et al., 2012) e *Forficula auricularia* (Forficulidae) (QUARRELL et al., 2016). Também age como feromônio sexual, estimulando o macho a buscar, identificar e copular com a fêmea em *D. melanogaster* (FERVEUR e SUREAU, 1996; SIWICKI et al., 2005), *Megacyllene robinbe* (Coleoptera) (GINZEL et al., 2003) e em três espécies de *Fannia* (Diptera) (UEBEL et al., 1978). Bolton et al. (1980) também afirmam que seu isômero é atrativo para a mosca-do-chifre, tanto sozinho como misturado com outros alcanos.

Sobre os alcanos lineares, foram encontrados seis em *C. megacephala* e sete em *C. albiceps*, os alcanos lineares são compostos cuticulares encontrados em proporções variadas entre os insetos, desde a inexistência completa, como na mosca tsé-tsé a 98,3% da composição no besouro tenebrionídeo adulto, *Eurychora sp.* (LOCKEY, 1985, 1988). A forma linear dos n-alcanos permite uma maior aproximação entre suas moléculas e, portanto, são ideais para funcionar como barreiras impermeáveis (função principal) e há relativamente pouca evidência conclusiva de que são utilizados por insetos como compostos de sinalização específicos (DRIJFHOUT et al., 2013).

Porém os encontrados em *C. megacephala*, heptacosano (C_{27}), octacosano (C_{28}), octadecano (C_{18}) e nonacosano (C_{29}) (os dois últimos foram compostos majoritários nos ovos de ambas as espécies). Já foram descritos como compostos atrativos para diferentes insetos: C_{27} e C_{29} atraem *Aulacophora foveicollis* (Coleoptera) até sua planta hospedeira (presente em suas folhas) (SARKAR et al., 2013), algo semelhante ocorre com C_{28} e, novamente, C_{29} em *Epilachna dodecastigma* (Coleoptera) (SARKAR et al., 2013). O C_{18} é atrativo para mais de oito espécies de insetos polinizadores (NISHANBAEV et al., 2016).

Outras funções já relatadas desses compostos é o de estimulantes de oviposição (em relações interespecíficas do tipo planta-hospedeiro, principalmente) e feromônios sexuais de contato (auxiliam no reconhecimento para iniciar a cópula): C₂₇ e C₂₉ estimulam oviposição em *Ostrinia latipennis* (Lepidoptera) e *O. nubilalis* (UDAYAGIRI e MASON, 1997), sendo que o primeiro também estimula *Ostrinia furnacalis* (JIANG et al., 2015). O C₁₈, C₂₈ e C₂₉ estimulam *Aphis craccivora* (Hemiptera) a larvipor na planta hospedeira (MITRA et al., 2020). O C₁₈, junto com outros hidrocarbonetos, tem o papel de feromônio sexual na mosca *Lycoriella mali* (KOSTELC et al., 1979; GOTOH et al., 1999).

Em *C. albiceps*, além dos compostos citados acima, foram encontrados o tricosano (C₂₃) e o pentacosano (C₂₅), ambos apresentam as mesmas funções de atração, agregação e feromônio sexual em outras espécies. O C₂₃ provoca agregação de fêmeas de *M. domestica* e as estimula a ovipor no mesmo local que estão outros ovos (JIANG et al., 2002), além de provocar agregação na popular joaninha (*Hippodamia convergens*) (WHEELER e CARDÉ, 2014) e em *Harmonia axyridis* (Coleoptera) (DURIEUX et al., 2012). Entre as varejeiras, também age como feromônio sexual de contato em *P. regina* (STOFFOLANO et al., 1997). O C₂₅ está entre os três hidrocarbonetos mais presentes nos insetos (BLOMQUIST e BAGNÈRES, 2010) e, em conjunto com outros compostos, pode atrair e estimular oviposição em *Spilosoma obliqua* (Lepidoptera) (MOBARAK et al., 2020), agregar indivíduos de *Reticulitermes speratus* (Isoptera) (MITAKA et al., 2020) e *Harmonia axyridis* (Coleoptera) (DURIEUX et al., 2012) e atuar como feromônio de contato e de curto alcance (semi-volátil) em *Mylocerinus aurolineatus* (Coleoptera) (SUN et al., 2017).

O último grupo, e o mais representativo, é o de alcanos ramificados, no caso, os alcanos metilados (com um grupo metil na estrutura). Em *C. megacephala*, entre os 14 alcanos metilados identificados, a grande maioria desempenha basicamente duas funções em outros insetos: a de feromônio sexual e o papel de agregação de adultos. O 11-metiltricosano (11-MeC₂₄), junto com outros hidrocarbonetos, como o 5-metilheptacosano (5-MeC₂₇), provoca agregação em quatro espécies de *Periplaneta* (SAÏD et al., 2005) e ajuda os machos na identificação das fêmeas para cópula em *P. regina* (STOFFOLANO et al., 1997). O 13-metilheptacosano (13-MeC₂₇) funciona como feromônio sexual em *Atheloca bondari* (Lepidoptera) (QUEIROZ, 2019) e na mariposa *Cacopsylla pyricola*, atraindo o macho (GUÉDOT et al., 2009). O 2-metiloctacosano (2-MeC₂₈) (um dos compostos majoritários nas espécies) age como sinal de reconhecimento e de cópula em *P. regina* (STOFFOLANO et al.,

1997), *Drosophila subobscura* (PAYKOVIC-LUCIC et al., 2018) e *Mallodon dasystemus* (Coleoptera) (SPIKES et al., 2010).

Alguns compostos ajudam no reconhecimento intraespecífico ou auxiliam na diferenciação das espécies. A diferença na concentração de 8-metilhexacosano (8-MeC₂₄) na cutícula, por exemplo, ajuda três espécies de *Mischocyttarus* (Hymenoptera) a reconhecer indivíduos de seus ninhos (SOARES et al., 2017), o que ao mesmo tempo, serve como ferramenta taxonômica para pesquisadores. O 12-metilhexacosano (12-MeC₂₆), o 14-metiloctacosano (14-MeC₂₈) e o 5-metilnonacosano (5-MeC₂₉) agem de maneira semelhante, quando presentes em misturas de hidrocarbonetos, em *Polistes biglumis* (Hymenoptera) (LORENZI et al., 1997), *Camponotus morosus* e *Solenopsis gayi* (Hymenoptera) (ERRARD et al., 2003) e *Lasius nipponensis* (Hymenoptera) (AKINO et al., 2005), respectivamente. Além dessa função, o 14-MeC₂₈ e o 5-MeC₂₉ também estão presentes na mistura que provoca agregação em espécies de *Periplaneta* (SAÏD et al., 2005).

Para encerrar os alcanos ramificados em *C. megacephala*, o 11-metiltricosano (11-MeC₂₄), 14-MeC₂₈ e 9-metilnonacosano (9-MeC₂₉) também se mostraram boas ferramentas forenses na identificação da idade de estágios adultos e imaturos de califórídeos (POMONIS, 1989; MOORE et al., 2014; MOORE et al., 2016). Não há relatos sobre as possíveis funções do 3-metiloctacosano (3-MeC₂₈) e 9-metilheicosano (9-MeC₂₁) (um dos majoritários) em insetos.

Em *C. albiceps*, 11-MeC₂₄, 9-MeC₂₁, 13-MeC₂₇, 2-MeC₂₈, 3-MeC₂₈ e 9-MeC₂₉ foram discutidos anteriormente. O 7-metiltricosano (7-MeC₂₃) e 2-metilhexacosano (2-MeC₂₆) têm função de feromônio sexual de contato, o primeiro age em *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera) (OLANIRAN et al., 2013) e em *P. regina* (STOFFOLANO et al., 1997), enquanto o segundo age em *Mallodon dasystemus* (Coleoptera) (SPIKES et al., 2010). O 3-metilhexacosano (3-MeC₂₆) auxilia a identificar estágios diferentes de pupa de *C. megacephala*, auxiliando investigações forenses em locais fechados (PAULA et al., 2018).

4.3 Comunidade bacteriana

4.3.1 Ovários e superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala*

Durante o processamento das amostras da superfície dos ovos e dos ovários de *C. megacephala* não foram encontradas bases estranhas nem adaptadores, a amostra estava limpa. As métricas estão apresentadas na tabela 16.

Tabela 16 Métricas do processamento das sequências obtidas.

Amostra	Ovos de <i>C. megacephala</i>	Ovários de <i>C. megacephala</i>
Número total de reads	145.048	161.980
Tamanho dos reads	301	301
Conteúdo GC (%)	52,68	47
Número de reads classificados	145.029/99,99%	161.978/99,99%

Nos ovários de *C. megacephala* foram encontradas 130 espécies de bactérias em 63 gêneros (Figura 5).

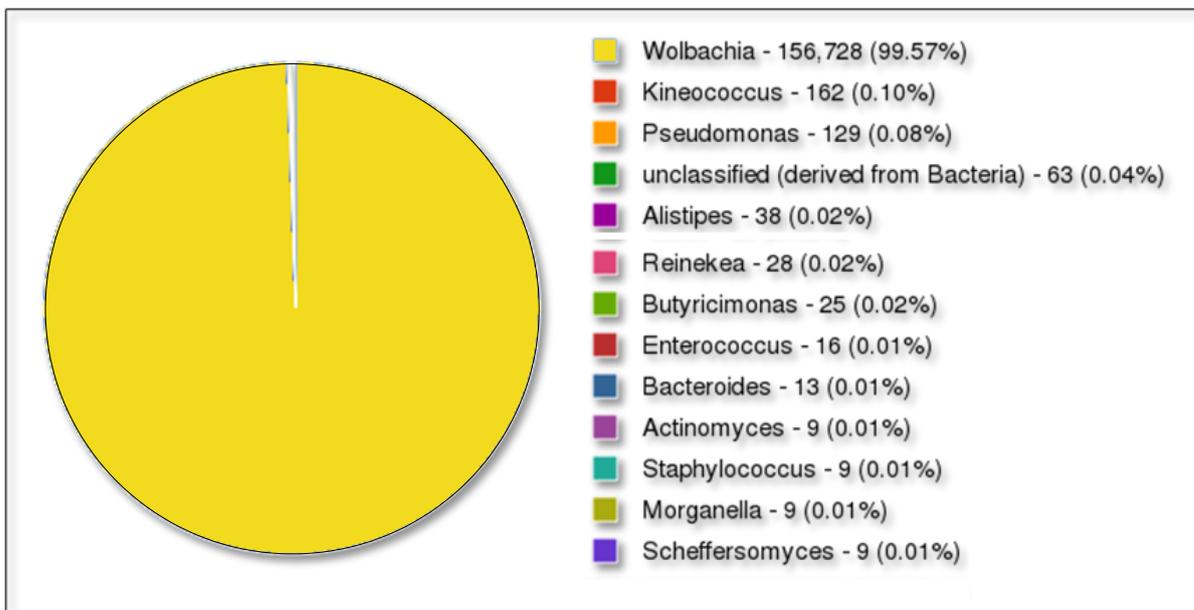


Figura 5 Valores e porcentagens das sequências encontradas para os gêneros bacterianos mais abundantes nos ovários de *Chrysomya megacephala*.

Há uma predominância quase que total do gênero *Wolbachia* (99,57%), seguida por *Kineococcus* (0,1%) e *Pseudomonas* (0,08%). Em seguida (Tabela 17), estão as espécies de bactérias mais abundantes nos ovários.

Tabela 17 Espécies mais abundantes nos ovários de *Chrysomya megacephala* de acordo com os valores de sequências encontradas.

Filo	Espécie	n.º. de sequências
Proteobacteria	<i>Wolbachia pipientis</i>	160059
Proteobacteria	<i>Wolbachia sp.</i> não cultivada	1461
Proteobacteria	<i>Wolbachia</i> endossimbionte de <i>Odontotermes horni</i>	1426
Proteobacteria	<i>Wolbachia</i> endossimbionte de <i>Tunga trimamilata</i> (Bos)	250
Proteobacteria	<i>Wolbachia</i> endossimbionte de <i>Drosophila mauritiana</i>	210

Como definição para esta pesquisa, uma espécie abundante, além do alto número de sequências, não pode ter sido encontrada nas análises dos substratos. Nos ovários, essas bactérias representaram 99,26% de todas as sequências analisadas. Entre as cinco espécies abundantes, foi possível identificar apenas uma bactéria, *Wolbachia pipientis* (a mais predominante), o restante, apesar da exatidão na identificação do gênero (todas pertencem a *Wolbachia*), são organismos próximos aos indicados. Espécies “não cultivadas” são espécies que ainda não foram identificadas e, portanto, não aparecem nos bancos de dados.

Na superfície dos ovos de *C. megacephala* foram encontradas 395 espécies de bactérias em 159 gêneros (Figura 6).

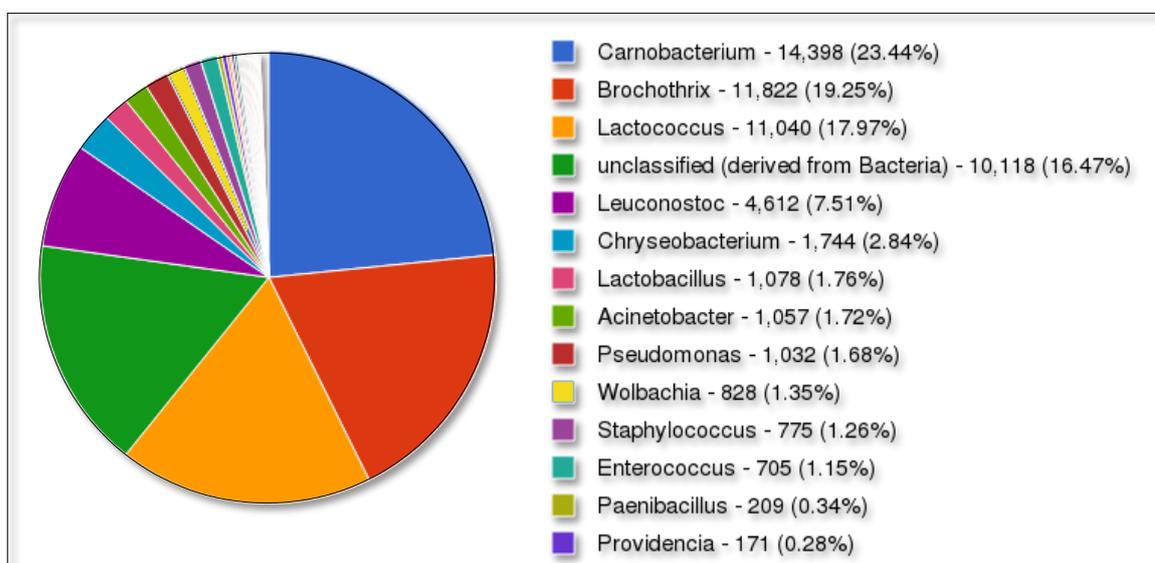


Figura 6 Valores e porcentagens das sequências encontradas para os gêneros bacterianos mais abundantes nas superfícies dos ovos de *Chrysomya megacephala*.

Há predominância dos gêneros *Carnobacterium* (23,44%), *Brochothrix* (19,25%), *Lactococcus* (17,97%) e *Leuconostoc* (7,51%). As espécies mais abundantes estão na tabela 18.

Tabela 18 Espécies mais abundantes na superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala* de acordo com os valores de sequências encontradas.

Filo	Espécie	n.º. de sequências
Proteobacteria	<i>Serratia grimesii</i>	5046
Proteobacteria	<i>Klebsiella sp.</i> não cultivada	4085
Firmicutes	<i>Vagococcus teuberi</i>	2256
Firmicutes	<i>Vagococcus carniphilus</i>	2098
Firmicutes	<i>Brochothrix campestris</i>	1834
Firmicutes	<i>Enterococcus faecalis</i>	1290
Firmicutes	<i>Lactobacillus sakei</i>	987
Proteobacteria	<i>Providencia rettgeri</i>	987
Firmicutes	<i>Lactobacillus lactis</i>	935
Proteobacteria	<i>Morganella morganii</i>	926
Actinobacteria	<i>Corynebacterium variable</i>	902
Proteobacteria	<i>Wolbachia pipentis</i>	860
Firmicutes	<i>Staphylococcus cohnii</i>	713
Firmicutes	<i>Enterococcus termitis</i>	689
Proteobacteria	<i>Pseudomonas fulva</i>	677
Firmicutes	<i>Leuconostoc inhae</i>	668
Proteobacteria	<i>Acinetobacter septicus</i>	619
Bacteroidetes	<i>Marinilabilia salmonicolor</i>	305
Proteobacteria	<i>Hafnia alvei</i>	254
Proteobacteria	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	248
Proteobacteria	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	236

Para a superfície dos ovos, as espécies abundantes representaram 17,4% de todas as sequências analisadas. No total, 21 espécies se mostraram presente em maior quantidade na superfície dos ovos de *C. megacephala*. As mais abundantes foram *Serratia grimesii*, *Klebsiella sp.*, *Vagococcus teuberi*, *V. carniphilus* *Brochothrix campestris* e *Enterococcus faecalis*.

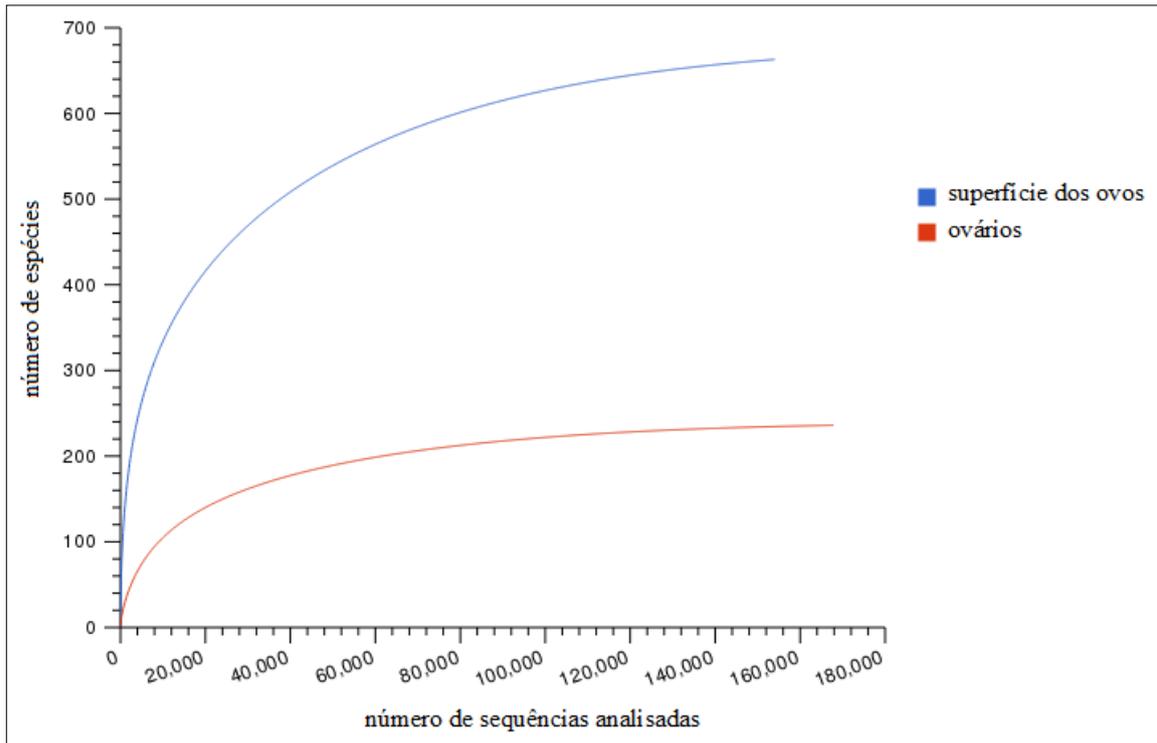


Figura 7 Curva de rarefação para as seqüências encontradas nos ovários e na superfície dos ovos de *Chrysomya megacephala*.

Após atribuir as seqüências a seus respectivos grupos, é necessário avaliar essa diversidade bacteriana, saber se a riqueza de espécies obtida condiz com o esforço amostral. As curvas de rarefação permitem a comparação da riqueza observada em diferentes amostras, sendo que a intensidade de amostragem considera a quantidade de seqüências analisadas (HUGHES et al., 2001) (Figuras 7 e 11). Uma amostragem é considerada estatisticamente confiável quando a curva de rarefação atinge um *plateau*, saturando o número de espécies encontrado, isso significa que o total de seqüências obtidas para cada amostra foi suficiente para identificar em sua totalidade as espécies desse espaço amostral de forma que incluir novas seqüências (sequenciamento) não aumentaria o número de espécies encontradas (ROESCH et al., 2007; ARMOUGOM e RAOULT, 2009; MAGURRAN, 2013; PASTORE et al., 2016).

Ao comparar a quantidade de gêneros encontrada nos ovários e na superfície dos ovos para as espécies mais abundantes, foram encontrados 10 gêneros exclusivos da superfície dos ovos. Em contrapartida, o gênero da espécie mais abundante no ovário também apareceu na superfície dos ovos (Figura 8).

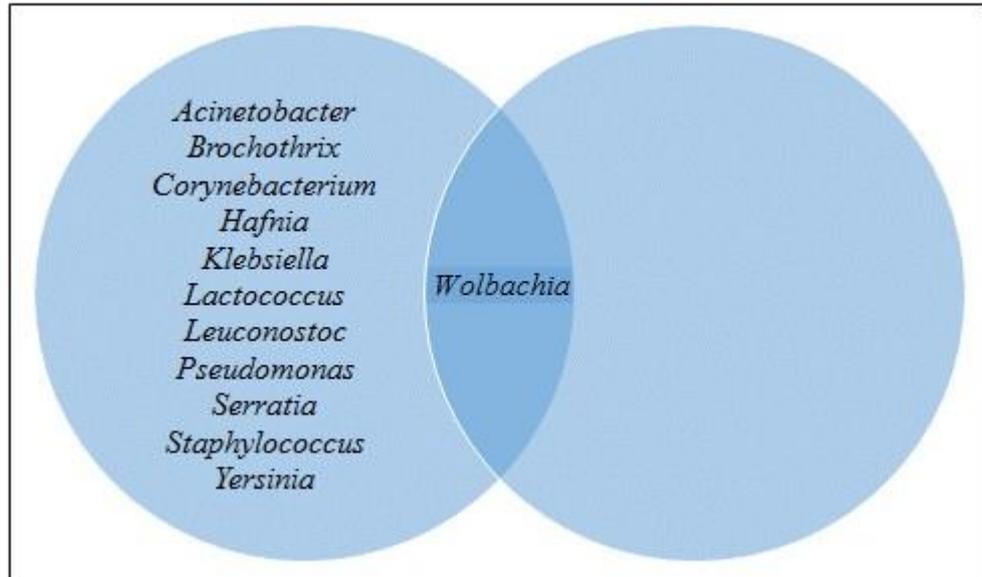


Figura 8 O diagrama de Venn ilustra a distribuição dos gêneros exclusivos e compartilhados entre os ovários (direita) e a superfície dos ovos (esquerda) de *Chrysomya megacephala* apenas para as espécies mais abundantes.

Entre as espécies abundantes, apenas *Wolbachia pipientis* apareceu tanto nos ovários como na superfície dos ovos.

4.3.2 Ovários e superfície dos ovos de *Chrysomya albiceps*

Durante o processamento das amostras das superfícies dos ovos e dos ovários de *C. albiceps* também não foram encontradas bases estranhas nem adaptadores, a amostra estava limpa. As métricas estão apresentadas na tabela 19.

Tabela 19 Métricas do processamento das sequências obtidas.

Amostra	Ovos de <i>C. albiceps</i>	Ovários de <i>C. albiceps</i>
Número total de <i>re</i>	158.109	134.047
Tamanho dos <i>reads</i>	301	301
Conteúdo GC (%)	52,23	52,39
Número de <i>read s c</i>	158.099/99,99%	134.043/99,99%

Nos ovários de *C. albiceps* foram encontradas 293 espécies de bactérias em 119 gêneros (Figura 9).

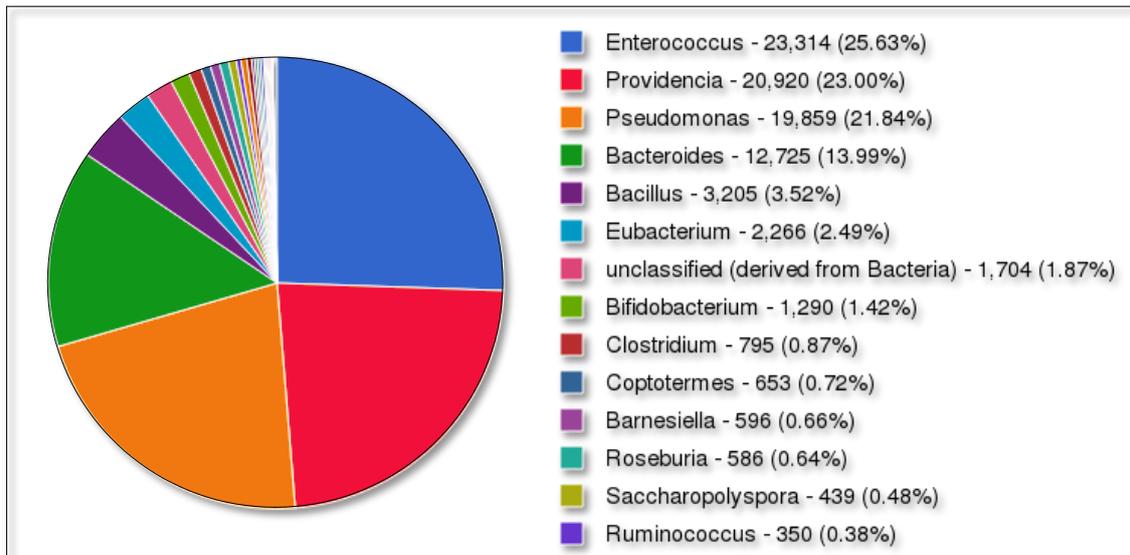


Figura 9 Valores e porcentagens das seqüências encontradas para os gêneros bacterianos mais abundantes nos ovários de *Chrysomya albiceps*.

Na figura 9, nota-se predominância de *Enterococcus* (25,63%), *Providencia* (23%), *Pseudomonas* (21,84%) e *Bacteroides* (13,9%).

Tabela 20 Espécies mais abundantes nos ovários de *Chrysonya albiceps* de acordo com os valores de sequências encontradas.

Filo	Espécie	n.º. de sequências
Firmicutes	<i>Enterococcus termitis</i>	23472
Proteobacteria	<i>Providencia stuartii</i>	21135
Firmicutes	<i>Vagococcus carniphilus</i>	12405
Firmicutes	<i>Vagococcus teuberi</i>	12354
Bacteroidetes	<i>Bacteroides plebeius</i>	7768
Bacteroidetes	<i>Porphyromonas catoniae</i>	6083
Firmicutes	<i>Eubacterium rectale</i>	3508
Proteobacteria	<i>Morganella morganii</i>	3378
Firmicutes	<i>Bacillus simplex</i>	2942
Bacteroidetes	<i>Bacteroides vulgatus</i>	2457
Bacteroidetes	<i>Bacteroides uniformis</i>	2090
Firmicutes	<i>Clostridium cellobioparum</i>	811
Firmicutes	<i>Clostridium disporicum</i>	793
Firmicutes	<i>Roseburia faecis</i>	643
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	626
Firmicutes	<i>Roseburia intestinalis</i>	620
Bacteroidetes	<i>Barnesiella intestinhominis</i>	614
Proteobacteria	<i>Desulfovibrio sp . não cultivada</i>	443
Proteobacteria	<i>Serratia sp . não cultivada</i>	437
Firmicutes	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	404
Proteobacteria	Beta proteobactéria não cultivada	399
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	367
Firmicutes	<i>Blautia sp. Ser8</i>	364
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	360
Firmicutes	<i>Ruminococcus obeum</i>	355
Verrucomicrobia	<i>Prostheco bacter dejongeii</i>	348
Firmicutes	<i>Ruminococcus albus</i>	347
Proteobacteria	<i>Providencia rettgeri</i>	343
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium sp. Eg1</i>	336
Verrucomicrobia	bactéria <i>Ellin514</i>	309
Bacteroidetes	<i>Bacteroides caccae</i>	305
Firmicutes	<i>Hespellia porcina</i>	279
Bacteroidetes	<i>Parabacteroides distasonis</i>	252
Bacteroidetes	<i>Bacteroides ovatus</i>	241
Proteobacteria	Alfa proteobactéria não cultivada	235
Bacteroidetes	<i>Pedobacter heparinus</i>	221
Bacteroidetes	<i>Odoribacter splanchnicus</i>	220
Bacteroidetes	<i>Alistipes fnegoldii</i>	220
Bacteroidetes	<i>Alistipes shahii</i>	220
Firmicutes	<i>Clostridium aldrichii</i>	219

Nos ovários de *C. albiceps*, as espécies mais abundantes (Tabela 20) representaram 84,6% de todas as sequências analisadas. Entre as 41 espécies, apenas quatro não foram identificadas, as mais abundantes foram *Enterococcus termitis*, *Providencia stuartii*, *Vagococcus carniphilus* e *V. teuberi*.

Na superfície dos ovos de *C. albiceps* foram encontradas 505 espécies de bactérias em 213 gêneros (Figura 10).

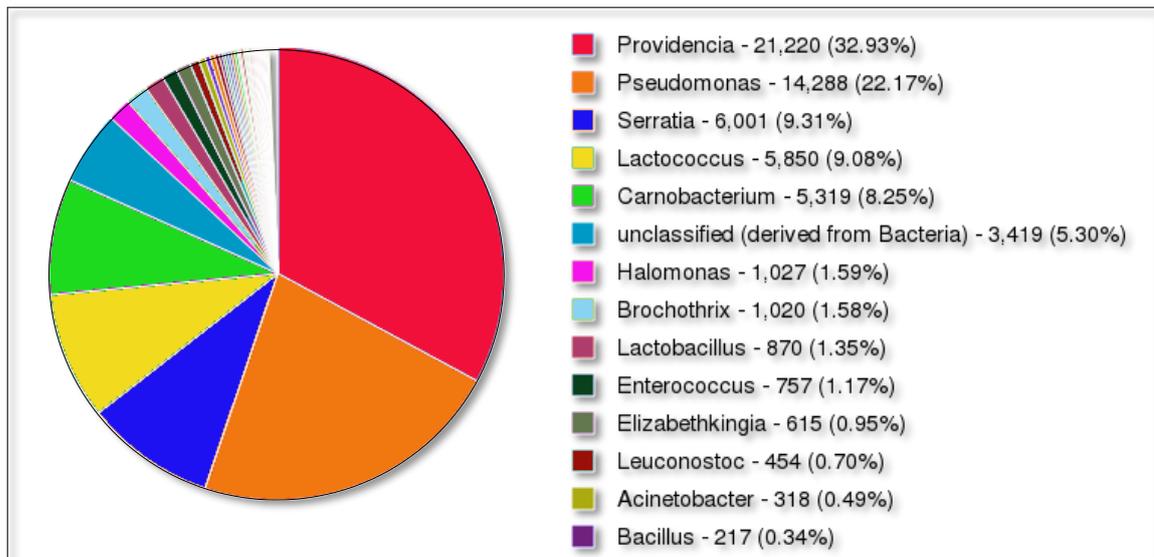


Figura 10 Valores e porcentagens das sequências encontradas para os gêneros bacterianos mais abundantes na superfície dos ovos de *Chrysomya albiceps*.

Os gêneros mais predominantes na superfície dos ovos de *C. albiceps* foram *Providencia* (32,93%), *Pseudomonas* (22,17%), *Serratia* (9,31%), *Lactococcus* (9,08%) e *Carnobacterium* (8,25%).

Tabela 21 Espécies mais abundantes na superfície dos ovos de *Chrysomya albiceps* de acordo com os valores de sequências encontradas.

Filo	Espécie	n.º de sequências
Proteobacteria	<i>Providencia rettgeri</i>	11824
Proteobacteria	<i>Providencia stuartii</i>	9986
Proteobacteria	<i>Serratia sp. J49</i>	6087
Firmicutes	<i>Vagococcus carniphilus</i>	4635
Firmicutes	<i>Vagococcus teuberi</i>	4635
Proteobacteria	<i>Halomonas cupida</i>	1021
Firmicutes	<i>Brochothrix campestris</i>	981
Firmicutes	<i>Lactobacillus algidus</i>	855
Proteobacteria	<i>Buttiauxella agrestis</i>	709
Firmicutes	<i>Enterococcus termitis</i>	674
Proteobacteria	<i>Sphingomonas melonis</i>	627
Firmicutes	<i>Leuconostoc gelidum</i>	443
Firmicutes	<i>Lactococcus lactis</i>	387
Proteobacteria	Alfa proteobactéria não cultivada	366
Proteobacteria	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	330
Não classificado	organismo não cultivado	291
Proteobacteria	<i>Rahnella aquatilis</i>	218
Actinobacteria	<i>Janibacter sp. BY48</i>	213
Proteobacteria	<i>Morganella morganii</i>	209
Proteobacteria	<i>Pseudomonas sp. ISO1</i>	208
Firmicutes	<i>Bacillus plakortidis</i>	208

Na superfície dos ovos de *C. albiceps*, as espécies mais abundantes representaram 31,8% de todas as sequências analisadas. Entre as 21 espécies, *Providencia rettgeri* e *P. stuartii*, *Serratia sp. J49*, *Vagococcus carniphilus*, *V. teuberi* e *Halomonas cupida* foram as mais abundantes (Tabela 21). Apenas duas espécies não foram identificadas.

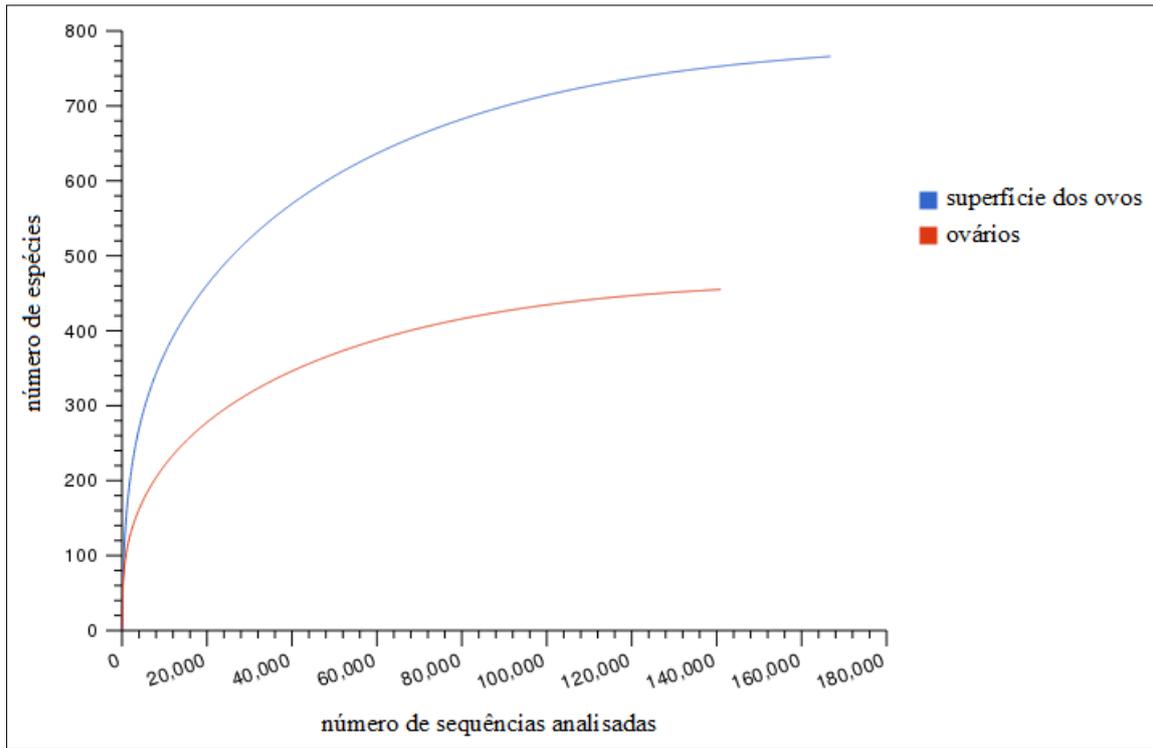


Figura 11 Curva de rarefação para as sequências encontradas nos ovários e na superfície dos ovos de *Chrysomya albiceps*.

Ao comparar a quantidade de gêneros encontrada no ovário e na superfície dos ovos (Figura 12) para as espécies mais abundantes, foram encontrados 9 gêneros exclusivos da superfície dos ovos e 17 no ovário. Quatro gêneros são compartilhados.

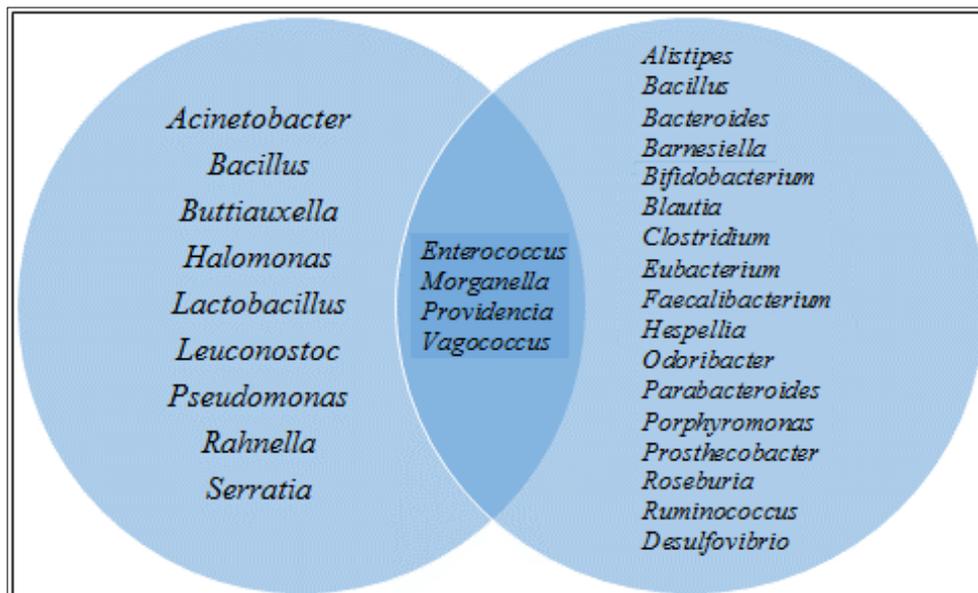


Figura 12 O diagrama de Venn ilustra a distribuição dos gêneros exclusivos e compartilhados entre ovário (direita) e superfície dos ovos (esquerda) de *Chrysomya albiceps* apenas para as espécies mais abundantes.

Entre as espécies mais abundantes, *Enterococcus termitis*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *Vagococcus carniphilus*, *V. teuberi* e uma alfa proteobactéria não cultivada apareceram tanto nos ovários como na superfície dos ovos.

Após comparar os resultados dos ovários e da superfície dos ovos na mesma espécie, foram realizadas análises interespecíficas.

4.3.3 Comparação entre comunidade bacteriana de *C. megacephala* e *C. albiceps*

A comunidade bacteriana diferiu bastante nos ovários entre as duas espécies. Entre as espécies mais abundantes, não houve nenhuma espécie em comum entre as duas moscas-varejeiras, apenas espécies exclusivas. Foram encontradas 15 espécies abundantes exclusivas nos ovários de *C. albiceps*, enquanto houve apenas uma exclusiva nos ovários de *C. megacephala* (Tabela 22).

Tabela 22 Bactérias abundantes exclusivas dos ovários de *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya albiceps*. O “x” significa ausência daquela espécie na mosca-varejeira e o “o” significa presença dela.

Espécie	<i>C. megacephala</i>	<i>C. albiceps</i>	n.º de sequências
<i>Bacillus simplex</i>	x	o	2942
<i>Bacteroides caccae</i>	x	o	305
<i>Bacteroides plebeius</i>	x	o	7768
<i>Bacteroides uniformis</i>	x	o	2090
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	x	o	367
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	x	o	360
<i>Bifidobacterium sp. Egl</i>	x	o	336
<i>Blautia sp. Ser8</i>	x	o	364
<i>Clostridium cellobioparum</i>	x	o	811
<i>Hespellia porcina</i>	x	o	279
<i>Parabacteroides distasonis</i>	x	o	252
<i>Roseburia faecis</i>	x	o	643
<i>Roseburia intestinalis</i>	x	o	620
<i>Ruminococcus obeum</i>	x	o	355
<i>Desulfovibrio sp.</i> não cultivada	x	o	443
<i>Wolbachia</i> endossimbionte de <i>Tunga trimamillata</i> (Bos)	o	x	250

Ao comparar as superfícies dos ovos, foram encontradas sete espécies abundantes em comum entre as moscas-varejeiras, *Brochothrix campestris*, *Enterococcus termitis*, *Lactococcus lactis*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Vagococcus carniphilus* e *V.*

teuberi. Por outro lado, houve cinco espécies abundantes exclusivas da superfície dos ovos de *C. albiceps*, incluindo uma espécie não identificada e três que só apareceram em *C. megacephala*. (Tabela 23)

Tabela 23 Bactérias abundantes exclusivas das superfícies dos ovos *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya albiceps*. O “x” significa ausência daquela espécie na mosca-varejeira e o “o” significa presença dela.

Espécie	<i>C. megacephala</i>	<i>C. albiceps</i>	n.º de sequências
<i>Bacillus plakortidis</i>	x	o	208
<i>Halomonas cupida</i>	x	o	1021
<i>Pseudomonas sp. ISO1</i>	x	o	208
<i>Sphingomonas melonis</i>	x	o	627
organismo não cultivado	x	o	291
<i>Corynebacterium variabile</i>	o	x	902
<i>Pseudomonas fulva</i>	o	x	67
<i>Staphylococcus cohnii</i>	o	x	713

Abaixo (Tabela 24) estão os resultados das análises de associação para saber se existe relação entre as bactérias presentes nos ovários e nos ovos para cada espécie. As tabelas indicam os valores obtidos para os três coeficientes analisados.

Tabela 24 Valores dos coeficientes de correlação para *Chrysomya megacephala* e *C. albiceps*.

Correlação Coeficiente	Ovário vs Superfície dos ovos <i>C. megacephala</i>	Ovário vs Superfície dos ovos <i>C. albiceps</i>
	Pearson - r	0,0122
Spearman - ρ	-0,2445	-0,2807
Kendall - τ	-0,2039	-0,2347

Nota-se que os valores dos coeficientes para ambas as espécies não são suficientes para mostrar uma correlação forte, tanto negativa como positiva, em nenhuma situação entre o número de sequências encontradas em cada táxon. A seguir, para ilustrar melhor essa correlação, estão os gráficos de dispersão para cada espécie (Figuras 13 e 14), comparando apenas os dados entre ovários e superfície dos ovos. A figura 15 serve como um comparativo, ela indica o padrão que os gráficos de dispersão seguem em diferentes situações de correlação.

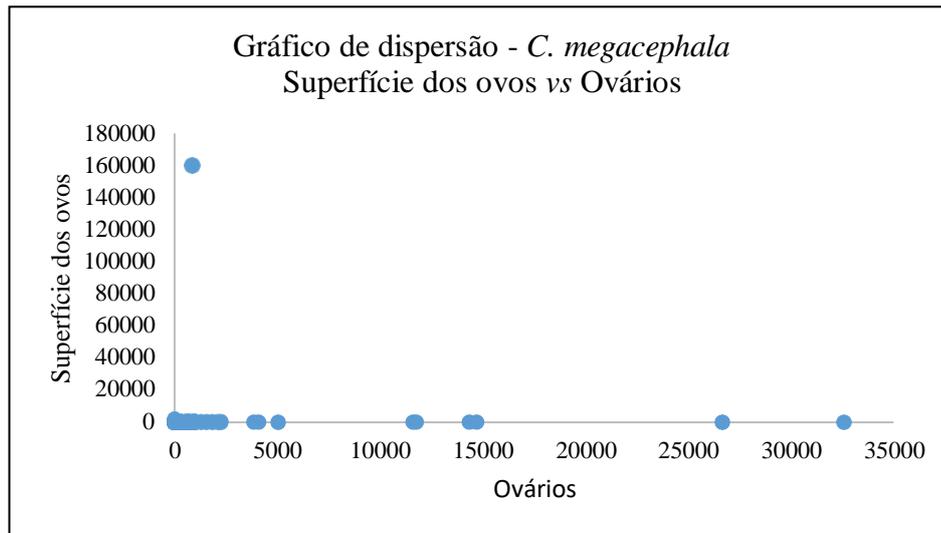


Figura 13 Gráfico de dispersão do número de seqüências da superfície dos ovos (eixo y) e dos ovários (eixo x) em *Chrysomya megacephala*.

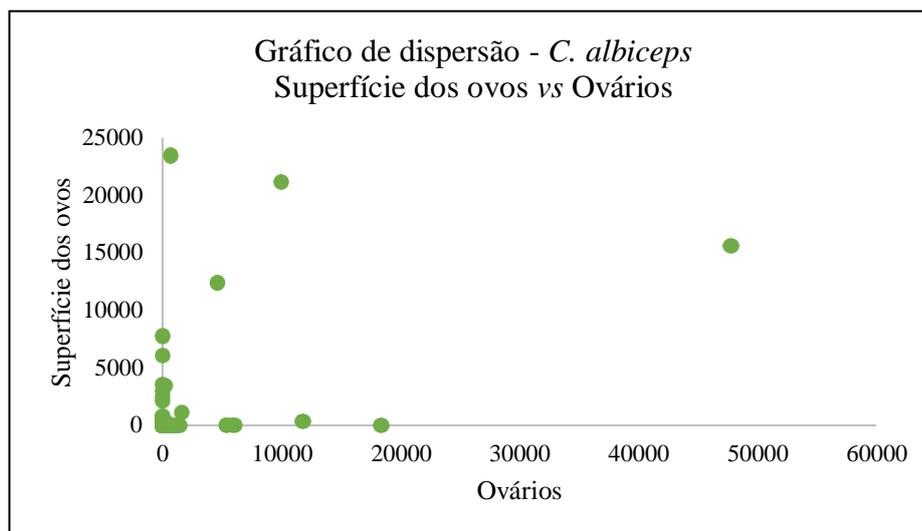


Figura 14 Gráfico de dispersão do número de seqüências da superfície dos ovos (eixo y) e dos ovários (eixo x) em *Chrysomya albiceps*.

Observando os comparativos (Figura 15), pode-se concluir que a correlação é muito baixa, praticamente inexistente entre as situações para as duas espécies.

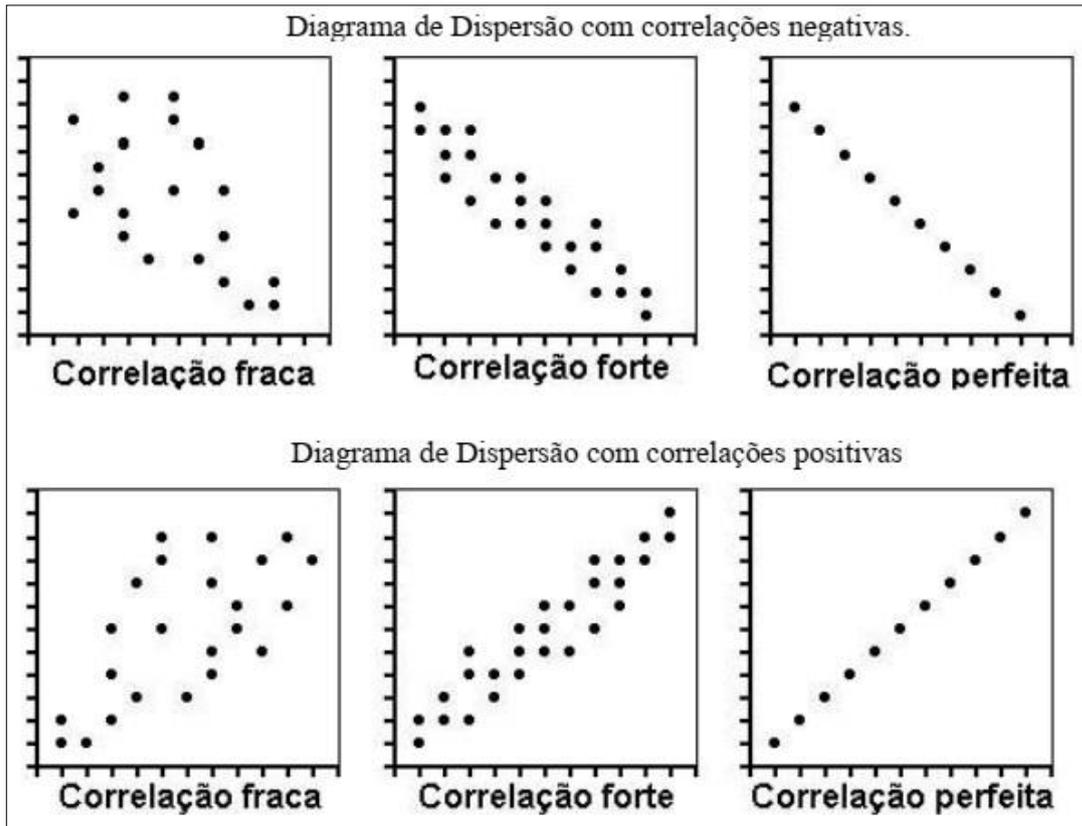


Figura 15 Correlações negativas (acima) e positivas (abaixo) em gráficos de dispersão. Fonte: Cantidio (2009).

A comunidade bacteriana associada às duas espécies foi bastante complexa e bem variada, sendo que uma maior riqueza de micro-organismos apareceu em *C. albiceps*. Ao comparar ovários e superfície dos ovos, ambas as espécies apresentaram quase três vezes mais bactérias na superfície dos ovos, o que provavelmente ocorreu devido à maior exposição deles ao meio ambiente.

Através dos dados e das análises de associação, não é possível afirmar que bactérias presentes tanto nos ovários como nas superfícies dos ovos, na mesma espécie de mosca-varejeira, possuam alguma relação, ou seja, as espécies de bactérias presentes nas superfícies dos ovos não necessariamente vieram do ovário e vice-versa.

Entre as espécies de bactérias mais abundantes na superfície dos ovos, poucas foram exclusivas (cinco em *C. albiceps* e três em *C. megacephala*), o que indica uma semelhança entre as comunidades, dificultando a separação e identificação das espécies apenas pela comunidade dos ovos, sugerida por Brundage (2012) para outros califorídeos, porém situação diferente ocorreu nos ovários, pois em *C. megacephala*, o gênero *Wolbachia* representou mais

de 99% das espécies, criando uma grande diferença entre as comunidades ovarianas das espécies e a possibilidade de usar isso como ferramenta taxonômica.

Independentemente da espécie de mosca-varejeira, essas bactérias foram adquiridas de duas maneiras principais: por transmissão vertical e/ou horizontal. A vertical é a transmissão de micro-organismos da geração parental para a prole, enquanto a horizontal é a transmissão de um hospedeiro para outro (FINE, 1975), que pode ser contato com outro animal ou com um substrato, incluindo seu consumo. As bactérias encontradas neste estudo, possivelmente foram transmitidas para as moscas-varejeiras das seguintes maneiras; durante a alimentação (açúcar e fígado bovino), por assimilação feita pelas larvas durante seu crescimento em meio à carne moída bovina, através da reprodução e de geração parental para prole.

Entre os gêneros e espécies encontrados nos ovários, muitos já foram relatados com diferentes funções nos califorídeos, principalmente na regulação de comportamentos. Deve-se, portanto, fornecer uma visão geral dos gêneros mais encontrados (que representaram pelo menos 5% ou mais do total encontrado em cada estrutura) para depois focar nas espécies mais abundantes e suas características.

Em *C. megacephala*, o único gênero que merece destaque é *Wolbachia*, representando 99,57 % de todos os gêneros encontrados nos ovários. *Wolbachia* é um grupo de bactérias endossimbiontes herdados da mãe presente em muitos artrópodes. Essas bactérias interferem na biologia reprodutiva dos hospedeiros, expressando vários fenótipos reprodutivos anormais (WERREN et al., 1995; ZUG e HAMMERSTEIN, 2015), sendo que o mais conhecido deles é a incompatibilidade citoplasmática, em que os cruzamentos entre indivíduos com diferentes estados de infecção por *Wolbachia* (cepas diferentes) resultam em pouca ou nenhuma prole. A incompatibilidade citoplasmática concede uma vantagem reprodutiva para hospedeiros infectados, o que permite que a bactéria se espalhe rapidamente através de uma população (TURELLI e HOFFMANN, 1991), além disso, pode levar os indivíduos machos à morte, o que pode impactar a evolução do hospedeiro e a formação de espécies (BENNETT et al., 2012).

Conhecer as espécies e as cepas de *Wolbachia* que habitam *C. megacephala* poderia, de certa maneira, ajudar a distinguir diferentes populações dessa mosca-varejeira em uma região e, segundo alguns autores, utilizar a bactéria como agente de controle biológico (MINGCHAY et al., 2014).

Em *C. albiceps*, mais gêneros merecem destaque, como *Enterococcus*, que representou mais de 25% dos gêneros encontrados nos ovários. Existem mais de 12 espécies nesse gênero, e

elas são facultativamente anaeróbicas e Gram-positivas, porém apenas duas são mais estudadas: *E. faecalis* e *E. faecium*; O habitat natural desses organismos é o trato gastrointestinal humano e de outros animais, constituindo um componente fundamental da flora intestinal, embora estejam associados a muitas condições clínicas como infecção urinária e a endocardite infecciosa em humanos (YOUNG, 2012). Esse gênero já foi relatado em comunidades bacterianas de *Lucillia sericata* (WEI et al., 2014) e no intestino de todos os estágios de vida de *Musca domestica* (DE JONGE et al., 2020). *Enterococcus faecalis*, por exemplo, auxilia no desenvolvimento larval de *Cochliomyia macellaria* (AHMAD et al., 2006).

Os membros do gênero *Providencia*, que representou 23% dos gêneros encontrados nos ovários, são anaeróbios facultativos e estão muito relacionados com infecções urinárias hospitalares (MANOS e BELAS, 2006), podendo ser encontrados no trato intestinal e nas fezes de humanos e animais (MÜLLER, 1983; COSTAS et al., 1987). São comumente encontrados em *Drosophila melanogaster* (GALAC e LAZZARO, 2011) e em carcaças de porco (JOHNSON et al., 2013).

O gênero *Pseudomonas* foi descrito em 1894 e é um dos gêneros mais diversos e onipresentes, membros desse gênero são Gram-negativos e já foram isolados em todos os tipos de ambientes, da Antártica aos Trópicos, presentes em sedimentos, amostras clínicas, plantas, fungos e animais doentes, na água, solo, rizosfera vegetal, mar, desertos e outros locais (PEIX et al., 2009). Espécies não-patogênicas já foram relatadas em *M. domestica* (SUKONTASON et al., 2006; BRITS et al., 2016) e espécies patogênicas já foram encontradas em *C. megacephala* (SUKONTASON et al., 2000) e *L. sericata* (WEI et al., 2014). Algumas espécies também já foram encontradas em alimentos e classificadas como deterioradoras de carne (COX et al., 1975; ERCOLINI et al., 2010; MOHAREB et al., 2015; CALDERA et al., 2016).

As bactérias do gênero *Bacteroides* são anaeróbicas obrigatórias, Gram-negativas e habitam geralmente os tratos respiratório, intestinal e genital feminino dos animais e, apesar de habitantes comuns da flora intestinal do ser humano, bactérias desse gênero estão fortemente relacionadas às infecções humanas (BALOWS et al., 2013). Também são encontradas em fezes animais (ALBUQUERQUE e ZUREK, 2014) e em carcaças de porcos (JOHNSON et al., 2013).

Apesar de apenas um gênero aparecer em grande quantidade nos ovários de *C. megacephala*, a superfície de seus ovos revelou uma distribuição maior de gêneros.

Carnobacterium, por exemplo, representou 23% dos gêneros encontrados e são comumente isoladas de quatro lugares: carne (e produtos à base de carne), aves, peixes e água

do mar (WOOD e HOLZAPFEL, 1992). A carne não processada, assim como certos produtos derivados, representa um dos principais habitats das carnobactérias. Algumas espécies apresentam prevalência em bovinos e suínos embalados a vácuo e armazenados a baixas temperaturas (SHAW e HARDING, 1984; SCHILLINGER e LÜCKE, 1987; BORCH e MOLIN, 1988). A presença desse gênero na superfície dos ovos pode ter origem da alimentação que os indivíduos desta pesquisa tiveram (fígado bovino, por exemplo), pois sabe-se que espécies desse gênero são frequentemente encontradas em insetos que se alimentam de sangue ou carne (SONTOWSKI e VAN DAM, 2020). Ao mesmo tempo, não se pode descartar a hipótese de que elas tenham sua origem de outro lugar que não seja do alimento, já que existem relatos da presença desse gênero no intestino de mosquitos (GHAVECHI KHALIGH et al., 2020) e na superfície dos ovos de outros califorídeos (BRUNDAGE et al., 2017).

Brochothrix contém bactérias Gram-positivas, facultativamente anaeróbicas e, assim como *Carnobacterium* e *Pseudomonas*, são bactérias que deterioram carne e causam um odor desagradável no processo (STANLEY et al., 1981; CASABURI et al., 2014; STANBOROUGH et al., 2017) especialmente em produtos pré-embalados mantidos em temperatura de refrigeração, ainda não há evidências de que qualquer cepa de *Brochothrix* seja patogênica para humanos ou animais (STACKEBRANDT e JONES, 2006). Porém, ao contrário de *Carnobacterium* e *Pseudomonas*, não parece existir relatos de espécies desse gênero presente em insetos, podendo este ser o primeiro, e possivelmente foi assimilada também pela alimentação, visto os locais mais comum em que são encontradas.

Lactococcus é outro gênero encontrado na superfície dos ovos de *C. megacephala*, seus membros são Gram-positivos e anaeróbicos. Têm sido comumente isolados em material vegetal (SANDINE; RADICH; ELLIKER, 1972), raramente são encontrados em fezes ou no solo e algumas aparecem na superfície corpórea das vacas e em sua saliva (WOOD e HOLZAPFEL, 1992). Já foi relatado no intestino de *M. domestica* (WEI et al., 2013; BAHRNDORFF et al., 2017), em diferentes estágios de *L. sericata*, *P. regina* e *L. cuprina* (SINGH et al., 2015; WOHLFAHRT et al., 2020), o que sugere participação no desenvolvimento desses estágios.

Bactérias do gênero *Leuconostoc* são heterofermentativas (convertem a glicose em ácido lático, etanol e gás carbônico), possuem necessidades nutricionais complexas e são encontradas, comumente em plantas, produtos derivados do leite, carne e produtos resultantes de fermentação (GARVIE, 1967; WOOD e HOLZAPFEL, 1992). Está muito presente em todos os estágios de vida de *L. sericata* (WOHLFAHRT et al., 2020), no intestino e na superfície corporal de adultos de *M. domestica* (FOUDA et al., 2016; DE JONGE et al., 2020) e também na exocutícula de *Clogmia albipunctata*, mosca praga que transmite patógenos infecciosos

(FAULDE e SPIESBERGER, 2013), de *Chrysomya albiceps* e de *Sarcophaga carnaria* (FOUDA et al., 2016).

Na superfície dos ovos de *C. albiceps* foram encontrados os gêneros *Providencia* (32,9%), *Pseudomonas* (22%), *Lactococcus* (9%) e *Carnobacterium* (8,25%) já descritos, além de *Serratia* (9,3%).

Pesquisadores já relataram espécies de *Serratia* em todos os tipos de ambientes, no solo, ar, na água, em plantas e animais (GRIMONT e GRIMONT, 1978). Em insetos, já foi isolado de indivíduos saudáveis, doentes ou mortos. Já foi encontrada associada aos ovos da mosca de fruta do Mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (GRIMONT e GRIMONT, 1978) e *L. cuprina* (LIMSOPATHAM et al., 2017) e foram isoladas de *Dacus dorsalis* (STEINHAUS, 1951), *Drosophila spp.* (HEIMPEL e WEST, 1959), *M. domestica* e *C. megacephala* (STEINHAUS, 1959; OLIVEIRA et al., 2006).

Um ponto que deve ser levado em consideração ao analisar os gêneros e espécies encontrados é a contaminação por fontes externas que participaram do processo de extração e sequenciamento de DNA. Isso se tornou mais evidente com o aparecimento de técnicas moleculares mais sensíveis, como PCR, métodos de sequenciamento do gene 16S rRNA e shotgun metagenômico, capazes de identificar hospedeiros de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis (GLASSING et al., 2016), seus reagentes, kits de isolamento de DNA, master mixes de PCR e vários outros suprimentos de laboratório usados no processamento e análises de DNA podem estar contaminados com DNA bacteriano (RAND e HOUCK, 1990; MCFETERS et al., 1993; CORLESS et al., 2000; MCALISTER et al., 2002; SHEN et al., 2006). Esse tipo de contaminação é sempre minimizado pelos pesquisadores e pelas empresas que desenvolvem os produtos utilizados, porém alguns gêneros já foram relatados nesses casos, como *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Bacteroides* e *Serratia* (SALTER et al., 2014; GLASSING et al., 2016; WEYRICH et al., 2019), então deve-se ter cautela ao afirmar que todos esses gêneros descritos vieram das estruturas analisadas.

Tanto na superfície dos ovos de *C. megacephala* como na de *C. albiceps* foram encontrados gêneros não identificados, isso aconteceu porque muitas bactérias foram classificadas pelas análises como “não cultiváveis”, que são espécies que não podem ou ainda não foram cultivadas em laboratório, pois há dificuldade em replicar seu ambiente natural ou o ambiente de seu hospedeiro e, portanto, ainda não foram identificadas e não estão nos bancos de dados consultados (STEWART, 2012). Essa dificuldade em recriar o ambiente acontece, provavelmente, porque esses indivíduos devem ter uma forte relação de dependência com seus hospedeiros, no caso, com as moscas-varejeiras, e podem ser um foco interessante para

pesquisas futuras, pois essa forte dependência pode indicar uma função importante da bactéria no organismo.

Em *C. megacephala*, as espécies mais abundantes no ovário se restringiram ao gênero *Wolbachia* que, como dito anteriormente, são bem conhecidas por afetarem processos reprodutivos. Porém podem desempenhar papéis benéficos para os hospedeiros como auxiliar nutricionalmente (sua ausência desacelera o desenvolvimento) (HOSOKAWA et al., 2010; PONTON et al., 2015), aumentar a longevidade (PONTON et al., 2015) e proteger contra vírus (TEIXEIRA et al., 2008; JOHNSON, 2015) e infecções por outras bactérias (WONG et al., 2011; YE et al., 2013; BRAQUART-VARNIER et al., 2015; SHOKAL et al., 2016; GUPTA et al., 2017). Dentre as encontradas, a única identificada completamente, *Wolbachia pipientis*, por exemplo, também afeta os insetos reprodutivamente, ela regula níveis de ferro da dieta de *D. melanogaster*, assegurando altos níveis de fecundidade (BROWNLIE et al., 2009).

O contrário ocorre nos ovários de *C. albiceps*, onde não se encontrou membros de *Wolbachia*, porém uma grande variedade de espécies. A ausência de *Wolbachia* em *C. albiceps* permite levantar pontos interessantes, talvez sua presença somente em *C. megacephala* possa ajudar diferenciar as duas espécies e a explicar a ausência de outras espécies bacterianas nos ovários de *C. megacephala* e a presença de muitas nos ovários de *C. albiceps*, já que *Wolbachia* pode inibir outras infecções.

Nos ovários de *C. albiceps* foi encontrado o maior número de espécies abundantes, 41 espécies no total, como *Bacillus simplex*, geralmente encontrada no solo e já relatada nos intestinos de humanos (CROCE et al., 2014), de *Thaumetopoea pityocampa* (Lepdoptera) (INCE et al., 2008) e de *Gryllotalpa gryllotalpa* L. (Orthoptera) (SEZEN et al., 2013), ela produz fungicidas que ajudam a isolar o substrato ou o ambiente em que vivem, aumentando a resistência desses locais ou do hospedeiro à doenças causadas por fungos (SCHWARTZ et al., 2013). Lam (2010) destaca algumas bactérias com a mesma função presente em ovos de *M. domestica* e que essa atividade aumenta a sobrevivência larval. Apesar de não ter sido encontrada nos ovos, existe a possibilidade de que ela possa ser transmitida para eles e desempenhar uma função semelhante.

Não há muitos relatos de *Enterococcus termitis* em califorídeos, mas a espécie estava presente em grande quantidade nos ovários de *C. albiceps* e já foi descrita no intestino de *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera) (SEZEN et al., 2013). Porém outros membros desse gênero desempenham funções que interferem no comportamento de alguns insetos. Aparentemente, em baratas e besouros, essas bactérias produzem feromônios fecais de agregação, os ácidos

carboxílicos voláteis (VCAs) que são altamente atrativos, auxiliando no processo de reprodução e agregação (WADA-KATSUMATA et al., 2015; MCMANUS et al., 2018).

Morganella morganii também aparece bastante nos ovários de *C. albiceps*. Ela é um bacilo Gram-negativo encontrada no meio ambiente e no trato intestinal dos humanos, mamíferos e répteis como parte da flora normal e, apesar de sua ampla distribuição, raramente causam infecções em humanos (STOCK e WIEDEMANN, 1998; FALAGAS et al., 2006). Nos insetos, já foi registrada em *C. megacephala* e *M. domestica* (SUKONTASON et al., 2007; BRITS et al., 2016), no mosquito-palha *Lutzomyia longipalpis* (PETERKOVA-KOCI et al., 2012) e nos ovos de *C. megacephala* e *L. cuprina* (LIMSOPATHAM et al., 2017). Também está presente em glândulas do oviduto do besouro *Costelytra zealandica* onde produz fenol, uma substância que funciona como feromônio sexual nessa espécie (MARSHALL et al., 2016). Para *Phormia regina* (Calliphoridae), essa bactéria, encontrada no seu intestino, tem um papel de agregação, ao ser regurgitada no momento da alimentação, o micro-organismo produz “BVOCs” como indol, dimetil trissulfeto e 2-feniletanol que atraem outros indivíduos da mesma espécie, e apenas sua presença no local provoca a mesma reação (CALCAGNILE et al., 2019; URIEL et al., 2020). Além de estar presente nos ovários e na superfície dos ovos de *C. albiceps*, também foi encontrada na superfície dos ovos de *C. megacephala*.

Outras espécies relevantes são *Providencia rettgeri* (também foi encontrada na superfície dos ovos de *C. albiceps* e *C. megacephala*) e *P. stuartii* (também foi encontrada na superfície dos ovos de *C. albiceps*). *Providencia rettgeri* já foi relatada na superfície dos ovos de *C. megacephala* e *L. cuprina* (LIMSOPATHAM et al., 2017), na superfície corpórea de *C. megacephala* e *M. domestica* (SUKONTASON et al., 2007) e no intestino das larvas de *M. domestica* (ZUREK et al., 2000). *Providencia stuartii* já foi isolada de glândulas salivares de *L. sericata* (YUAN et al., 2017), na superfície corpórea de *M. domestica* e *C. megacephala* (SUKONTASON et al., 2006, 2007) e na superfície dos ovos de *L. cuprina* (LIMSOPATHAM et al., 2017). Ambas as espécies têm um efeito interessante em *Cochliomyia hominivorax*: sangue inoculado com elas (separadas ou juntas) atrai mais fêmeas para oviposição do que sangue estéril (ambas são encontradas em feridas cutâneas de bovinos) através da produção de voláteis ou, no caso de *P. rettgeri*, somente com sua presença (CHAUDHURY et al., 2010, 2016). Entre os voláteis produzidos pelas espécies estão o dimetil dissulfeto, dimetil trissulfeto, fenol, p-cresol e indol (ZHU et al., 2017). *Providencia stuartii* também produz compostos que atraem *L. cuprina* para oviposição (LIU, 2014).

Roseburia intestinalis provoca um comportamento semelhante; em conjunto com outros organismos presentes nas fezes de cavalo, ela estimula a oviposição da mosca-de-estábulo,

Stomoxys calcitrans (Calliphoridae) e proporciona um habitat adequado para o desenvolvimento larval dessa espécie (ALBUQUERQUE, 2012).

Serratia sp é encontrada na superfície dos ovos de *L. cuprina* (LIMSOPATHAM et al., 2017), na região abdominal da fêmea de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera) (LANCE, 1992) e na superfície corpórea de *C. megacephala* e *M. domestica* (BRITS et al., 2016). No besouro, essa bactéria atrai fêmeas para ovipor no local (LANCE, 1992) e compostos liberados por *Serratia sp* parecem atrair fêmeas grávidas de *L. cuprina* (MORRIS et al., 1997).

Agora, entre as bactérias encontradas na superfície dos ovos de *C. megacephala*, *Corynebacterium variabileo* já foi relatada na larva de *M. domestica* e ajuda o imaturo a assimilar o alimento consumido (YANG et al., 2015) e alguns membros desse gênero são responsáveis pela produção de compostos atrativos para mosquitos *Anopheles gambiae* (TAKKEN e KNOLS, 1999; VERHULST et al., 2010; BUCK et al., 2016).

Hafnia alvei também já foi relatada no intestino de *Poecilus chalcites* (Coleoptera) (LEHMAN et al., 2009) e da mosca de fruta, *Dacus dorsalis* (JANG e NISHIJIMA, 1990), na superfície corpórea de *M. domestica* (NASCIMENTO et al., 2003; GUERRA et al., 2019) e também pode ser assimiladas em substratos externos (LUNA et al., 2004). A mosca de fruta parece ser atraída para locais com a presença dessa bactéria, primeiramente para se alimentar. Também é conhecida por produzir na carcaça compostos sulfurosos como metanotiol e dimetil sulfeto que são atrativos para moscas-varejeiras (PACZKOWSKI e SCHÜTZ, 2011).

Klebsiella pneumonia já foi muito estudada na mosca de fruta mexicana, *Anastrepha ludens*, e no gafanhoto-do-deserto, *Schistocerca gregária*, essa bactéria é encontrada no intestino desses insetos, geralmente são assimiladas durante a alimentação, e elas liberam compostos atrativos a partir da fonte do alimento que provocam agregações de indivíduos (MARTINEZ et al., 1994; ROBACKER e BARTELT, 1997; DILLON e CHARNLEY, 2002). Alguns dos voláteis produzidos que atraem a mosca de fruta são amônia, metilamina, 3-metilbutanamida, 1-pirrolina, 2,3,4,5-tetrahidropiridina e várias pirazinas e para o gafanhoto, 5-etilguaiacol, guaiacol e fenol (LEROY et al., 2011).

Outra *Klebsiella* foi encontrada, mas não completamente identificada, a *Klebsiella sp* não cultivada, *Klebsiella* está frequentemente associada a dípteros, já foi isolada da superfície corpórea de *M. domestica* (KASSIRI et al., 2012) e de alguns califorídeos (PARALUPPI et al., 1996) e na superfície dos ovos de *M. domestica* onde parece ter duas funções principais, regular o comportamento de oviposição, pois a concentração dessa espécie no ovo pode inibir (fases avançadas do desenvolvimento do ovo, onde a concentração da bactéria é maior) ou estimular a deposição de ovos por novas fêmeas (ovos depositados recentemente) (LAM et al., 2007) e

inibir o crescimento de fungos prejudiciais ao desenvolvimento dos ovos e das futuras larvas (LAM et al., 2009). Também é responsável por atrair larvas de *Delia antiqua*, mosca da cebola, para alimentação e seus adultos para oviposição (IKESHOJI, TOSHIAKI et al., 1980), também podem atrair *C. macellaria* (CHAUDHURY et al., 2016).

Lactococcus lactis atrai mosquitos do gênero *Aedes* para oviposição, tanto com sua presença, dependendo da densidade populacional (PONNUSAMY et al., 2015) quanto através de compostos químicos produzidos como o ácido nonanóico e o metiltetradecanoato (PONNUSAMY et al., 2016).

Pseudomona fulva já foi isolada de larvas em diferentes estágios de *Wohlfahrtia magnifica* (Sarcophagidae) (TOTH et al., 2006) e da superfície dos ovos de *M. domestica* (LAM et al., 2009). Ela tem o papel de inibir novas fêmeas de *M. domestica* de depositarem novos ovos em locais já colonizados e esgota nutrientes essenciais para o desenvolvimento de fungos prejudiciais aos ovos e às larvas no substrato (LAM et al., 2007, 2009).

Não há muita informação sobre uma possível função de *Staphylococcus cohnii* na regulação de algum comportamento em inseto, mas algumas espécies do gênero já foram isoladas nos ovos de *Chrysomya putoria* (DALLAVECCHIA et al., 2014) e *L. cuprina* (LIMSOPATHAM et al., 2017). *Staphylococcus saprophyticus*, *S. sciuri* e *S. xylosus*, presentes em ovos de *M. domestica*, apresentaram ação fungicida, assim como *P. fulva* (LAM et al., 2009). Portanto, a espécie encontrada em *C. megacephala* pode apresentar função semelhante.

Outras bactérias isoladas da superfície dos ovos de *C. megacephala* com funções relevantes foram discutidas anteriormente como *Enterococcus termitis*, *Morganella morgani*, *Providencia rettgeri* e *Wolbachia pipientis*. Essas espécies (exceto *Wolbachia pipientis*), além de *P. stuartii*, *Pseudomonas sp* e *Serratia sp*, também foram encontradas na superfície dos ovos de *C. albiceps*.

As outras espécies abundantes encontradas possuem pouca ou nenhuma informação relacionada aos califorídeos e quando relatadas em insetos, geralmente são habitantes naturais do intestino ou da superfície corporal, alguns exemplos são *Acinetobacter lwoffii* (OLIVEIRA et al., 2006), *Acinetobacter septicus* (BIGIOTTI et al., 2019), *Bacteroides plebeius* (BORRELLI et al., 2017), *Bacteroides vulgatus* (YONG et al., 2017), *Blautia sp.* (MINARD et al., 2014), *Buttiauxella agrestis* (KUMAR, 2012), *Halomonas cupida* (GUPTA et al., 2012) e *Parabacteroides distasonis* (GUPTA et al., 2012). A presença dessas bactérias, e até mesmo as descritas anteriormente que só foram relatadas em intestinos, na superfície dos ovos pode ser explicada pela transferência através das fezes, por exemplo (HILKER e MEINERS, 2008), já que muitas moscas-varejeiras defecam próximo a locais de alimentação e oviposição.

Algumas das espécies encontradas foram somente relatadas em fontes externas como carcaças de peixes, por exemplo, ou outros substratos, e, aparentemente, ainda não foram relatadas na superfície dos ovos de califorídeos. Alguns exemplos são *Barnesiella intestinihominis* (IANCU et al., 2016), *Clostridium disporicum* (IANCU et al., 2018), *Faecalibacterium prausnitzii* (LEI et al., 2012), *Ruminococcus obeum* (MAERTENS e COUDERT, 2006), *Leuconostoc gelidum* (SHAW e HARDING, 1989), *Myroides odoratimimus* (PECHAL e BENBOW, 2016), *Porphyromonas catoniae* (KÖNÖNEN et al., 1999), *Vagococcus teuberi* (WEI et al., 2014) e *Vagococcus carniphilus* (SHEWMAKER et al., 2004).

Outras, como *Roseburia faecis*, por exemplo, podem ter entrado nas amostras pelo kit de extração (GLASSING et al., 2016), então deve-se ser cauteloso ao afirmar que determinada bactéria estava realmente presente no ovário ou no ovo e não por contaminação devido aos processos de extração e sequenciamento.

Todas essas bactérias e os compostos discutidos anteriormente podem ajudar a compreender melhor o que aconteceu nos bioensaios.

Portanto, voltando a eles, agora incluindo os resultados da cromatografia gasosa e de comunidade bacteriana na discussão, pode-se sugerir que os primeiros compostos percebidos pelas fêmeas, provocando as visitas já discutidas, são os alcanos metilados encontrados nas amostras (o grupo com maior número de compostos), pois o fato de serem um pouco mais voláteis que alcanos lineares e alcenos (DRIJFHOUT et al., 2013) facilitaria sua detecção. Como descritos, funcionam principalmente na identificação de coespecíficos (2-MeC₂₈ e 8-MeC₂₄) (STOFFOLANO et al., 1997; SOARES et al., 2017), o que seria ideal, já que o processo de oviposição agregada, por exemplo, tem como uma de suas primeiras etapas a identificação de ovos da mesma espécie. Sabe-se que algumas varejeiras evitam agregar seus ovos ou ovipor em locais já colonizados com ovos ou larvas de outras espécies, pois essa larvas podem preda seus imaturos (FARIA e GODOY, 2001; FARIA et al., 2004; GIÃO e GODOY, 2007), portanto um sinal de reconhecimento inicial deve ser utilizado para evitar essa situação e agregar os ovos apenas com outros coespecíficos.

Os alcenos C_{22:1}, C_{24:1} e C_{25:1} (MERESZ e MOZSGAI, 1976; SIWICKI et al., 2005; Flores-Prado et al., 2008) e os alcanos lineares C₂₇, C₂₈, C₁₈, C₂₉ e C₂₅ já (MUKHERJEE et al., 2013; SARKAR et al., 2013; MOBARAK et al., 2020) também se mostraram atrativos para outras espécies de moscas e insetos e poderiam estar agindo da mesma maneira nos bioensaios em conjunto com os alcanos metilados para despertar o interesse dos indivíduos.

Sobre os micro-organismos que poderiam auxiliar na atração inicial, primeiramente alguns pontos devem ser observados; (1) não é possível afirmar que todas as bactérias existentes na superfície dos ovos estavam presentes nos extratos testados, pois o método de extração por solventes não garante a presença delas nos extratos, mas (2) sabe-se que tanto o hexano como o éter não são agentes antimicrobianos (WHITE et al., 1996; HARDISON et al., 1997; HARRIS, 1999), o que permitiria a presença delas nos ensaios. Portanto, os micro-organismos serão considerados apenas para uma situação mais natural, em que eles e os compostos presentes nas superfícies dos ovos agem na fêmea provavelmente ao mesmo tempo, e não para sustentar o que ocorreu nos bioensaios. Dito isso, muitas das bactérias encontradas poderiam ter essa função de atrativos iniciais para as fêmeas de *C. megacephala* e *C. albiceps*; *Morganella morgani*, *Providencia rettgeri*, *P. stuartii*, *Serratia sp*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumonia* e *Klebsiella sp* agem como atrativos em dípteros ou outros insetos (MORRIS et al., 1997; LAM et al., 2007; PACZKOWSKI e SCHÜTZ, 2011; CHAUDHURY et al., 2016; CALCAGNILE et al., 2019). E sabe-se que moscas-varejeiras são mais atraídas para locais não esterilizados (BRUNDAGE et al., 2017).

Além do comportamento de atração e o de um provável reconhecimento e análise do extrato (devido aos altos valores de média de tempo encontradas nas durações das visitas), a única outra afirmação que pode ser feita analisando os bioensaios é a falta de oviposição em todos os tratamentos. Essa falta de oviposição pode ter ocorrido devido à presença dos ácidos graxos nas amostras dos ovos dessas espécies. Sabe-se que a função mais comum de tais ácidos em outras espécies de insetos é a de “ODP” (inibidores de oviposição), principalmente na comunicação intraespecífica (SINGER, 1998). Para moscas-varejeiras, esses compostos (ácido mirístico e palmítico) podem estar agindo de forma semelhante. Os califorídeos geralmente depositam seus ovos de maneira excessiva no substrato, até mesmo comprometendo o desenvolvimento larval (LIMA e VON ZUBEN, 2016), porém, locais diferentes são colonizados por uma espécie na mesma carcaça, isso indica que a agregação dos ovos tem um limite e talvez esses compostos possam sinalizar os locais com muitos ovos e ajudar na avaliação do substrato, evitando altos níveis de competição (IVES, 1991), função principal dos “ODPs”. Outra explicação para a falta de oviposição é a falta de um substrato adequado no local, pois mesmo que esses compostos e bactérias ajam de forma a atrair, agregar e estimular oviposição, a presença de um substrato ainda é necessidade básica das moscas-varejeiras no processo de deposição de ovos (BROWNE, 1960; ZUCOLOTO, 1991; ARCHER e ELGAR, 2003).

Apesar de não ter sido observado outro tipo de comportamento nos bioensaios, muitos dos outros compostos e micro-organismos descritos poderiam afetar o comportamento das fêmeas de *C. megacephala* e *C. albiceps* em etapas seguintes à chegada ao extrato, mas, obviamente, mais testes seriam necessários para confirmar essa hipótese.

Como alguns exemplos, muitos dos outros compostos encontrados nas superfícies dos ovos provocam agregação de adultos em varejeiras e outras espécies de insetos, assim como estimulam a oviposição no local através do contato direto com o composto. O C_{25:1} e o C₂₃ (alceno e alceno linear, respectivamente) provocam agregação em fêmeas de *M. domestica* e as estimulam a ovipor nos mesmos locais já colonizados (RICHTER et al., 1976; JIANG et al., 2002). O C₂₇ e o C₂₉ também agem dessa maneira em outros insetos (UDAYAGIRI e MASON, 1997; JIANG et al., 2015). *Morganella morganii*, algumas espécies do gênero *Enterococcus* (MCMANUS et al., 2018), *Roseburia intestinalis* (ALBUQUERQUE, 2012) e *Klebsiella* também agregam fêmeas e estimulam oviposição de coespecíficos no mesmo local, regulando o comportamento de oviposição. Talvez esses compostos e bactérias interfiram da mesma maneira em *C. megacephala* e *C. albiceps*.

Mesmo não sendo possível afirmar que esses compostos e micro-organismos tenham essas funções nas espécies em questão, é válido assumir que essa complexa mistura presente nos ovos possa participar da regulação do comportamento de oviposição dessas espécies, desde a atração ao local, agregação de outros adultos, identificação do ovo como um coespecífico até estímulo de oviposição. Todas essas etapas são vistas no processo de oviposição agregada, por exemplo (ESSER, 1990, 1991; LAM et al., 2007; LIMA e VON ZUBEN, 2016).

Dentre os compostos encontrados, muitos parecem regular comportamentos em outros insetos, principalmente os reprodutivos e de oviposição. Conhecer melhor o efeito de cada um em *C. megacephala* e *C. albiceps*, assim como uma melhor compreensão da variação de concentração ao longo do desenvolvimento de seus estágios pode ajudar a compreender melhor seus efeitos na regulação comportamental dessas espécies, já que é provável que o perfil químico se altere, tanto qualitativamente como quantitativamente, entre os estágios e com a idade (FREDERICKX et al., 2012; MOORE et al., 2013; KRANZ et al., 2017; PAULA et al., 2017; LUNAS et al., 2019), o que poderia afetar a percepção dos mesmos pelas fêmeas ao analisarmos seus efeitos através dos ovos.

E além do óbvio papel de vetor que essas moscas desempenham para essas bactérias, algumas provocando infecções sérias em humanos ou não, todas as que foram descritas, tanto

no ovário como na superfície dos ovos, têm uma função interessante na atração, agregação e oviposição em outros insetos, através da liberação de compostos ou sua presença no local, e, portanto, são alvos com bastante potencial para futuras pesquisas para confirmar se as mesmas funções se aplicam à *C. megacephala* e *C. albiceps*, incluindo uma confirmação que reforce sua presença nos ovários e/ou nas superfícies dos ovos. Dentre os gêneros descritos, muitos deles já foram relatados na superfície dos ovos de *Chrysomya rufifacies* e *Cochliomyia macellaria* (BRUNDAGE, 2012), e o autor descreve que a presença desses gêneros é alterada com o passar do tempo, o que pode impactar no comportamento de oviposição dessas espécies, algo que também precisa ser melhor analisado para *C. megacephala* e *C. albiceps*, já que as bactérias aqui descritas foram isoladas de ovos e ovários frescos e, portanto, não foi possível saber se a quantidade de gêneros e espécies é alterada ao longo do tempo. Além disso, Brundage (2012) sugere que a quantidade dessas bactérias pode auxiliar a diferenciar os estágios imaturos dessas espécies, o que seria uma importante ferramenta forense. Outra função que elas podem ter em *C. megacaphela* e *C. albiceps* é a de auxiliar no desenvolvimento de diferentes estágios de desenvolvimento (TOMBERLIN et al., 2017; HARSHINI et al., 2018) e proteger os ovos e as futuras larvas contra fungos e outras bactérias (LAM, 2010; SCHWARTZ et al., 2013).

Fora o conhecimento que essas interações entre mosca-varejeira e micro-organismos podem proporcionar à biologia comportamental, essas bactérias podem auxiliar na melhoria das iscas das armadilhas de captura em massa dessas espécies pragas, aumentando a atração até a armadilha em conjunto com os compostos já conhecidos que são atrativos (AAK et al., 2011) e assim, controlando a população da mosca-varejeira

Testar os compostos e as bactérias individualmente frente às fêmeas dessas duas espécies pode ajudar a compreender melhor se de fato, eles têm as funções sugeridas anteriormente, auxiliando no entendimento de como elas realizam a busca por recursos (dinâmica de colonização inicial de carcaça) e por locais de oviposição específicos.

6 CONCLUSÕES FINAIS

- As fêmeas de *C. albiceps* e *C. megacephala* foram mais atraídas para os extratos de ovos de 0 h e 10 h em éter.

- O perfil químico da superfície dos ovos de ambas as espécies consiste basicamente de uma mistura complexa de hidrocarbonetos e ácidos graxos, e apenas em *C. albiceps*, ele difere qualitativamente entre os períodos de desenvolvimento.

- A comunidade bacteriana é muito variada nas duas espécies. No geral, uma riqueza maior é encontrada em *C. albiceps*. Na superfície dos ovos também foi encontrada uma riqueza maior de bactérias para ambas as espécies quando comparada com os ovários.

- Muitos dos compostos e das espécies bacterianas encontradas na superfície dos ovos e dos ovários podem ter um papel na regulação do comportamento de oviposição dessas espécies, desde sua atração ao local até agregação de adultos e dos ovos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAK, A.; BIRKEMOE, T.; KNUDSEN, G. K. Efficient Mass Trapping: Catching the Pest, *Calliphora vicina*, (Diptera, Calliphoridae), of Norwegian Stockfish Production. **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 9, p. 924, 15 jul. 2011.

AAK, A.; BIRKEMOE, T.; MEHL, R. Blowfly (Diptera, Calliphoridae) damage on stockfish in northern Norway: pest species, damage assessment and the potential of mass trapping. **Journal of Pest Science**, v. 83, n. 3, p. 329–337, 1 ago. 2010.

AAK, A.; KNUDSEN, G. K.; SOLENG, A. Wind tunnel behavioural response and field trapping of the blowfly *Calliphora vicina*. **Medical and veterinary entomology**, v. 24, n. 3, p. 250–257, 2010b.

ABE, Y. (FRUIT T. R. S.; MISHIRO, K.; TAKANASHI, M. Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology (Japan)**, 1995.

ADHIKARY, P.; MUKHERJEE, A.; BARIK, A. Free fatty acids from *Lathyrus sativus* seed coats acting as short-range attractants to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 67, p. 56–62, 1 maio 2016.

AGELOPOULOS, N. G. et al. A Novel Approach for Isolation of Volatile Chemicals Released by Individual Leaves of a Plant in situ. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 6, p. 1411–1425, 1 jun. 1999.

AHMAD, A.; BROCE, A.; ZUREK, L. Evaluation of Significance of Bacteria in Larval Development of *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 6, p. 1129–1133, 1 nov. 2006.

AHMED, A. A. I. et al. Impact of ethanolic extract of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larval frass on oviposition deterrent of *Phthorimaea operculella* (Zeller) adult females. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 25, n. 1, p. 51, 2015.

AKINO, T.; MORIMOTO, M.; YAMAOKA, R. The chemical basis for trail recognition in *Lasius nipponensis* (Hymenoptera: Formicidae). **CHEMOECOLOGY**, v. 15, n. 1, p. 13–20, 1 mar. 2005.

ALBUQUERQUE, T. A. D. Diversity and effect of the microbial community of aging horse manure on stable fly (*Stomoxys calcitrans*) fitness. 2012.

ALBUQUERQUE, T. A.; ZUREK, L. Temporal changes in the bacterial community of animal feces and their correlation with stable fly oviposition, larval development, and adult fitness. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014.

ALLAN, S. A.; BERNIER, U. R.; KLINE, D. L. Attraction of mosquitoes to volatiles associated with blood. **Journal of Vector Ecology**, v. 31, n. 1, p. 71–78, 2006.

ALVES, A. C. F. et al. Blowflies (Diptera, Calliphoridae) Associated with Pig Carcasses in a Caatinga Area, Northeastern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 43, n. 2, p. 122–126, 1 abr. 2014.

- AMENDT, J. et al. **Current concepts in forensic entomology**. [s.l.] Springer, 2010.
- AMORIM, D. DE S. Chapter Three. Neotropical Diptera Diversity: Richness, Patterns, And Perspectives. **Diptera Diversity: Status, Challenges and Tools**, p. 71–97, 1 jan. 2010.
- ANANTH, S.; MANI, P. Mosquito larvicidal, oviposition deterrent and repellent properties of *Acalypha ornata* Hochst. ex A. Rich. Extracts against *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **J. Pharm. Sci. Technol**, v. 5, p. 82–87, 2015.
- ANBUTSU, H.; TOGASHI, K. Deterred Oviposition of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae) on *Pinus densiflora* Bolts from Oviposition Scars Containing Eggs or Larvae. **Applied Entomology and Zoology**, v. 31, n. 4, p. 481–488, 1996.
- ANDERSON, P. Oviposition pheromones in herbivorous and carnivorous insects. **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**, p. 235–263, 2002.
- ARCHER, M. S.; ELGAR, M. A. Female breeding-site preferences and larval feeding strategies of carrion-breeding Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera): a quantitative analysis. **Australian Journal of Zoology**, v. 51, n. 2, p. 165–174, 2003.
- ARMOUGOM, F.; RAOULT, D. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. **J Comput Sci Syst Biol**, v. 2, n. 1, p. 74–92, 2009.
- ARREDONDO, J.; DÍAZ-FLEISCHER, F. Oviposition deterrents for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) from fly faeces extracts. **Bulletin of Entomological Research**, v. 96, n. 1, p. 35–42, fev. 2006.
- ASHWORTH, J. R.; WALL, R. Responses of the sheep blowflies *Lucilia sericata* and *L. cuprina* to odour and the development of semiochemical baits. **Medical and veterinary entomology**, v. 8, n. 4, p. 303–309, 1994.
- AVERILL, A. L.; PROKOPY, R. J. Intraspecific Competition in the Tephritid Fruit Fly *Rhagoletis pomonella*. **Ecology**, v. 68, n. 4, p. 878–886, 1987.
- AXTELL, R. C. Status and Potential of Biological Control Agents in Livestock and Poultry Pest Management Systems. 1986.
- AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pests of poultry. **Annual review of entomology**, v. 35, n. 1, p. 101–126, 1990.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 75, 8 fev. 2008.
- BAHRNDORFF, S. et al. Bacterial Communities Associated with Houseflies (*Musca domestica* L.) Sampled within and between Farms. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169753, 12 jan. 2017.
- BALOWS, A. et al. **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2013.

- BARBOSA, R. R. et al. Cuticular hydrocarbon profiles as a chemotaxonomic tool for three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) of forensic interest. **Journal of Natural History**, v. 51, n. 25–26, p. 1491–1498, 11 jul. 2017.
- BARDOU, P. et al. jvenn: an interactive Venn diagram viewer. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 293, 29 ago. 2014.
- BARKER, J. S. F.; STARMER, W. T. Environmental Effects and the Genetics of Oviposition Site Preference for Natural Yeast Substrates in *Drosophila Buzzatii*. **Hereditas**, v. 130, n. 2, p. 145–175, 1999.
- BARNHART, C. S.; CHADWICK, L. E. A "Fly Factor" in Attractant Studies. **Science (Washington)**, v. 117, p. 104–5, 1953.
- BARROS-CORDEIRO, K. B.; PUJOL-LUZ, J. R. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia**, v. 50, n. 47, p. 709–717, 2010.
- BAY, D. E.; PITTS, C. W. Face Fly Communal Oviposition (Diptera: Muscidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 50, n. 2, p. 244–246, 1977.
- BENNETT, G. M.; PANTOJA, N. A.; O'GRADY, P. M. Diversity and phylogenetic relationships of *Wolbachia* in *Drosophila* and other native Hawaiian insects. **Fly**, v. 6, n. 4, p. 273–283, 10 out. 2012.
- BERNHARDT, V. et al. Estimating the age of the adult stages of the blow flies *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) by means of the cuticular hydrocarbon n-pentacosane. **Science & Justice**, v. 57, n. 5, p. 361–365, 1 set. 2017.
- BIGIOTTI, G. et al. Horizontal transfer and finalization of a reliable detection method for the olive fruit fly endosymbiont, *Candidatus Erwinia dacicola*. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 93, 18 dez. 2019.
- BIRKETT, M. A. et al. The role of volatile semiochemicals in mediating host location and selection by nuisance and disease-transmitting cattle flies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 4, p. 313–322, 2004.
- BLIGHT, M. M. Techniques for isolation and characterization of volatile semiochemicals of phytophagous insects. In: **Chromatography and isolation of insect hormones and pheromones**. [s.l.] Springer, 1990. p. 281–288.
- BLOMQUIST, G. J.; BAGNÈRES, A.-G. **Insect Hydrocarbons: Biology, Biochemistry, and Chemical Ecology**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.
- BOLTON, H. T.; BUTLER, J. F.; CARLSON, D. A. A mating stimulant pheromone of the horn fly, *Haematobia irritans* (L.): Demonstration of biological activity in separated cuticular components. **Journal of Chemical Ecology**, v. 6, n. 5, p. 951–964, 1 set. 1980.
- BORCH, E.; MOLIN, G. Numerical taxonomy of psychrotrophic lactic acid bacteria from prepacked meat and meat products. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 54, n. 4, p. 301–323, 1 jul. 1988.

- BORRELLI, L. et al. Insect-based diet, a promising nutritional source, modulates gut microbiota composition and SCFAs production in laying hens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16269, 24 nov. 2017.
- BRAACK, L. E. O. Community dynamics of carrion-attendant arthropods in tropical african woodland. **Oecologia**, v. 72, n. 3, p. 402–409, 1 jun. 1987.
- BRAQUART-VARNIER, C. et al. The Mutualistic Side of Wolbachia–Isopod Interactions: Wolbachia Mediated Protection Against Pathogenic Intracellular Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- BRITS, D.; BROOKS, M.; VILLET, M. H. Diversity of Bacteria Isolated from the Flies *Musca domestica* (Muscidae) and *Chrysomya megacephala* (Calliphoridae) with Emphasis on Vectored Pathogens. **African Entomology**, v. 24, n. 2, p. 365–375, set. 2016.
- BRODIE, B. et al. Bimodal cue complex signifies suitable oviposition sites to gravid females of the common green bottle fly. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 153, n. 2, p. 114–127, 2014.
- BRODIE, B. S. et al. Is aggregated oviposition by the blow flies *Lucilia sericata* and *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae) really pheromone-mediated? **Insect Science**, v. 22, n. 5, p. 651–660, 2015.
- BROWN, B. V. et al. **Manual of Central American Diptera. Vol. 1. Ottawa, National Research Council of Canada.** [s.l.] Research Press. 714p, 2009.
- BROWNE, L. B. The role of olfaction in the stimulation of oviposition in the blowfly, *Phormia regina*. **Journal of Insect Physiology**, v. 5, n. 1, p. 16–22, 1960.
- BROWNLIE, J. C. et al. Evidence for Metabolic Provisioning by a Common Invertebrate Endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during Periods of Nutritional Stress. **PLOS Pathogens**, v. 5, n. 4, p. e1000368, 3 abr. 2009.
- BRUCE, T. J. A.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Insect host location: a volatile situation. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 6, p. 269–274, 1 jun. 2005.
- BRUNDAGE, A. L. **Fitness effects of colonization time of *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria*, and their response to intra-and inter-specific eggs and egg-associated microbes.** [s.l.] Texas A&M University, 2012.
- BRUNDAGE, A. L. et al. Interkingdom Cues by Bacteria Associated with Conspecific and Heterospecific Eggs of *Cochliomyia macellaria* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) Potentially Govern Succession on Carrion. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, n. 1, p. 73–82, 1 jan. 2017.
- BUCK, M. et al. Bacterial associations reveal spatial population dynamics in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 22806, 10 mar. 2016.
- BUTLER, S. M. et al. Characterization of age and cuticular hydrocarbon variation in mating pairs of house fly, *Musca domestica*, collected in the field. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 23, n. 4, p. 426–442, 2009.

- BUTTERWORTH, N. J. et al. Major Transitions in Cuticular Hydrocarbon Expression Coincide with Sexual Maturity in a Blowfly (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 46, n. 7, p. 610–618, 1 jul. 2020.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. Insects of forensic importance. **Forensic entomology: The utility of arthropods in legal investigations**, p. 43–79, 2001.
- BYRD, J. H.; TOMBERLIN, J. K. **Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations**. [s.l.] CRC press, 2019.
- CALCAGNILE, M. et al. Bacterial Semiochemicals and Transkingdom Interactions with Insects and Plants. **Insects**, v. 10, n. 12, p. 441, dez. 2019.
- CALDERA, L. et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. **Food Microbiology**, v. 54, p. 142–153, 1 abr. 2016.
- CAMPOS, C. F. M.; BARROS, A. T. M. Dípteros muscóides da área urbana de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, n. 3, 1995.
- CARVALHO, C. J. B. DE; MELLO-PATIU, C. A. DE. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 390–406, 2008.
- CARVALHO, L. M. L. et al. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 135–138, jan. 2000.
- CASABURI, A. et al. Activities of strains of *Brochothrix thermosphacta* in vitro and in meat. **Food Research International**, v. 62, p. 366–374, 1 ago. 2014.
- CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual review of Entomology**, v. 37, n. 1, p. 253–272, 1992.
- CHAIWONG, T. et al. Fine structure of the reproductive system of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): the external sexual organ. **Parasitology Research**, v. 102, n. 5, p. 973–980, 1 abr. 2008.
- CHAPMAN, R. F.; CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. [s.l.] Cambridge University Press, 1998.
- CHAUDHURY, M. F. et al. Volatiles emitted from eight wound-isolated bacteria differentially attract gravid screwworms (Diptera: Calliphoridae) to oviposit. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 3, p. 349–354, 2010.
- CHAUDHURY, M. F.; WELCH, J. B.; ALVAREZ, L. A. Responses of Fertile and Sterile Screwworm (Diptera: Calliphoridae) Flies to Bovine Blood Inoculated with Bacteria Originating from Screwworm-Infested Animal Wounds. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 1, p. 130–134, 1 jan. 2002.

- CHAUDHURY, M. F.; ZHU, J. J.; SKODA, S. R. Response of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) to Screwworm Oviposition Attractant. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 4, p. 527–531, 1 jul. 2015.
- CHAUDHURY, M. F.; ZHU, J. J.; SKODA, S. R. Bacterial Volatiles Attract Gravid Secondary Screwworms (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 2, p. 947–951, 1 abr. 2016.
- CORLESS, C. E. et al. Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1747–1752, 1 maio 2000.
- COSTAS, M.; HOLMES, B.; SLOSS, L. L. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of *Providencia rustigianii* strains from human diarrhoea and other sources. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 63, n. 4, p. 319–328, 1987.
- COURTENAY, M. The use of larval therapy in wound management in the UK. **Journal of Wound care**, v. 8, n. 4, p. 177–179, 1999.
- COX, N. A. et al. Spoilage Odors in Poultry Meat Produced by Pigmented and Nonpigmented *Pseudomonas*. **Poultry Science**, v. 54, n. 6, p. 2001–2006, 1 nov. 1975.
- CREDLAND, P. F.; WRIGHT, A. W. Oviposition deterrents of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Physiological Entomology**, v. 15, n. 3, p. 285–298, 1990.
- CROCE, O. et al. Genome Sequence of *Bacillus simplex* Strain P558, Isolated from a Human Fecal Sample. **Genome Announcements**, v. 2, n. 6, 24 dez. 2014.
- D'ALMEIDA, J. M.; ALMEIDA, J. R. Nichos tróficos em dípteros caliptrados, no Rio de Janeiro, RJ. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 4, p. 563–570, nov. 1998.
- DALLAVECCHIA, D. L.; DA SILVA FILHO, R. G.; AGUIAR, V. M. Sterilization of *Chrysomya putoria* (Insecta: Diptera: Calliphoridae) Eggs for Use in Biotherapy. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2014.
- D'ALMEIDA, J. M.; D'ALMEIDA, J. M. Capture of Caliptrate flies with different breeding substrates on beaches in Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 2, p. 215–220, jun. 1993.
- DE JONG, G. A Model of Competition for Food. I. Frequency-Dependent Viabilities. **The American Naturalist**, v. 110, n. 976, p. 1013–1027, 1976.
- DE JONGE, N. et al. Housefly (*Musca domestica* L.) associated microbiota across different life stages. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7842, 12 maio 2020.
- DE L. NOGUEIRA, P. C. et al. The ecological and taxonomic importance of flower volatiles of *Clusia* species (Guttiferae). **Phytochemistry**, v. 56, n. 5, p. 443–452, 1 mar. 2001.
- DE OLIVEIRA, V. C.; DE MELLO, R. P.; D'ALMEIDA, J. M. Muscoid dipterans as helminth eggs mechanical vectors at the zoological garden, Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 36, n. 5, p. 614–620, 2002.

DENT, B. B.; FORBES, S. L.; STUART, B. H. Review of human decomposition processes in soil. **Environmental Geology**, v. 45, n. 4, p. 576–585, 1 fev. 2004.

DEVANEY, J. A. et al. Attractancy of Inoculated and Incubated Bovine Blood Fractions to Screwworm Flies (Diptera: Calliphoridae): Role of Bacteria. **Journal of Medical Entomology**, v. 10, n. 6, p. 591–595, 30 dez. 1973.

DILLON, R.; CHARNLEY, K. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 503–509, 1 jan. 2002.

DIX, J.; GRAHAM, M. **Time of Death, Decomposition and Identification: An Atlas**. [s.l.] CRC Press, 1999.

DRIJFHOUT, F.; KATHER, R.; MARTIN, S. The role of cuticular hydrocarbons in insects. **Behavioral and Chemical Ecology**, p. 91–114, 1 jan. 2013.

DURIEUX, D. et al. Role of long-chain hydrocarbons in the aggregation behaviour of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 6, p. 801–807, 1 jun. 2012.

EDDY, G. W.; DEVANEY, J. A.; HANDKE, B. D. Response of the Adult Screwworm (Diptera: Calliphoridae) to Bacteria-Inoculated and Incubated Bovine Blood in Olfactometer and Oviposition Tests. **Journal of Medical Entomology**, v. 12, n. 3, p. 379–381, 25 set. 1975.

EISEMANN, C. H.; RICE, M. J. The origin of sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae), attractants in media infested with larvae. **Bulletin of entomological research**, v. 77, n. 2, p. 287–294, 1987.

EL-GASHINGY, D. et al. Age-related changes in the chemical composition of female pheromone gland of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **THE EGYPTIAN JOURNAL OF EXPERIMENTAL BIOLOGY (Zoology)**, v. 14, p. 1, 1 jan. 2018.

EMMENS, R. L. Evidence for an attractant in cuticular lipids of female *Lucilia cuprina* (Wied.), Australian sheep blowfly. **Journal of chemical ecology**, v. 7, n. 3, p. 529–541, 1981.

EMMENS, R. L.; MURRAY, M. D. The role of bacterial odours in oviposition by *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae), the Australian sheep blowfly. **Bulletin of Entomological Research**, v. 72, n. 3, p. 367–375, set. 1982.

EMMENS, R. L.; MURRAY, M. D. THE EFFECT OF SUBSTRATE pH ON OVIPOSITION BY *LUCILIA CUPRINA* (WIEDEMANN), THE AUSTRALIAN SHEEP BLOWFLY. **Australian Journal of Entomology**, v. 22, n. 4, p. 343–344, 1983.

ENDLER, A. et al. Surface hydrocarbons of queen eggs regulate worker reproduction in a social insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 9, p. 2945–2950, 2 mar. 2004.

ENGL, T.; KALTENPOTH, M. Influence of microbial symbionts on insect pheromones. **Natural Product Reports**, v. 35, n. 5, p. 386–397, 25 maio 2018.

ERCOLINI, D. et al. Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behaviour as meat spoilers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1, p. 120–131, 15 ago. 2010.

ERRARD, C.; REGLA, J. I.; HEFETZ, A. Interspecific recognition in Chilean parabiotic ant species. **Insectes sociaux**, v. 50, n. 3, p. 268–273, 2003.

ERZINÇLIOĞLU, Z. **Blowflies**. [s.l.] Richmond Publishing Co. Ltd, 1996.

ESSER, J. R. Factors influencing oviposition, larval growth and mortality in *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), a pest of salted dried fish in south-east Asia. **Bulletin of Entomological Research**, v. 80, n. 4, p. 369–376, dez. 1990.

ESSER, J. R. Biology of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and reduction of losses caused to the salted-dried fish industry in south-east Asia. **Bulletin of Entomological Research**, v. 81, n. 1, p. 33–42, mar. 1991.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL, L. **Principles of pollination ecology**. [s.l.] Elsevier, 2013.

FALAGAS, M. E. et al. *Morganella morganii* infections in a general tertiary hospital. **Infection**, v. 34, n. 6, p. 315, 2006.

FARIA, L. D. B. et al. Larval predation by *Chrysomya albiceps* on *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 90, n. 2, p. 149–155, 1999.

FARIA, L. D. B.; TRINCA, L. A.; GODOY, W. A. C. Cannibalistic Behavior and Functional Response in *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Insect Behavior**, v. 17, n. 2, p. 251–261, 1 mar. 2004.

FARIA, L.; GODOY, W. Prey Choice by Facultative Predator Larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 875–8, 1 set. 2001.

FAULDE, M.; SPIESBERGER, M. Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. **Journal of Hospital Infection**, v. 83, n. 1, p. 51–60, 1 jan. 2013.

FAULKNER, G. J. Blowflies as pollinators of brassica crops. **Comml. Grow.**, 1962.

FEDER, M. E.; BLAIR, N.; FIGUERAS, H. Natural thermal stress and heat-shock protein expression in *Drosophila* larvae and pupae. **Functional Ecology**, v. 11, n. 1, p. 90–100, 1997.

FENTON, A.; WALL, R.; FRENCH, N. P. Oviposition aggregation by the blowfly *Lucilia cuprina*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 13, n. 4, p. 453–456, 1999.

FENTON, A.; WALL, R.; FRENCH, N. P. The effects of oviposition aggregation on the incidence of sheep blowfly strike. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 137–150, 15 jun. 1999b.

FERVEUR, J.; SUREAU, G. Simultaneous influence on male courtship of stimulatory and inhibitory pheromones produced by live sex-mosaic *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of**

- the **Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 263, n. 1373, p. 967–973, 22 ago. 1996.
- FILHO, D. B. F. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson (r) .**V.** 18, n. 1, p. 32, 2009.
- FINE, P. E. Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, n. 1, p. 173–194, 1975.
- FISHER, P.; WALL, R.; ASHWORTH, J. R. Attraction of the sheep blowfly, *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) to carrion bait in the field. **Bulletin of Entomological Research**, v. 88, n. 6, p. 611–616, dez. 1998.
- FLORES-PRADO, L.; AGUILERA-OLIVARES, D.; NIEMEYER, H. M. Nest-mate recognition in *Manuelia postica* (Apidae: Xylocopinae): an eusocial trait is present in a solitary bee. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1632, p. 285–291, 7 fev. 2008.
- FONSECA, J. S. DA; MARTINS, G. DE A. **Curso de estatística**. [s.l.] São Paulo: Atlas, 1996. v. 6
- FOUDA, M. A. et al. Frequency (Occurrence) and seasonal variation of bacterial species on the external surface of non-biting flies in Egypt. **Int. J. Adv. Res. Biol. Sci**, v. 3, n. 11, p. 24–30, 2016.
- FREDERICKX, C. et al. Volatile organic compounds released by blowfly larvae and pupae: New perspectives in forensic entomology. **Forensic Science International**, v. 219, n. 1, p. 215–220, 10 jun. 2012.
- FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C.; HARSÍ, C. M. Enteropathogenic microorganisms in flies belonging to the genus *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) in Brazil. **Revista de microbiologia**, 1984.
- GABEL, B.; THIERY, D. Semiochemicals from *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae) eggs deter oviposition by the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). **European Journal of Entomology**, v. 91, p. 353–353, 1994.
- GABRE, R. M.; ADHAM, F. K.; CHI, H. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius)(Diptera: Calliphoridae). **Acta oecologica**, v. 27, n. 3, p. 179–183, 2005.
- GALAC, M. R.; LAZZARO, B. P. Comparative pathology of bacteria in the genus *Providencia* to a natural host, *Drosophila melanogaster*. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 7, p. 673–683, 1 jul. 2011.
- GARVIE, E. I. The Growth Factor and Amino Acid Requirements of Species of the Genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp.nov.) and *Leuconostoc oenos*. **Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 439–447, 1967.
- GHAHVECHI KHALIGH, F.; VAHEDI, M.; CHAVSHIN, A. R. Identification of symbiotic bacteria in the midgut of the medically important mosquito, *Culiseta longiareolata* (Diptera: Culicidae). **BMC Research Notes**, v. 13, n. 1, p. 378, 10 ago. 2020.

GIÃO, J. Z.; GODOY, W. A. C. Ovipositional Behavior in Predator and Prey Blowflies. **Journal of Insect Behavior**, v. 20, n. 1, p. 77–86, 1 jan. 2007.

GIBBS, A. G.; LOUIE, A. K.; AYALA, J. A. Effects of temperature on cuticular lipids and water balance in a desert *Drosophila*: is thermal acclimation beneficial? **Journal of Experimental Biology**, v. 201, n. 1, p. 71–80, 1 jan. 1998.

GINZEL, M. D.; MILLAR, J. G.; HANKS, L. M. (Z)-9-Pentacosene – contact sex pheromone of the locust borer, *Megacyllene robiniae*. **CHEMOECOLOGY**, v. 13, n. 3, p. 135–141, 1 set. 2003.

GLASSING, A. et al. Inherent bacterial DNA contamination of extraction and sequencing reagents may affect interpretation of microbiota in low bacterial biomass samples. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 24, 26 maio 2016.

GOFF, M. L.; LORD, W. D. Entomotoxicology. A new area for forensic investigation. **The American journal of forensic medicine and pathology**, v. 15, n. 1, p. 51–57, 1994.

GOMES, L. et al. [Visual and olfactory factors interaction in resource-location by the blowfly, *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae), in natural conditions]. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 633–639, 1 set. 2007.

GOMES, L. **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. [s.l.] Technical Books Editora, 2010.

GOMES, L.; SANCHES, M. R.; VON ZUBEN, C. J. Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). **Journal of insect behavior**, v. 18, n. 2, p. 281–292, 2005.

GOTOH, T. et al. Copulatory behavior and sex pheromones in sciarid fly, *Lycoriella mali* (Fitch)(Sciaridae: Diptera). **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology (Japan)**, 1999.

GRAHAM, J. P. et al. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. **Science of the total environment**, v. 407, n. 8, p. 2701–2710, 2009.

GRASSBERGER, M.; FRIEDRICH, E.; REITER, C. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. **International journal of legal medicine**, v. 117, n. 2, p. 75–81, 2003.

GREENBERG, B.; KUNICH, J. C. **Entomology and the Law: Flies as Forensic Indicators**. [s.l.] Cambridge University Press, 2002.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. The Genus *Serratia*. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 221–248, 1978.

GUÉDOT, C. et al. Identification of a Sex Attractant Pheromone for Male Winterform Pear *Psylla*, *Cacopsylla pyricola*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, n. 12, p. 1437–1447, 1 dez. 2009.

GUERRA, M. P. et al. Enterobactérias e estafilococos em moscas capturadas em feira-livre no município de Teixeira de Freitas-BA / Enterobacteria and staphylococci in flies captured in street market in the municipality of Teixeira de Freitas, Bahia, Brazil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 3, p. 1130–1144, 11 jun. 2019.

GUIMARÃES, J. H. et al. Myiasis in man and animals in the neotropical region, bibliographic database. 1999.

GUIMARAES, J. H.; AP, D.; AX, G. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). 1978.

GUIMARÃES, J. H.; DO PRADO, A. P.; BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 23, n. 4, p. 245–255, 1979.

GUO, L.; LI, G. Q.; EWER, J. Olfactory perception of oviposition-detering fatty acids and their methyl esters by the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 1, 2009.

GUPTA, A. K. et al. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 79, n. 3, p. 581–593, 1 mar. 2012.

GUPTA, V. et al. The route of infection determines *Wolbachia* antibacterial protection in *Drosophila*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1856, p. 20170809, 14 jun. 2017.

HADLEY, N. F. Water relations of terrestrial arthropods Academic Press. **San Diego, CA**, v. 356, 1994.

HALL, M. J.; SMITH, K. G. Diptera causing myiasis in man. In: **Medical insects and arachnids**. [s.l.] Springer, 1993. p. 429–469.

HAMMACK, L. Protein feeding and oviposition effects on attraction of screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) to host fluids. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, n. 1, p. 97–102, 1990.

HANSKI, I. Assimilation by *Lucilia illustris* (Diptera) Larvae in Constant and Changing Temperatures. **Oikos**, v. 27, n. 2, p. 288–299, 1976.

HANSKI, I. An Interpolation Model of Assimilation by Larvae of the Blowfly *Lucilia illustris* (Calliphoridae) in Changing Temperatures. **Oikos**, v. 28, n. 2/3, p. 187–195, 1977.

HANSKI, I. Nutritional ecology of dung-and carrion-feeding insects. **Nutritional ecology of insects, mites, and spiders**. Wiley, New York, p. 837–884, 1987.

HANSSON, B. S. **Insect olfaction**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 1999.

HANSSON, B. S. A bug's smell – research into insect olfaction. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 5, p. 270–274, 1 maio 2002.

HARDISON, L. K. et al. Metabolism of Diethyl Ether and Cometabolism of Methyl tert-Butyl Ether by a Filamentous Fungus, a *Graphium* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3059–3067, ago. 1997.

HARRIS, M. O.; CORCORAN, J. **Toxicological profile for hexane**. 1999.

HARSHINI, R. et al. Diversity of Epiphytic Lactic Acid Bacteria (LAB) on Insect Oviposition Sites. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 07, p. 607–621, 20 jul. 2018.

HEATH, A. C. G. Beneficial aspects of blowflies (Diptera: Calliphoridae). **New Zealand Entomologist**, v. 7, n. 3, p. 343–348, 1982.

HEIMPEL, A. M.; WEST, A. S. Notes on the Pathogenicity of *Serratia Marcescens* Bizio for the Cockroach *Blattella Germanica* L. **Canadian Journal of Zoology**, v. 37, n. 2, p. 169–172, 1 abr. 1959.

HELANTERÄ, H.; MARTIN, S. J.; RATNIEKS, F. L. W. Recognition of nestmate eggs in the ant *Formica fusca* is based on queen derived cues. **Current Zoology**, v. 60, n. 1, p. 131–136, 1 fev. 2014.

HERRMANN, J. D. et al. Positive effects of the pollinators *Osmia cornuta* (Megachilidae) and *Lucilia sericata* (Calliphoridae) on strawberry quality. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 71–77, 1 fev. 2019.

HILKER, M.; MEINERS, T. **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2008.

HIRAI, P. et al. **EXTRAÇÃO DE COLORANTE NATURAL INTRACELULAR DE *Talaromyces amestolkiae* UTILIZANDO SONICADOR E LÍQUIDO IÔNICO COMO AGENTE EXTRATOR**. 1 jul. 2017

HÖLLER, C.; WILLIAMS, H. J.; VINSON, S. B. Evidence for a two-component external marking pheromone system in an aphid hyperparasitoid. **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, n. 6, p. 1021–1035, 1 jun. 1991.

HOLLIS, J. H.; KNAPP, F. W.; DAWSON, K. A. Influence of Bacteria Within Bovine Feces on the Development of the Face Fly (Diptera: Muscidae). **Environmental Entomology**, v. 14, n. 5, p. 568–571, 1 out. 1985.

HOOPER, R. L.; PITTS, C. W.; WESTFALL, J. A. Sense Organs on the Ovipositor of the Face Fly, *Musca autumnalis*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 65, n. 3, p. 577–586, 15 maio 1972.

HORIKOSHI, M. et al. *Cotesia glomerata* female wasps use fatty acids from plant–herbivore complex in host searching. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 6, p. 1505–1515, 1997.

HOSOKAWA, T. et al. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 2, p. 769–774, 12 jan. 2010.

- HOUGH, J. A.; ECKENRODE, C. J.; HARMAN, G. E. Nonpathogenic bacteria affecting oviposition behavior in the onion fly. **Environmental Entomology**, v. 11, n. 3, p. 585–589, 1982.
- HOUGH, J. A.; HARMAN, G. E.; ECKENRODE, C. J. Microbial stimulation of onion maggot oviposition. **Environmental Entomology**, v. 10, n. 2, p. 206–210, 1981.
- HOUGH-GOLDSTEIN, J. A.; BASSLER, M. A. Effects of bacteria on oviposition by seedcorn maggots (Diptera: Anthomyiidae). **Environmental entomology**, v. 17, n. 1, p. 7–12, 1988.
- HOWARD, R. W. Cuticular hydrocarbons and chemical communication. **Insect lipids: chemistry, biochemistry and biology**, p. 179–226, 1993.
- HOWARD, R. W.; BLOMQUIST, G. J. Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, v. 50, n. 1, p. 371–393, 2005.
- HOWLETT, B. G. Hybrid carrot seed crop pollination by the fly *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Applied Entomology**, v. 136, n. 6, p. 421–430, 2012.
- HUGHES, J. B. et al. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4399–4406, 1 out. 2001.
- HURST, J. L. et al. Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. **Animal Behaviour**, v. 55, n. 5, p. 1289–1297, 1 maio 1998.
- IANCU, L. et al. Characterizing forensically important insect and microbial community colonization patterns in buried remains. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15513, 19 out. 2018.
- IANCU, L.; SAHLEAN, T.; PURCAREA, C. Dynamics of Necrophagous Insect and Tissue Bacteria for Postmortem Interval Estimation During the Warm Season in Romania. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 1, p. 54–66, 1 jan. 2016.
- IKESHOJI, TOSHIAKI; ISHIKAWA, YUKIO; MATSUMOTO, YOSHIHARU. Attractants against the onion maggots and flies, *Hylemya antiqua*, in onions inoculated with bacteria. **Journal of Pesticide Science**, v. 5, n. 3, p. 343–350, 1980.
- IMAI, T. et al. Female-produced oviposition deterrents of the cigarette beetle, *Lasioderma serricornis* (F.) (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 4, p. 1237–1247, 1 abr. 1990.
- IMBIRIBA, A. S. et al. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 1977.
- INCE, IKBAL A. et al. Isolation and identification of bacteria from *Thaumetopoea pityocampa* Den. and Schiff. (Lep., Thaumetopoeidae) and determination of their biocontrol potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 3005–3015, 1 dez. 2008.
- IRELAND, S.; TURNER, B. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. **Forensic Science International**, v. 159, n. 2–3, p. 175–181, 2006.

- IVES, A. R. Aggregation and Coexistence in a Carrion Fly Community. **Ecological Monographs**, v. 61, n. 1, p. 75–94, 1991.
- JANG, E. B.; NISHIJIMA, K. A. Identification and Attractancy of Bacteria Associated with *Dacus dorsalis* (Diptera: Tephritidae). **Environmental Entomology**, v. 19, n. 6, p. 1726–1731, 1 dez. 1990.
- JARLAN, A.; DE OLIVEIRA, D.; GINGRAS, J. Pollination by *Eristalis tenax* (Diptera: Syrphidae) and seed set of greenhouse sweet pepper. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 6, p. 1646–1649, 1997.
- JIANG, X.-C. et al. Electrophysiological and oviposition responses of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae), to compounds rinsed from the surfaces of sugarcane and maize leaves. **European Journal of Entomology**, v. 112, n. 2, 2015.
- JIANG, Y. et al. Semiochemicals from ovaries of gravid females attract ovipositing female houseflies, *Musca domestica*. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, n. 10, p. 945–950, 2002.
- JOHNSON, A. P.; MIKAC, K. M.; WALLMAN, J. F. Thermogenesis in decomposing carcasses. **Forensic Science International**, v. 231, n. 1, p. 271–277, 10 set. 2013.
- JOHNSON, K. N. Bacteria and antiviral immunity in insects. **Current Opinion in Insect Science**, Ecology * Parasites/Parasitoids/Biological control. v. 8, p. 97–103, 1 abr. 2015.
- JOHNSON, N. F.; BORROR, D. J. **Borrer and DeLong's Introduction to the Study of Insects**. [s.l.] Thompson Brooks/Cole, 2005.
- JONG, G. D. The Influence of the Distribution of Juveniles Over Patches of Food On the Dynamics of a Population. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 29, n. 1, p. 33–51, 1 jan. 1978.
- JUDD, G. J. R.; BORDEN, J. H. Aggregated oviposition in *Delia antiqua* (Meigen): A case for mediation by semiochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 4, p. 621–635, 1 abr. 1992.
- JUNQUEIRA, A. C. M. et al. The microbiomes of blowflies and houseflies as bacterial transmission reservoirs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 24 nov. 2017.
- KASSIRI, H.; AKBARZADEH, K.; GHADERI, A. Isolation of pathogenic bacteria on the house fly, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), body surface in Ahwaz hospitals, Southwestern Iran. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1116, p. S1119, 2012.
- KELLNER, R. Pederin-Investition der Weibchen von *Paederus* spp. (Coleoptera: Staphylinidae) in ihre Nachkommen. **Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Entomol**, v. 11, p. 469–472, 1997.
- KELLNER, R. L. L. When Do *Paederus riparius* Rove Beetles (Coleoptera : Staphylinidae) Biosynthesize Their Unique Hemolymph Toxin Pederin? **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 53, n. 11–12, p. 1081–1086, 1 dez. 1998.
- KELLNER, R. L. L. What is the basis of pederin polymorphism in *Paederus riparius* rove beetles? The endosymbiotic hypothesis. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, n. 1, p. 41–49, 1999.

KENT, W. J. BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. **Genome Research**, v. 12, n. 4, p. 656–664, 4 jan. 2002.

KNEIDEL, K. A. Influence of Carcass Taxon and Size on Species Composition of Carrion-breeding Diptera. **The American Midland Naturalist**, v. 111, n. 1, p. 57–63, 1984.

KOHNO, M. et al. Pheromone-Like Substances Affecting the Oviposition Behavior of the Female Cigarette Beetle, *Lasioderma serricorne*: (F.) (Coleoptera: Anobiidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 21, n. 1, p. 15–20, 1986.

KÖNÖNEN, E. et al. Establishment of Oral Anaerobes during the First Year of Life. **Journal of Dental Research**, v. 78, n. 10, p. 1634–1639, 1 out. 1999.

KOSTAL, V.; BAUR, R.; STADLER, E. Exploration and assessment of the oviposition substrate by the cabbage root fly, *Delia radicum* (Diptera: Anthomyiidae). **European Journal of Entomology**, v. 97, n. 1, p. 33–40, 2000.

KOSTELC, J. G. et al. Macrocyclic polyethers as probes into pheromone receptor mechanisms of a sciarid fly, *Lycoriella mali* fitch. **Journal of Chemical Ecology**, v. 5, n. 2, p. 179–185, 1 mar. 1979.

KRANZ, W. et al. Factors Affecting Species Identifications of Blow Fly Pupae Based upon Chemical Profiles and Multivariate Statistics. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 43, jun. 2017.

KUMAR, Y. **Salmonella - A Diversified Superbug**. [s.l: s.n.].

LAKES, R.; POLLACK, G. S. The development of the sensory organs of the legs in the blowfly, *Phormia regina*. **Cell and Tissue Research**, v. 259, n. 1, p. 93–103, 1 jan. 1990.

LAM, K. et al. Proliferating bacterial symbionts on house fly eggs affect oviposition behaviour of adult flies. **Animal Behaviour**, v. 74, n. 1, p. 81–92, 1 jul. 2007.

LAM, K. et al. Bacteria on housefly eggs, *Musca domestica*, suppress fungal growth in chicken manure through nutrient depletion or antifungal metabolites. **Naturwissenschaften**, v. 96, n. 9, p. 1127–1132, 1 set. 2009.

LAM, K. **Oviposition ecology of house flies, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae): competition, chemical cues, and bacterial symbionts**. Thesis—[s.l.] Biological Sciences Department - Simon Fraser University, 2010.

LAM, K.; GEISREITER, C.; GRIES, G. Ovipositing female house flies provision offspring larvae with bacterial food. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 133, n. 3, p. 292–295, 2009.

LANCE, D. R. Odors influence choice of oviposition sites by *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 18, n. 7, p. 1227–1237, 1 jul. 1992.

LANE, R. P.; CROSSKEY, R. W. (EDS.). **Medical Insects and Arachnids**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993.

- LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística Aplicada [Applied statistics]**. [s.l.] São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2015.
- LAUZON, C. R. et al. Attraction of *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae) Flies to Odor of Bacteria: Apparent Confinement to Specialized Members of Enterobacteriaceae. **Environmental Entomology**, v. 27, n. 4, p. 853–857, 1 ago. 1998.
- LAUZON, C. R.; SJOGREN, R. E.; PROKOPY, R. J. Enzymatic capabilities of bacteria associated with apple maggot flies: a postulated role in attraction. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, n. 4, p. 953–967, 2000.
- LEBLANC, H. N. Olfactory stimuli associated with the different stages of vertebrate decomposition and their role in the attraction of the blowfly *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae) to carcasses. 2008.
- LECCESE, A. Insects as forensic indicators: methodological aspects. **Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 26–32, 2004.
- LEFEBVRE, F.; PASQUERAULT, T. Temperature-dependent development of *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) and *Ophyra capensis* (Wiedemann, 1818)(Diptera, Muscidae). **Forensic science international**, v. 139, n. 1, p. 75–79, 2004.
- LEHMAN, R. M.; LUNDGREN, J. G.; PETZKE, L. M. Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment. **Microbial ecology**, v. 57, n. 2, p. 349–358, 2009.
- LEI, F. et al. Higher-Level Production of Volatile Fatty Acids In Vitro by Chicken Gut Microbiotas than by Human Gut Microbiotas as Determined by Functional Analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5763–5772, 15 ago. 2012.
- LEITE, A. C. R. et al. Primeira ocorrência no Brasil de miíase em bezerro por *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). **Arq. Bras. Med. Vet. Zool**, v. 35, p. 287–288, 1983.
- LEROY, P. D. et al. The semiochemically mediated interactions between bacteria and insects. **Chemoecology**, v. 21, n. 3, p. 113–122, 1 set. 2011.
- LI, G.; ISHIKAWA, Y. Oviposition deterrents in larval frass of four *Ostrinia* species fed on an artificial diet. **Journal of chemical ecology**, v. 30, n. 7, p. 1445–1456, 2004.
- LI, G.; ISHIKAWA, Y. Oviposition deterrents from the egg masses of the adzuki bean borer, *Ostrinia scapulalis* and Asian corn borer, *O. furnacalis*. **Entomologia experimentalis et applicata**, v. 115, n. 3, p. 401–407, 2005.
- LI, S. et al. Ultrastructure of Sensilla on Larvae and Adults of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Entomological News**, v. 126, n. 1, p. 52–63, jun. 2016.
- LIMA, T.; VON ZUBEN, C. J. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) Oviposition Behavior in Previous Oviposition Situation. **Neotropical Entomology**, v. 45, n. 5, p. 612–617, 1 out. 2016.

LIMSOPATHAM, K. et al. Sterilization of blow fly eggs, *Chrysomya megacephala* and *Lucilia cuprina*, (Diptera: Calliphoridae) for maggot debridement therapy application. **Parasitology Research**, v. 116, n. 5, p. 1581–1589, 1 maio 2017.

LINHARES, A. X. The gonotrophic cycle of *Chrysomya magacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 32, n. 3–4, p. 383–392, 1988.

LIU, M.; YU, H.; LI, G. Oviposition deterrents from eggs of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): Chemical identification and analysis by electroantennogram. **Journal of insect physiology**, v. 54, n. 4, p. 656–662, 2008.

LIU, W. **Chemical and Nutritional Ecology of *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) as Related to Volatile Organic Compounds and Associated Essential Amino Acids**. Thesis—[s.l: s.n.].

LOCKEY, K. H. Cuticular hydrocarbons of adult *eurychora* sp. (Coleoptera: tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 223–227, 1 jan. 1985.

LOCKEY, K. H. Lipids of the insect cuticle: origin, composition and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 89, n. 4, p. 595–645, 1 jan. 1988.

LORENZI, M. C. et al. *Polistes biglumis bimaculatus* epicuticular hydrocarbons and nestmate recognition (Hymenoptera, Vespidae). **Insectes sociaux**, v. 44, n. 2, p. 123–138, 1997.

LUNA, I. G. et al. Determinación de la flora bacteriana asociada con la descomposición del hígado de cerdo y posible atracción de las moscas del gusano barrenador del ganado (*Cochlimya hominivorax*) (Diptera: Calliphoridae). **Tecnociencia**, v. 6, n. 1, p. 111–123, 2004.

LUNAS, B. M. et al. Hydrocarbon and Fatty Acid Composition from Blowfly Eggs Represents a Potential Complementary Taxonomic Tool of Forensic Importance. **Journal of forensic sciences**, v. 64, n. 6, p. 1720–1725, 2019.

LYSYK, T. J. et al. Rearing Stable Fly Larvae (Diptera: Muscidae) on an Egg Yolk Medium. **Journal of Medical Entomology**, v. 36, n. 3, p. 382–388, 1 maio 1999.

MA, Q. et al. *Proteus mirabilis* interkingdom swarming signals attract blow flies. **The ISME Journal**, v. 6, n. 7, p. 1356–1366, jul. 2012.

MAERTENS, L.; COUDERT, P. **Recent advances in rabbit sciences**. [s.l.] ILVO, 2006. p. 300 p.

MAGURRAN, A. E. **Measuring Biological Diversity**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.

MANLY, B. F. J.; ALBERTO, J. A. N. **Métodos Estatísticos Multivariados: Uma Introdução**. [s.l.] Bookman Editora, [s.d.].

MANOS, J.; BELAS, R. The genera *proteus*, *providencia*, and *morganella*. **Prokaryotes**, v. 6, p. 245–269, 2006.

MARSHALL, D. G. et al. *Morganella morganii* bacteria produces phenol as the sex pheromone of the New Zealand grass grub from tyrosine in the colleterial gland. **The Science of Nature**, v. 103, n. 7, p. 59, 28 jun. 2016.

MARTINEZ, A. J. et al. Laboratory and Field Olfactory Attraction of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) to Metabolites of Bacterial Species. **The Florida Entomologist**, v. 77, n. 1, p. 117–126, 1994.

MATSUURA, K. et al. The Antibacterial Protein Lysozyme Identified as the Termite Egg Recognition Pheromone. **PLoS ONE**, v. 2, n. 8, 29 ago. 2007.

MCALISTER, M. et al. Survival and nutritional requirements of three bacteria isolated from ultrapure water. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 75–82, 1 ago. 2002.

MCCALL, P. J. Chemoecology of oviposition in insects of medical and veterinary importance. **Chemoecology of Insect Eggs and Egg Deposition**, p. 265–290, 2002.

MCFETERS, G. A. et al. Distribution of bacteria within operating laboratory water purification systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1410–1415, 1 maio 1993.

MCMANUS, R.; RAVENSCRAFT, A.; MOORE, W. Bacterial Associates of a Gregarious Riparian Beetle With Explosive Defensive Chemistry. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.

MENDES, J.; LINHARES, A. X. Atratividade por iscas e estágios de desenvolvimento ovariano em várias espécies sinantrópicas de Calliphoridae (Diptera). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 37, n. 1, p. 157–166, 1993.

MERESZ, O.; MOZSGAI, C. **Insect attractant composition**, 13 jan. 1976. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US3932616A/en>>. Acesso em: 29 out. 2020

MESSINA, F. J.; BARMORE, J. L.; RENWICK, J. A. A. Oviposition deterrent from eggs of *Callosobruchus maculatus*: Spacing mechanism or artifact? **Journal of Chemical Ecology**, v. 13, n. 1, p. 219–226, 1 jan. 1987.

MILLER, M. L. et al. Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. **Journal of Forensic Science**, v. 39, n. 5, p. 1305–1313, 1994.

MINARD, G. et al. Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 2014.

MINGCHAY, P. et al. *Wolbachia* supergroups A and B in natural populations of medically important filth flies (Diptera: Muscidae, Calliphoridae, and Sarcophagidae) in Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 45, n. 2, p. 309, 2014.

MISHRA, G.; SINGH, N.; SHAHID, M. Effect of presence and semiochemicals of conspecific stages on oviposition by ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**, v. 109, n. 3, p. 363, 2012.

MITAKA, Y. et al. Chemical identification of an aggregation pheromone in the termite *Reticulitermes speratus*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 7424, 4 maio 2020.

MITRA, P.; DAS, S.; BARIK, A. Leaf waxes from *Lathyrus sativus*: short-range attractant and stimulant for nymph laying in a viviparous insect. **Chemoecology**, p. 1–13, 2020.

MOBARAK, S. H. et al. The importance of leaf surface wax as short-range attractant and oviposition stimulant in a generalist Lepidoptera. **Journal of Applied Entomology**, v. 144, n. 7, p. 616–631, 2020.

MOHAREB, F. et al. Identification of meat spoilage gene biomarkers in *Pseudomonas putida* using gene profiling. **Food Control**, v. 57, p. 152–160, 1 nov. 2015.

MOHR, R. M.; TOMBERLIN, J. K. Environmental Factors Affecting Early Carcass Attendance by Four Species of Blow Flies (Diptera: Calliphoridae) in Texas. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 3, p. 702–708, 1 maio 2014.

MOORE, H. E. **Analysis of cuticular hydrocarbons in forensically important blowflies using mass spectrometry and its application in Post Mortem Interval estimations**. PhD Thesis—[s.l.] Keele University, 2013.

MOORE, H. E. et al. Age estimation of *Calliphora* (Diptera: Calliphoridae) larvae using cuticular hydrocarbon analysis and Artificial Neural Networks. **Forensic Science International**, v. 268, p. 81–91, 1 nov. 2016.

MOORE, H. E. et al. The potential use of cuticular hydrocarbons and multivariate analysis to age empty puparial cases of *Calliphora vicina* and *Lucilia sericata*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1933, 16 maio 2017.

MOORE, H. E.; ADAM, C. D.; DRIJFHOUT, F. P. Potential Use of Hydrocarbons for Aging *Lucilia sericata* Blowfly Larvae to Establish the Postmortem Interval. **Journal of Forensic Sciences**, v. 58, n. 2, p. 404–412, 2013.

MOORE, H. E.; ADAM, C. D.; DRIJFHOUT, F. P. Identifying 1st instar larvae for three forensically important blowfly species using “fingerprint” cuticular hydrocarbon analysis. **Forensic Science International**, v. 240, p. 48–53, 1 jul. 2014.

MORRIS, M. C. et al. The responses of *Lucilia cuprina* to odours from sheep, offal and bacterial cultures. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 11, n. 1, p. 58–64, 1997.

MORRIS, M. C. et al. Trapping sheep blowflies with lures based on bacterial cultures. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, n. 2, p. 125–130, 1998.

MUKHERJEE, A.; SARKAR, N.; BARIK, A. Alkanes in flower surface waxes of *Momordica cochinchinensis* influence attraction to *Aulacophora foveicollis* Lucas (Coleoptera: Chrysomelidae). **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 366–371, 2013.

MÜLLER, H. E. *Providencia friedericiana*, a New Species Isolated from Penguins. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 709–715, 1983.

MURALI-BASKARAN, R. K. et al. Kairomones effect on parasitic activity of *Trichogramma japonicum* against rice yellow stem borer, *Scirpophaga incertulas*. **Journal of Applied Entomology**, 2020.

MURYATI, M. et al. Oviposition Deterrent of *Bactrocera carambolae* Resulted from Eggs Deposition on Mango. **AGRIVITA, Journal of Agricultural Science**, v. 39, n. 2, p. 201–213, 2017.

NAKAGAWA, A.; IWAMA, A.; MIZUKAMI, A. **Correlation of Chemoreception with Choice of Oviposition Site in Blowflies, *Phormia regina***. (K. Kurihara, N. Suzuki, H. Ogawa, Eds.) Olfaction and Taste XI. **Anais...**Tokyo: Springer Japan, 1994

NASCIMENTO, E. A. DO et al. INSETOS DO ATERRO SANITARIO DE PONTA GROSSA. PARANÁ, COMO POTENCIAIS DISSEMINADORES DE ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 9, n. 1, 2003.

NASSU, M. P.; THYSSEN, P. J. Evaluation of larval density *Cochliomyia macellaria* F. (Diptera: Calliphoridae) for therapeutic use in the recovery of tegumentar injuries. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3255–3260, 1 set. 2015.

NELSON, D. R.; BLOMQUIST, G. J.; HAMILTON, R. J. Waxes: chemistry, molecular biology and functions. **Insect Waxes. Oily Press: Dundee, Scotland**, p. 1–90, 1995.

NGERN-KLUN, R. et al. Fine structure of *Chrysomya nigripes* (Diptera: Calliphoridae), a fly species of medical importance. **Parasitology Research**, v. 100, n. 5, p. 993, 10 jan. 2007.

NISHANBAEV, S. Z. et al. Volatile compounds from the aerial parts of four *Alhagi* species growing in Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 1, p. 167–170, 2016.

NOLTE, K. B.; PINDER, R. D.; LORD, W. D. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. **Journal of Forensic Science**, v. 37, n. 4, p. 1179–1185, 1992.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 2, n. 2, p. 211–220, 1 abr. 1976.

NORRIS, K. R. The bionomics of blow flies. **Annual review of Entomology**, v. 10, n. 1, p. 47–68, 1965.

OLANIRAN, O. A. et al. A Male-Predominant Cuticular Hydrocarbon, 7-Methyltricosane, is used as a Contact Pheromone in the Western Flower Thrips *Frankliniella occidentalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 4, p. 559–568, 1 abr. 2013.

OLIVEIRA, V. C. et al. Enterobacteria associated to adults of *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Diptera: Calliphoridae) at the Zoo of Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 556–561, ago. 2006.

OLIVEIRA-COSTA, J. Entomologia forense: quando os insetos são os vestígios. In: **Entomologia forense: quando os insetos são os vestígios**. [s.l: s.n.]. p. xix–420.

OLSEN, A. R. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials: III. Review of flies and foodborne enteric disease. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, n. 3, p. 199–211, 1998.

OZAKI, M. et al. Perception of Noxious Compounds by Contact Chemoreceptors of the Blowfly, *Phormia regina*: Putative Role of an Odorant-binding Protein. **Chemical Senses**, v. 28, n. 4, p. 349–359, 1 maio 2003.

PACZKOWSKI, S.; SCHÜTZ, S. Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 917–935, 1 ago. 2011.

PANDAY, G. et al. Studies on Electrophysiology, Olfactometric Response and Chemical Analysis of Groundnut Extracts against the Groundnut Bruchid *Caryedon serratus*. **Journal of Agricultural Technology**, v. 7, n. 5, p. 1265–1273, 2011.

PARALUPPI, N. D. et al. CALLIPHORIDAE (DIPTERA) IN MANAUS: IV. BACTERIA ISOLATED FROM BLOWFLIES COLLECTED IN STREET MARKETS. **Acta Amazonica**, v. 26, n. 1–2, p. 93–96, jun. 1996.

PARNÉS, A.; LAGAN, K. M. Larval therapy in wound management: a review. **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, n. 3, p. 488–493, 2007.

PASTORE, A.; AUGUSTO, R.; 1989-. Diversidade taxonômica e biodegradação de lignina em comunidade bacteriana do solo da caatinga. 2016.

PAULA, M. C. et al. Chemotaxonomic profile and intraspecific variation in the blow fly of forensic interest *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 1, p. 14–23, 2017.

PAULA, M. C. et al. New method for estimating the post-mortem interval using the chemical composition of different generations of empty puparia: Indoor cases. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0209776, 20 dez. 2018.

PAYKOVIC-LUCIC, S. et al. Cuticular chemoprofile of the fruit fly *Drosophila subobscura* (diptera, drosophilidae). **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 28, n. 6, p. 1881–1886, 2018.

PAYNE, J. A. A Summer Carrion Study of the Baby Pig *Sus Scrofa* Linnaeus. **Ecology**, v. 46, n. 5, p. 592–602, 1965.

PECHAL, J. L. et al. Hydrocarbon profiles throughout adult Calliphoridae aging: A promising tool for forensic entomology. **Forensic Science International**, v. 245, p. 65–71, 1 dez. 2014.

PECHAL, J. L.; BENBOW, M. E. Microbial ecology of the salmon necrobiome: evidence salmon carrion decomposition influences aquatic and terrestrial insect microbiomes. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1511–1522, 2016.

PECHENIK, J. A. **Biologia dos Invertebrados 7ed.** [s.l.] McGraw Hill Brasil, 2016.

PEIX, A.; RAMÍREZ-BAHENA, M.-H.; VELÁZQUEZ, E. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. **Infection, Genetics and Evolution**, Includes papers from the Special Issue “Parasitology in Mexico”. v. 9, n. 6, p. 1132–1147, 1 dez. 2009.

PETERKOVA-KOCI, K. et al. Significance of bacteria in oviposition and larval development of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 145, 24 jul. 2012.

PICKETT, J.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. Insect supersense: Mate and host location by insects as model systems for exploiting olfactory interactions. **The Biochemist**, v. 20, p. 8–13, 1 jan. 1998.

PINHEIRO, M. A. R. Q. et al. Use of maggot therapy for treating a diabetic foot ulcer colonized by multidrug resistant bacteria in Brazil. **Indian Journal of Medical Research**, v. 141, n. 3, p. 340, 3 jan. 2015.

POIRIER, L. M.; BORDEN, J. H. Recognition and avoidance of previously laid egg masses by the oblique-banded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Insect Behavior**, v. 4, n. 4, p. 501–508, 1 jul. 1991.

POMONIS, J. G. Cuticular hydrocarbons of the screwworm, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 9, p. 2301–2317, 1 set. 1989.

PONNUSAMY, L. et al. Oviposition responses of *Aedes* mosquitoes to bacterial isolates from attractive bamboo infusions. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 486, 23 set. 2015.

PONNUSAMY, L. et al. **Mosquito attractant compositions and methods**, 19 jul. 2016. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US9392788B2/en>>. Acesso em: 17 set. 2020

PONTON, F. et al. Macronutrients mediate the functional relationship between *Drosophila* and *Wolbachia*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1800, p. 20142029, 7 fev. 2015.

PORTER, J. Strawberry yields increased by better pollination. **Horticulture Industry (UK)**, 1977.

PROKOPY, R. J.; MALAVASI, A.; MORGANTE, J. S. Oviposition deterring pheromone in *Anastrepha fraterculus* flies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 8, n. 4, p. 763–771, 1 abr. 1982.

QUARRELL, S. R. et al. Identification of the putative aggregation pheromone components emitted by the European earwig, *Forficula auricularia*. **Chemoecology**, v. 26, n. 5, p. 173–186, 1 out. 2016.

QUEEN, J. P.; QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. [s.l.] Cambridge University Press, 2002.

QUEIROZ, A. F. DE O. Comportamento sexual de *Atheloca bondari* Heinrich, 1956 (Lepidoptera: Pyralidae): descrição e mediação por feromônios. 18 out. 2019.

RAFAEL, J. A. **Insetos do Brasil. Diversidade e Taxonomia**. Edição: 1ª ed. Ribeirão Preto, SP: Holos, 2012.

RAINA, A. K. Deterrence of repeated oviposition in sorghum shootfly *Atherigona soccata*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 7, n. 5, p. 785–790, 1 set. 1981.

RAND, K. H.; HOUCK, H. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. **Molecular and Cellular Probes**, v. 4, n. 6, p. 445–450, 1 dez. 1990.

REDDY, P. R.; RAJAN, V. V.; VERGHESE, A. A non-meat-based artificial diet and protocol for mass rearing of *Chrysomya megacephala* (Fab.)(Diptera: Calliphoridae), an important pollinator of mango. 2014.

REED, H. B. A Study of Dog Carcass Communities in Tennessee, with Special Reference to the Insects. **The American Midland Naturalist**, v. 59, n. 1, p. 213–245, 1958.

RICE, M. J. Contact Chemoreceptors on the Ovipositor of *Lucilia Cuprina* (Wied.), The Australian Sheep Blowfly. **Australian Journal of Zoology**, v. 24, n. 3, p. 353–360, 1976.

RICHARDS, C. S.; VILLET, M. H. Factors affecting accuracy and precision of thermal summation models of insect development used to estimate post-mortem intervals. **International Journal of Legal Medicine**, v. 122, n. 5, p. 401–408, 2008.

RICHTER, I.; KRAIN, H.; MANGOLD, H. K. Long-chain (Z)-9-alkenes are ‘Psychedelics’ to houseflies with regard to visually stimulated sex attraction and aggregation. **Experientia**, v. 32, n. 2, p. 186–188, 1 fev. 1976.

RINKER, D. C. et al. Blood meal-induced changes to antennal transcriptome profiles reveal shifts in odor sensitivities in *Anopheles gambiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 20, p. 8260–8265, 14 maio 2013.

RIVERS, D. B.; DAHLEM, G. A. **The Science of Forensic Entomology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2014.

RIVERS, D. B.; THOMPSON, C.; BROGAN, R. Physiological trade-offs of forming maggot masses by necrophagous flies on vertebrate carrion. **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, n. 5, p. 599–611, out. 2011.

ROBACKER, D. C.; BARTELT, R. J. Chemicals Attractive to Mexican Fruit Fly from *Klebsiella pneumoniae* and *Citrobacter freundii*. Cultures Sampled by Solid-Phase Microextraction. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 12, p. 2897–2915, 1 dez. 1997.

ROBACKER, D. C.; LAUZON, C. R. Purine metabolizing capability of *Enterobacter agglomerans* affects volatiles production and attractiveness to Mexican fruit fly. **Journal of chemical ecology**, v. 28, n. 8, p. 1549–1563, 2002.

ROESCH, L. F. W. et al. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal**, v. 1, n. 4, p. 283–290, ago. 2007.

ROMERO, A.; BROCE, A.; ZUREK, L. Role of bacteria in the oviposition behaviour and larval development of stable flies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 1, p. 115–121, 2006.

ROSA, A. et al. Evaluation of the attractant effect and lipid profile modulation of natural fixed oils on the medfly *Ceratitis capitata* (Wiedemann). **Archives of insect biochemistry and physiology**, v. 99, n. 4, p. e21508, 2018.

ROUX, O.; GERS, C.; LEGAL, L. Ontogenetic study of three Calliphoridae of Forensic importance through cuticular hydrocarbon analysis. **Medical and veterinary entomology**, v. 22, p. 309–17, 1 jan. 2009.

ROY, P.; DASGUPTA, B. Behaviour of *Chrysomya megacephala* (Fabr.) and *Hemipyrellia ligurriens* (Wied.) as parasites of living animals under experimental conditions. **The South African Journal of Medical Sciences**, v. 36, n. 4, p. 85–91, dez. 1971.

SAEED, S. et al. The effect of blow flies (Diptera: Calliphoridae) on the size and weight of mangos (*Mangifera indica* L.). **PeerJ**, v. 4, 5 jun. 2016.

SAÏD, I. et al. Cuticular hydrocarbon profiles and aggregation in four *Periplaneta* species (Insecta: Dictyoptera). **Journal of Insect Physiology**, v. 51, n. 9, p. 995–1003, 1 set. 2005.

SALTER, S. J. et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. **BMC Biology**, v. 12, n. 1, p. 87, 12 nov. 2014.

SANDINE, W. E.; RADICH, P. C.; ELLIKER, P. R. ECOLOGY OF THE LACTIC STREPTOCOCCI. A REVIEW. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 35, n. 3, p. 176–185, 1 mar. 1972.

SANTOS, A. A. S.; AYRES, L. BioEstat 5.0—Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. **Belém, PA: Sociedade Civil Mamirauá**, 2007.

SARKAR, N.; MUKHERJEE, A.; BARIK, A. Long-chain alkanes: allelochemicals for host location by the insect pest, *Epilachna dodecastigma* (Coleoptera: Coccinellidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 48, n. 2, p. 171–179, 1 maio 2013.

SAUNDERS, D. S.; WHEELER, I.; KERR, A. Survival and reproduction of small blow flies (*Calliphora vicina*; Diptera: Calliphoridae) produced in severely overcrowded short-day larval cultures. **European Journal of Entomology**, v. 96, n. 1, p. 19–22, 1999.

SCAVÉE, V.; POLIS, F.-X.; SCHOEVAERDTS, J.-C. Maggot therapy: many hands make light work. **Acta Chirurgica Belgica**, v. 103, n. 4, p. 405–407, 2003.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.-K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 199–208, 1 jul. 1987.

SCHMIDTMANN, E. T.; MARTIN, P. A. W. Relationship Between Selected Bacteria and the Growth of Immature House Flies, *Musca domestica*, in an Axenic Test System. **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 2, p. 232–235, 1 mar. 1992.

SCHWARTZ, A. R. et al. *Bacillus simplex*—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **Agronomy**, v. 3, n. 4, p. 595–620, dez. 2013.

SEENIVASAGAN, T. et al. Olfaction in Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: flight orientation response to certain saturated carboxylic acids in human skin emanations. **Parasitology research**, v. 113, n. 5, p. 1927–1932, 2014.

SELBY, M. J. **Chemical ecology of the carrot fly, *Psila rosae* (F.): laboratory and field studies**. PhD Thesis—[s.l.] University of Nottingham, 2004.

SEZEN, K. et al. Identification and pathogenicity of bacteria from *Gryllotalpa gryllotalpa* L. (Orthoptera: Gryllotalpidae). **Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi**, v. 4, n. 2, p. 89–108, 2013.

SHAH, V. et al. Identification of oviposition deterrents from pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders). **Journal of Environmental Biology**, v. 41, n. 3, p. 644–649, 2020.

SHARMA, A. et al. Cuticular hydrocarbons as a tool for determining the age of *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) larvae. **Journal of Forensic Sciences**, v. n/a, n. n/a, [s.d.].

SHAW, B. G.; HARDING, C. D. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 1, p. 25–40, 1984.

SHAW, B. G.; HARDING, C. D. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from Chill-Stored Meats. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 217–223, 1989.

SHEN, H.; ROGELJ, S.; KIEFT, T. L. Sensitive, real-time PCR detects low-levels of contamination by *Legionella pneumophila* in commercial reagents. **Molecular and Cellular Probes**, v. 20, n. 3, p. 147–153, 1 jun. 2006.

SHEWMAKER, P. L. et al. *Vagococcus carniphilus* sp. nov., isolated from ground beef. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1505–1510, 2004.

SHIELDS, V. D. C.; HILDEBRAND, J. G. Recent advances in insect olfaction, specifically regarding the morphology and sensory physiology of antennal sensilla of the female sphinx moth *Manduca sexta*. **Microscopy Research and Technique**, v. 55, n. 5, p. 307–329, 2001.

SHOKAL, U. et al. Effects of co-occurring *Wolbachia* and *Spiroplasma* endosymbionts on the *Drosophila* immune response against insect pathogenic and non-pathogenic bacteria. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 16, 9 fev. 2016.

SILVA, A. S. DA; ZANETTE, R. A.; MONTEIRO, S. G. Biologia da mosca *Phaenicia sericata* em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 63–66, jun. 2008.

SILVA, Â. Z. DA et al. Necrophagous diptera associated with wild animal carcasses in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 58, n. 4, p. 337–342, dez. 2014.

SINGER, T. L. Roles of hydrocarbons in the recognition systems of insects. **American Zoologist**, v. 38, n. 2, p. 394–405, 1998.

SINGH, A.; SINGH, Z. Incidence of myiasis among humans—a review. **Parasitology Research**, v. 114, n. 9, p. 3183–3199, 1 set. 2015.

SINGH, B. et al. A metagenomic assessment of the bacteria associated with *Lucilia sericata* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 869–883, 1 jan. 2015.

SIWICKI, K. K. et al. The role of cuticular pheromones in courtship conditioning of *Drosophila* males. **Learning & Memory**, v. 12, n. 6, p. 636–645, 11 jan. 2005.

SMITH, K. G. **A manual of forensic entomology**. [s.l: s.n.].

SOARES, E. R. P. et al. Variation of cuticular chemical compounds in three species of *Mischocyttarus* (Hymenoptera: Vespidae) eusocial wasps. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 61, n. 3, p. 224–231, 1 jul. 2017.

SONTOWSKI, R.; VAN DAM, N. M. Functional Variation in Dipteran Gut Bacterial Communities in Relation to Their Diet, Life Cycle Stage and Habitat. **Insects**, v. 11, n. 8, p. 543, ago. 2020.

SPIKES, A. E. et al. First Contact Pheromone Identified for a Longhorned Beetle (Coleoptera: Cerambycidae) in the Subfamily Prioninae. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, n. 9, p. 943–954, 1 set. 2010.

SPIVAK, M.; CONLON, D.; BELL, W. J. Wind-Guided Landing and Search Behavior in Fleshflies and Blowflies Exploiting a Resource Patch (Diptera: Sarcophagidae, Calliphoridae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 84, n. 4, p. 447–452, 1 jul. 1991.

STACKEBRANDT, E.; JONES, D. The Genus *Brochothrix*. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria**. New York, NY: Springer US, 2006. p. 477–491.

STÄDLER, E. et al. Tarsal contact chemoreceptor for the host marking pheromone of the cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*: responses to natural and synthetic compounds. **Physiological Entomology**, v. 19, n. 2, p. 139–151, 1994.

STANBOROUGH, T. et al. Insight into the Genome of *Brochothrix thermosphacta*, a Problematic Meat Spoilage Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 5, 1 mar. 2017.

STANLEY, G.; SHAW, K. J.; EGAN, A. F. Volatile Compounds Associated with Spoilage of Vacuum-Packaged Sliced Luncheon Meat by *Brochothrix thermosphacta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 816–818, 1 mar. 1981.

STANLEY-SAMUELSON, D. W. et al. Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 9, n. 1, p. 1–33, 1988.

STATHEROPOULOS, M.; SPILIOPOULOU, C.; AGAPIOU, A. A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body. **Forensic Science International**, v. 153, n. 2, p. 147–155, 29 out. 2005.

STEINHAUS, E. Report on diagnoses of diseased insects 1944-1950. **Hilgardia**, v. 20, n. 22, p. 629–678, 1 maio 1951.

STEINHAUS, E. *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. **Hilgardia**, v. 28, n. 14, p. 351–380, 1 fev. 1959.

STEVENS, J. R. The evolution of myiasis in blowflies (Calliphoridae). **International journal for parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1105–1113, 2003.

STEVENS, J. R.; WALLMAN, J. F. The evolution of myiasis in humans and other animals in the Old and New Worlds (part I): phylogenetic analyses. **TRENDS in Parasitology**, v. 22, n. 3, p. 129–136, 2006.

STEWART, E. J. Growing Unculturable Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4151–4160, ago. 2012.

STOCK, I.; WIEDEMANN, B. Identification and Natural Antibiotic Susceptibility of *Morganella morganii*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, n. 3, p. 153–165, 1 mar. 1998.

STOFFOLANO, J. G. et al. Cuticular hydrocarbons and their role in copulatory behavior in *Phormia regina* (Meigen). **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 11, p. 1065–1076, 1 out. 1997.

SUKONTASON, K. et al. Mechanical carrier of bacterial enteric pathogens by *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in Chiang Mai, Thailand. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 31, p. 157–161, 2000.

SUKONTASON, K. L. et al. Ultrastructure of adhesive device in fly in families calliphoridae, muscidae and sarcophagidae, and their implication as mechanical carriers of pathogens. **Parasitology Research**, v. 98, n. 5, p. 477–481, 1 abr. 2006.

SUKONTASON, K. L. et al. Comparison between *Musca domestica* and *Chrysomya megacephala* as carriers of bacteria in northern Thailand. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 38, n. 1, p. 38, 2007.

SUN, X. et al. n-Pentacosane Acts as both Contact and Volatile Pheromone in the tea Weevil, *Myllocerinus aurilineatus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 43, n. 6, p. 557–562, 1 jun. 2017.

TAKKEN, W.; KNOLS, B. G. J. Odor-Mediated Behavior of Afrotropical Malaria Mosquitoes. **Annual Review of Entomology**, v. 44, n. 1, p. 131–157, 1999.

TANNURE-NASCIMENTO, I. C. et al. Decision rules for egg recognition are related to functional roles and chemical cues in the queenless ant *Dinoponera quadricaps*. **Naturwissenschaften**, v. 96, n. 7, p. 857–861, 1 jul. 2009.

TEIXEIRA, L.; FERREIRA, Á.; ASHBURNER, M. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. **PLOS Biology**, v. 6, n. 12, p. e1000002, 23 dez. 2008.

TELFORD, G. et al. Wound debridement potential of glycosidases of the wound-healing maggot, *Lucilia sericata*. **Medical and veterinary entomology**, v. 26, n. 3, p. 291–299, 2012.

THIÉRY, D. et al. Identification of an oviposition-regulating pheromone in the European grapevine moth, *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Experientia**, v. 48, n. 7, p. 697–699, 1 jul. 1992.

THIÉRY, D. et al. Egg dispersion in codling moth: influence of egg extract and of its fatty acid constituents. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, n. 12, p. 2015–2026, 1995.

THIÉRY, D.; GABEL, B.; POUVREAU, A. **Semiochemicals isolated from the eggs of *Ostrinia nubilalis* as oviposition deterrent in three other moth species of different families.** (S. B. J. Menken, J. H. Visser, P. Harrewijn, Eds.) Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships. **Anais...: Series Entomologica.** Dordrecht: Springer Netherlands, 1992

THOMPSON, C. R. et al. Bacterial Interactions With Necrophagous Flies. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 106, n. 6, p. 799–809, 1 nov. 2013.

THOMPSON, F. C. **The Diptera Site. The BioSystematic Database of World Diptera.** [s.l.] Status Report Version, 2008.

THYSSEN, P. J. et al. Sterilization of immature blowflies (Calliphoridae) for use in larval therapy. **Journal of Medicine and Medical Sciences**, p. 405–409, 2013.

TOMBERLIN, J. et al. A review of bacterial interactions with blow flies (diptera: Calliphoridae) of medical, veterinary, and forensic importance. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 110, p. 19–36, 1 jan. 2017.

TOTH, E. M. et al. Bacteria isolated from the different developmental stages and larval organs of the obligate parasitic fly, *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). **Microbial ecology**, v. 51, n. 1, p. 13–21, 2006.

TRIOLA, M. F. **Introdução à estatística.** [s.l.] ltc Rio de Janeiro, 2005. v. 10

TRIPLEHORN, C. A.; JOHNSON, N. F. Estudo dos insetos. **São Paulo: Cengage Learning**, 2011.

TURELLI, M.; HOFFMANN, A. A. Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. **Nature**, v. 353, n. 6343, p. 440–442, out. 1991.

UDAYAGIRI, S.; MASON, C. E. Epicuticular Wax Chemicals in *Zea mays* Influence Oviposition in *Ostrinia nubilalis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 7, p. 1675–1687, 1 jul. 1997.

UEBEL, E. C. et al. Evaluation of the Mating Stimulant Pheromones of *Fannia canicularis*, *F. pusio*, and *F. femoralis* as Attractants. **The Florida Entomologist**, v. 61, n. 3, p. 139–143, 1978.

ULLYETT, G. C. Competition for Food and Allied Phenomena in Sheep-Blowfly Populations. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 234, n. 610, p. 77–174, 1950.

URECH, R. et al. Suppression of populations of Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (Wiedemann)(Diptera: Calliphoridae), with a novel blowfly trap. **Australian Journal of Entomology**, v. 48, n. 2, p. 182–188, 2009.

URIEL, Y. et al. The fly factor phenomenon is mediated by interkingdom signaling between bacterial symbionts and their blow fly hosts. **Insect Science**, v. 27, n. 2, p. 256–265, 2020.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463–471, 1963.

VARGAS, A. R.; MALDONADO-MACIAS, A. A.; GARCÍA-ALCARAZ, J. L. **Macroergonomics for Manufacturing Systems: An Evaluation Approach**. [s.l.] Springer, 2017.

VARTIB-BROWNE, L. The choice of communal Oviposition sites by the Australian sheep blowfly. *Lucilia cuprina*. **Australian Journal of Zoology**, v. 6, n. 3, p. 241–247, 1958.

VASS, A. A. et al. Time Since Death Determinations of Human Cadavers Using Soil Solution. **Journal of Forensic Science**, v. 37, n. 5, p. 1236–1253, 1 set. 1992.

VASS, A. A. Beyond the grave—understanding human decomposition. **Microbiology today**, v. 28, p. 190–193, 2001.

VASS, A. A. et al. Decomposition Chemistry of Human Remains: A New Methodology for Determining the Postmortem Interval. **Journal of Forensic Science**, v. 47, n. 3, p. 542–553, 1 maio 2002.

VERHULST, N. O. et al. Differential Attraction of Malaria Mosquitoes to Volatile Blends Produced by Human Skin Bacteria. **PLOS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15829, 30 dez. 2010.

VICKERS, N. Mechanisms of animal navigation in odor plumes. **The Biological Bulletin**, v. 198, n. 2, p. 203–212, 1 abr. 2000.

VILELA, E. F.; DELLA LÚCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. **Feromônios de Insetos: Biologia, Química e Emprego no Manejo de Pragas, 2ª edição, Ribeirão Preto: Holos**, p. 9–12, 2001.

VON ZUBEN, C. J. et al. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **Journal of Applied Entomology**, v. 120, n. 1–5, p. 379–382, 1996.

VOSS, S. C. et al. Reflectance-based determination of age and species of blowfly puparia. **International Journal of Legal Medicine**, v. 131, n. 1, p. 263–274, 1 jan. 2017.

WADA-KATSUMATA, A. et al. Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 51, p. 15678–15683, 22 dez. 2015.

WALL, R.; FISHER, P. Visual and olfactory cue interaction in resource-location by the blowfly, *Lucilia sericata*. **Physiological Entomology**, v. 26, n. 3, p. 212–218, 2001.

WALLIS, D. I. Olfactory stimuli and oviposition in the blowfly, *Phormia regina* Meigen. **Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 4, p. 603–615, 1962.

WATSON, D. W.; MARTIN, P. A. W.; SCHMIDTMANN, E. T. Egg Yolk and Bacteria Growth Medium for *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 30, n. 4, p. 820–823, 1 jul. 1993.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737–738, abr. 1953.

WEI, T. et al. Comparative analysis of bacterial community and antibiotic-resistant strains in different developmental stages of the housefly (*Musca domestica*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p. 1775–1783, 1 fev. 2013.

WEI, T. et al. Seasonal variations in bacterial communities and antibiotic-resistant strains associated with green bottle flies (Diptera: Calliphoridae). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 9, p. 4197–4208, 1 maio 2014.

WELLS, J. D.; GREENBERG, B. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bulletin of Entomological Research**, v. 82, n. 1, p. 133–137, mar. 1992.

WERREN, J. H.; WINDSOR, D.; GUO, L. R. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 262, n. 1364, p. 197–204, 22 nov. 1995.

WERTHEIM, B. et al. PHEROMONE-MEDIATED AGGREGATION IN NONSOCIAL ARTHROPODS: An Evolutionary Ecological Perspective. **Annual Review of Entomology**, v. 50, n. 1, p. 321–346, 2005.

WEYRICH, L. S. et al. Laboratory contamination over time during low-biomass sample analysis. **Molecular Ecology Resources**, v. 19, n. 4, p. 982–996, 2019.

WHEELER, C. A.; CARDÉ, R. T. Following in Their Footprints: Cuticular Hydrocarbons as Overwintering Aggregation Site Markers in *Hippodamia convergens*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40, n. 5, p. 418–428, 1 maio 2014.

WHITE, G. F.; RUSSELL, N. J.; TIDSWELL, E. C. Bacterial scission of ether bonds. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 1, p. 216–232, mar. 1996.

WIGGLESWORTH, V. B. **The Principles of Insect Physiology**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.

WIJESUNDARA, D. P. The life-history and bionomics of *Chrysomya megacephala* (Fab.). **Ceylon Journal of Science**, v. 25, n. 3, p. 169–185, 1957.

WILLIAMS, H.; RICHARDSON, A. M. M. Growth energetics in relation to temperature for larvae of four species of necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae). **Australian Journal of Ecology**, v. 9, n. 2, p. 141–152, 1984.

WITHERS, P. C. **Comparative animal physiology**. [s.l.] Saunders College Pub. Philadelphia, 1992.

WOHLFAHRT, D.; WOOLF, M. S.; SINGH, B. A survey of bacteria associated with various life stages of primary colonizers: *Lucilia sericata* and *Phormia regina*. **Science & Justice**, v. 60, n. 2, p. 173–179, 1 mar. 2020.

WOLK, F. M. D. V. The typology and topography of the tarsal chemoreceptors of the blow flies *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy and *Phormia terranovae* Robineau-Desvoidy and the Housefly *Musca domestica* L. **Journal of Morphology**, v. 157, n. 2, p. 201–209, 1978.

WONG, Z. S. et al. Wolbachia-Mediated Antibacterial Protection and Immune Gene Regulation in *Drosophila*. **PLOS ONE**, v. 6, n. 9, p. e25430, 29 set. 2011.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. N. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 1992.

XU, H. et al. Oviposition deterrents in larval frass of the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): Chemical identification and electroantennography analysis. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 3, p. 320–326, 2006.

XU, H. et al. Age-dependent changes in cuticular hydrocarbons of larvae in *Aldrichina grahami* (Aldrich) (Diptera: Calliphoridae). **Forensic Science International**, v. 242, p. 236–241, 1 set. 2014.

YANG, D. et al. World Catalog of Empididae (Insecta: Diptera). Beijing: China Agricultural University Press. 599 pp. 2007.

YANG, S. et al. Bioconversion of Gibberellin Fermentation Residue into Feed Supplement and Organic Fertilizer Employing Housefly (*Musca domestica* L.) Assisted by *Corynebacterium variabile*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0110809, 20 maio 2015.

YE, G. et al. Cuticular hydrocarbon composition in pupal exuviae for taxonomic differentiation of six necrophagous flies. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 3, p. 450–456, 2007.

YE, Y. H. et al. Wolbachia-Associated Bacterial Protection in the Mosquito *Aedes aegypti*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2362, 8 ago. 2013.

YONG, H.-S. et al. Predominance of Wolbachia endosymbiont in the microbiota across life stages of *Bactrocera latifrons* (Insecta: Tephritidae). **Meta Gene**, v. 14, p. 6–11, 1 dez. 2017.

YOUNG, H. **The Immunoassay Kit Directory: Volume 1: Part 3 December 1995**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.

YUAN, Y. et al. Genome Sequence of a *Providencia stuartii* Strain Isolated from *Lucilia sericata* Salivary Glands. **Genome Announcements**, v. 5, n. 17, 27 abr. 2017.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 722–731, 2009.

ZHANG, X. G. et al. Oviposition Deterrents in Larval Frass of Potato Tuberworm Moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Neotropical entomology**, v. 48, n. 3, p. 496–502, 2019.

ZHOU, J.-J. et al. “Plus-C” odorant-binding protein genes in two *Drosophila* species and the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. **Gene**, v. 327, n. 1, p. 117–129, 18 fev. 2004.

- ZHU, G. H. et al. Development changes of cuticular hydrocarbons in *Chrysomya rufifacies* larvae: potential for determining larval age. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 20, n. 4, p. 438–444,
- ZHU, G. H. et al. Puparial case hydrocarbons of *Chrysomya megacephala* as an indicator of the postmortem interval. **Forensic Science International**, v. 169, n. 1, p. 1–5, 14 jun. 2007.
- ZHU, J. J. et al. Semiochemicals released from five bacteria identified from animal wounds infested by primary screwworms and their effects on fly behavioral activity. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 8 jun. 2017.
- ZUCOLOTO, F. S. Effects of flavour and nutritional value on diet selection by *Ceratitis capitata* larvae (Diptera, Tephritidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 37, n. 1, p. 21–25, 1991.
- ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. **Biological Reviews**, v. 90, n. 1, p. 89–111, 2015.
- ZUMPT, F. Myiasis in man and animals in the Old World. A textbook for physicians, veterinarians and zoologists. **Myiasis in Man and Animals in the Old World. A Textbook for Physicians, Veterinarians and Zoologists.**, 1965.
- ZUREK, L.; SCHAL, C.; WATSON, D. W. Diversity and Contribution of the Intestinal Bacterial Community to the Development of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) Larvae. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 6, p. 924–928, 1 nov. 2000.

A.1 APÊNDICE A – Introdução complementar

Cromatografia gasosa e espectrometria de massa

A cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM) é uma técnica analítica para identificar diferentes compostos de uma amostra. A CG é usada para separar os materiais voláteis e semivoláteis e termicamente estáveis em uma amostra, enquanto a EM fragmenta a substância a ser identificada com base na sua massa (CHAUHAN; GOYAL; CHAUHAN, 2014). A técnica tem como base a migração diferencial de compostos de uma amostra, esses compostos passam por uma coluna contendo uma fase estacionária e são levados para a fase móvel. A identificação e quantificação dos compostos é realizada através de seus espectros de massas e da intensidade dos sinais produzidos pelos fragmentos de ionização da molécula, respectivamente.

Como uma tecnologia única, o CG-EM oferece a oportunidade de realizar a análise de novos compostos, caracterizando-os e identificando-os, sendo eles sintetizados ou derivatizados. É amplamente utilizado em ciências básicas e aplicadas, como Química, Polímeros, Nanotecnologia e Biotecnologia, entre outras.

Extração de DNA

Para conhecer a comunidade bacteriana de uma amostra é necessário, em primeiro lugar, obter o DNA das bactérias presentes no local para depois identificá-las adequadamente. Existem inúmeros procedimentos adotados para a extração tanto de DNA como de RNA, que diferem para células animais, vegetais e bacterianas.

A parede celular das células procarióticas sempre se mostrou vantajosa para esses organismos, pois apresenta características como elasticidade, resistência a pressão, a altas temperaturas e a valores extremos de pH, porém isso pode dificultar na hora da extração do material genético (BEVERIDGE, 1999). Apesar de algumas diferenças, a parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é construída a partir do polímero peptídioglicano (mais espessa nas Gram-positivas), um composto de longos filamentos de glicanos, que com a ajuda de peptídeos elásticos, formam uma rede rígida e ao mesmo tempo maleável que protege a célula da lise (MATIAS et al., 2003; HUANG et al., 2008; ROSA, 2008).

No geral e resumidamente, o processo de extração segue as seguintes etapas: (1) ruptura da parede celular; (2) remoção das proteínas, pois durante a ruptura, todos os componentes que saem para o meio extracelular, a não ser moléculas de DNA, RNA e proteínas, são eliminados por meio da centrifugação; (3) precipitação do DNA e (4) degradação do RNA residual (CORDEIRO, 2003).

Kits de extração de DNA comerciais são utilizados para concluir essas etapas e conseguir um grau de pureza razoável do material genético para os processos subsequentes.

Eletroforese em gel de agarose e quantificação por espectrofotometria

Para confirmar que todas as extrações de DNA foram bem-sucedidas, as amostras obtidas nas extrações passaram pelo processo de eletroforese em gel e, em seguida, por um espectrofotômetro.

A eletroforese em gel é uma técnica molecular que permite a visualização do DNA pela separação de moléculas com base no seu tamanho através de um campo elétrico, nesse método, o DNA é aplicado em um gel formado por um polímero (agarose) e um tampão (solução química capaz de transmitir eletricidade e manter o pH constante), conectando esse sistema à uma corrente elétrica (HEPP e NONOHAY, 2016). O DNA é atraído para o polo positivo, migrando através do gel, e suas moléculas são separadas pelo tamanho, se as moléculas tiverem o mesmo tamanho, elas vão parar no mesmo lugar no gel e formam uma região denominada banda, visível por meio de corantes que se ligam ao DNA.

Ao detectar presença de DNA no gel de agarose, esse material é analisado no espectrofotômetro. A espectrofotometria é um método utilizado para a determinação da concentração de compostos presentes em uma solução, por meio da transmissão ou absorção de luz (ROCHA e TEIXEIRA, 2004; CAMPOS, 2014). O equipamento comumente utilizado para a função é o Nanodrop, pois requer volumes baixos de amostras (SILVA, 2014).

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Após a extração e quantificação do DNA, deve-se isolar e replicar o DNA alvo da pesquisa. A PCR permite a amplificação de um fragmento de DNA específico a partir de uma

amostra com material genético de várias origens. O objetivo da PCR, nas palavras de sua inventora, a Dra. Kary Mullis, é "permitir que você escolha o pedaço de DNA de interesse e consiga o máximo que quiser" (MULLIS, 1990). Cada ensaio de PCR requer a presença do DNA molde, *primers*, nucleotídeos e DNA polimerase. A DNA polimerase é a enzima chave que liga nucleotídeos individuais para formar o produto de PCR. Os nucleotídeos são as quatro bases — adenina, timina, citosina e guanina (A, T, C, G) — encontradas no DNA que atuam como os blocos de construção que são usados pela DNA polimerase para criar o produto de PCR resultante. Os *primers* na reação são fragmentos curtos de DNA com uma sequência definida complementar ao DNA alvo que deve ser detectado e amplificado, eles servem como um ponto de extensão para a DNA polimerase desenvolver (GARIBYAN e AVASHIA, 2013).

Os componentes mencionados acima são misturados em um tubo de ensaio e, em seguida, colocado no termociclador, que permite que ciclos repetidos de amplificação de DNA ocorram em três etapas básicas. Esse equipamento aumenta e diminui a temperatura da mistura em etapas discretas, precisas e pré-programadas (WEIER e GRAY, 1988). Os produtos de PCR resultantes também podem ser analisados e quantificados pelo gel de eletroforese e o Nanodrop.

Sequenciamento do DNA

Desde 1869, com a descoberta do DNA por Friedrich Meischer, e a descrição da dupla hélice em 1953, sente-se a necessidade de conhecer essa molécula tão relevante (SCHEID; FERRARI; DELIZOICOV, 2005). Isso levou à busca por técnicas que possibilitassem a leitura exata da sequência que determina as características dos seres vivos, surgindo o sequenciamento de DNA.

O primeiro método de sequenciamento desenvolvido foi o método Sanger há quase 40 anos, e em 2004 os métodos de sequenciamento de próxima geração (NGS) começaram a aparecer, essas novas técnicas aumentaram consideravelmente a quantidade de dados de sequenciamento produzidos e diminuíram muito os custos da geração de dados de sequenciamento, entre elas estão as plataformas 454 da Roche (desenvolvida em 2004), a plataforma Illumina (2006) e uma das mais recentes, a Qiagen GeneReader (2015) (MARDIS, 2017).

Essas plataformas geram sequências de DNA em arquivos, *os reads*, que precisam ser armazenados, analisados, agrupados e classificados taxonomicamente (espécie, gênero, família,

etc). O campo da bioinformática abrange esses processos, ele surgiu da necessidade de gerenciamento de quantidades maciças de dados resultantes de projetos de sequenciamento e também tem a função de alinhá-los aos bancos de dados (ANDRADE e SANDER, 1997; PERSSON, 2000).

Bioinformática

Durbano et al. (2006) afirmam que a Bioinformática usa ferramentas da computação para entender e resolver questões da Biologia Molecular e que tal disciplina está numa evolução exponencial, possuindo raízes nas Ciências da Computação, na Estatística e na Biologia Molecular.

A Bioinformática consiste, principalmente, na análise computacional de sequências de DNA, RNA e proteínas, foi desenvolvida com o objetivo de mapear as sequências genéticas para que os biólogos moleculares consigam utilizar métodos estatísticos capazes de analisar grandes quantidades de dados biológicos, demonstrando funções de genes, relações entre genes e proteínas e identificando organismos, ajudando basicamente a comparar, verificar e compreender o significado dos dados obtidos. Por ser uma ciência recente, a Bioinformática ainda não possui uma definição precisa, o que faz com que lhe seja dada a tarefa de organizar e analisar dados incrivelmente complexos resultantes de modernas técnicas de Biologia Molecular e Bioquímica, sendo, portanto, uma área interdisciplinar que absorve e faz a interação entre a Ciência da computação, Matemática, Biologia, Física e Medicina (ALVES, 2013).

Entre as ferramentas mais amplamente utilizadas para análises de dados de sequenciamento de genes 16S rRNA estão a QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPORASO et al., 2010), Mothur (SCHLOSS et al., 2009) e o MG-RAST (Metagenomics - Rapid Annotation using Subsystems Technology) (MEYER et al., 2008), que vão, principalmente, agrupar os *reads* por semelhança de sequências e, alinhar tais leituras contra sequências de referência encontradas nos bancos de dados. Os bancos utilizados nesta pesquisa foram o SILVA (YILMAZ et al., 2014), Greengene (MCDONALD et al., 2012) e RDP (WANG et al., 2007). A base de dados SILVA contém informações taxonômicas para os domínios Bacteria, Archaea e Eukarya, é baseado principalmente em filogenias para rRNAs de subunidades pequenas (16S para procariontes e 18S para Eucariotos). As informações de classificação taxonômica para Archaea e Bacteria são obtidas a partir do guia “Bergey’s

Taxonomic Outlines” (BOONE et al., 2001; BRENNER et al., 2005; VOS et al., 2009; KRIEG et al., 2010) e a “List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature” (LPSN) (PARTE, 2014). As atribuições de classificação taxonômica no banco de dados SILVA são curadas manualmente (YILMAZ et al., 2014). A taxonomia de Greengenes (MACDONALD et al., 2014) é dedicada a Bacteria e Archaea. A árvore filogenética é construída a partir de sequências de 16S rRNA obtidas de bancos de dados públicos e que passaram por uma filtragem de qualidade. As sequências são alinhadas por seus caracteres e estrutura secundária e submetidas à construção da árvore com o FastTree (PRICE et al., 2009). Os nós internos são automaticamente atribuídos às classificações taxonômicas do NCBI suplementadas com a versão anterior da taxonomia de Greengenes e CyanoDB (KOMÁREC, 2010). A base de dados RDP (COLE et al., 2014) é baseada em sequências de 16S rRNA de Bacteria, Archaea e Fungi (Eukarya). Ele contém sequências de 16S rRNA disponíveis nas bases de dados da “International Nucleotide Sequence Database Collaboration” (INSDC) (COCHRANE et al., 2016). Os nomes dos organismos associados às sequências são obtidos através de um semelhante publicado recentemente no “Bacterial Nomenclature Up-to-Date”. As informações sobre a classificação taxonômica para Bactérias e Archaea são baseadas nos roteiros taxonômicos da “Bergey’s Trust” e LPSN.

B.1 APÊNDICE B – Resultados complementares

Extração de DNA

Para confirmar que todas as extrações de DNA foram bem-sucedidas (detalhadas em Material e Método), as amostras obtidas nas extrações passaram pelo processo de eletroforese em gel e, em seguida, alíquotas de 1 µl de cada amostra foram levadas a um espectrofotômetro NanoDrop Synergy H1, da Biotek (Tabela B1).

Tabela B1 Resultados do NanoDrop. Concentração de DNA de todas as amostras em ng/ μ l

Repetição	Concentração de DNA (ng/ μ l)					
	<i>C. megacephala</i>			<i>C. albiceps</i>		
	ovário	ovo	substrato	ovário	ovo	substrato
1	40	1,017	35	63	0,6	41
2	50	6	30,4	49	10,2	25,8
3	48	2	18,9	45	15	33
4	Ø	0,6	Ø	Ø	2,5	Ø
5	Ø	2,4	Ø	Ø	18	Ø

Um dos objetivos da pesquisa foi descrever a comunidade bacteriana dos ovários e da superfície dos ovos das espécies em questão. Apesar das extrações mencionadas acima focarem apenas nos micro-organismos, elas podem extrair material genético de todos os organismos presentes na amostra, podendo conter DNA das moscas-varejeiras, das bactérias, de fungos e até mesmo de mamífero (no caso da extração dos substratos), porém o foco da pesquisa foi relacionado às bactérias, portanto deve-se isolar apenas o material genético bacteriano, e é por esse motivo que a PCR é realizada (Tabela B2). É na PCR que agem os *primers*, eles possuem uma sequência de nucleotídeos complementar à fita alvo, fazendo com que se liguem apenas em uma região específica da molécula de DNA, que no caso, foram as regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA (regiões hipervariadas que auxiliam nos estudos de taxonomia) (ZHANG et al., 2018). Os *primers* utilizados foram: 27F(A): AGAGTTTGATC A TGGCTCAG; 27F(C): AGAGTTTGATC C TGGCTCAG; 1492R(T): TACGG T TACCTTGTTACGACTT; 1492R(C): TACGG C TACCTTGTTACGACTT.

Três motivos principais fazem desse gene uma região tão importante: (1) sua presença em quase todas as bactérias; (2) a função do gene 16S rRNA ao longo do tempo não mudou, sugerindo que alterações aleatórias na sequência podem ser uma medida mais precisa de tempo (evolução); e (3) o gene 16S rRNA (1.500 pares de base) é grande o suficiente para ser analisado com ferramentas computacionais (JANDA e ABBOTT, 2007). Portanto, amplificar o material genético das extrações utilizando os *primers* específicos da região V3 e V4 do gene 16S rRNA pela reação de PCR é a confirmação de que as extrações de DNA contêm material genético bacteriano e que eles, agora, estão isolados para sequenciamento.

Tabela B2 Protocolo utilizado para realização da PCR.

Ciclo PCR			
Processo	Tempo (s)	Temperatura (°C)	Repetições
Desnaturação inicial	300	94	1 vez
Desnaturação	40	94	35 vezes
Anelamento	60	60	
Extensão	120	72	
Extensão final	600	72	1 vez

Após a PCR, realizada com um termociclador Bio Rad modelo T100, todas as amostras passaram novamente pela eletroforese em gel (Figuras B1', B2' e B3') e, em seguida, pelo NanoDrop (Tabela B3).

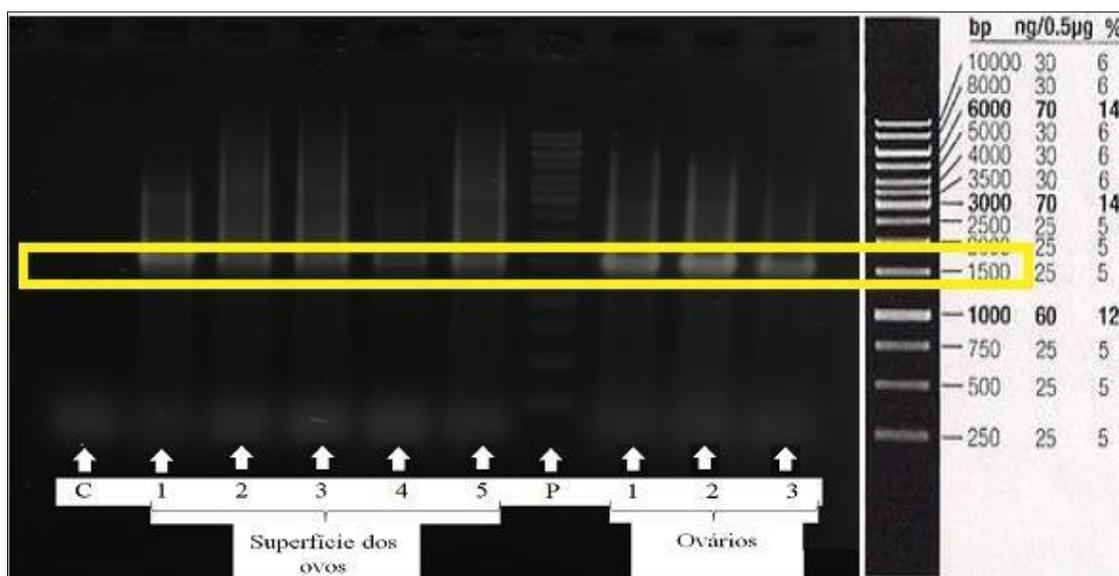


Figura B1' Imagem do gel dos produtos de PCR das repetições da superfície dos ovos e dos ovários de *C. megacephala*; C - Controle negativo (água); P - Padrão, marcador ou *ladder* (destacado à direita). O retângulo amarelo indica a região de 1.500 pares de base (regiões V3 e V4 do 16S rRNA).

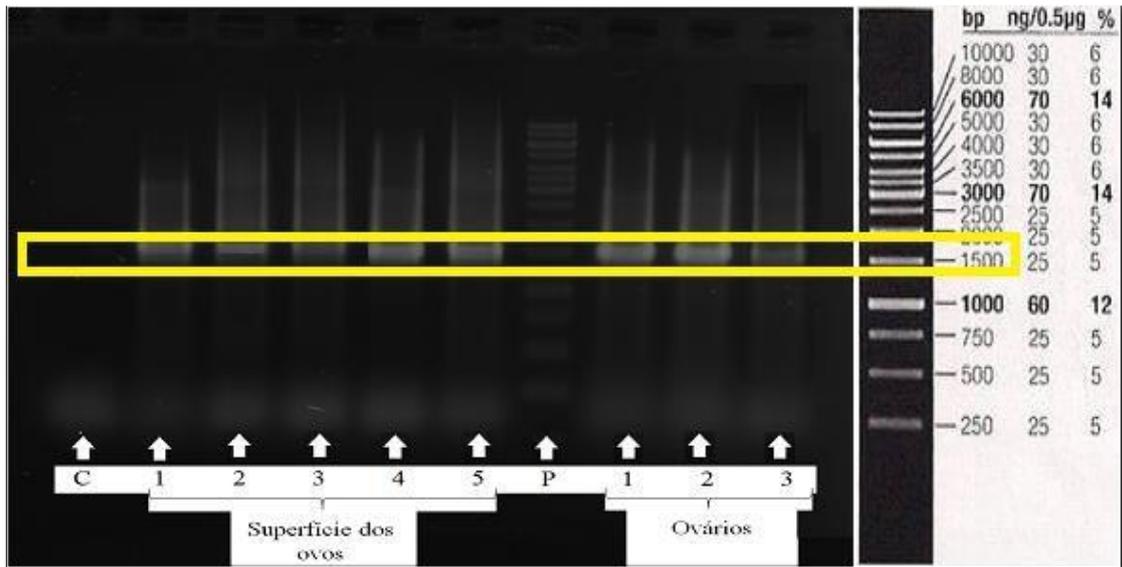


Figura B2' Imagem do gel dos produtos de PCR das repetições da superfície dos ovos e dos ovários de *C. albiceps*; C - Controle negativo (água); P - Padrão, marcador ou ladder (destacado à direita). O retângulo amarelo indica a região de 1.500 pares de base (regiões V3 e V4 do 16S rRNA).

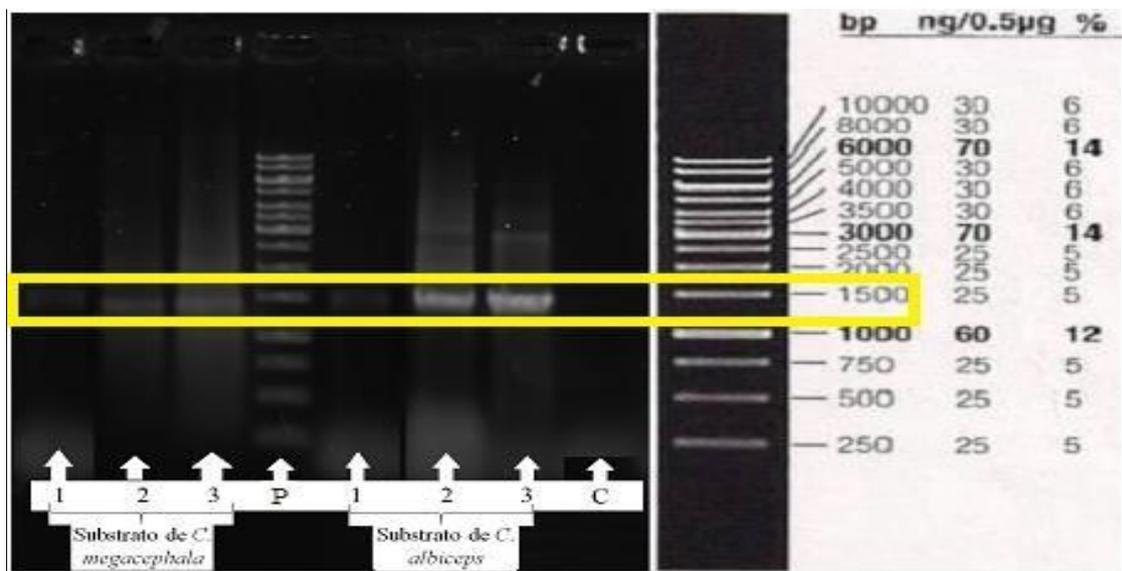


Figura B3' Gel dos produtos de PCR das repetições dos substratos de *C. megacephala* e *C. albiceps*; C - Controle negativo (água); P - Padrão, marcador ou ladder (destacado à direita). O retângulo amarelo indica a região de 1500 pares de base (regiões V3 e V4 do 16S rRNA)

Tabela B3 Concentração de DNA dos produtos de PCR de todas as amostras.

Repetição	PCR - Concentração de DNA (ng/μl)					
	<i>C. megacephala</i>			<i>C. albiceps</i>		
	ovário	ovo	substrato	ovário	ovo	substrato
1	648	565	610	416	347	549
2	434	406	751	425	412	471
3	560	519	702	694	355	332
4	Ø	406	Ø	Ø	604	Ø
5	Ø	488	Ø	Ø	536	Ø

Após quantificação de todas as amostras e confirmação de DNA bacteriano nos produtos de PCR, as extrações iniciais (Tabela B1) foram enviadas e sequenciadas como serviço de terceiro na empresa MacroGen Inc. (Coreia do Sul), onde houve a construção de bibliotecas de amplicon das regiões V3-V4 do gene 16S rRNA, seguido de sequenciamento na plataforma MiSeq Illumina (paired-end 2x 300pb). Para o processo, a MacroGen fez seus próprios produtos de PCR (motivo pelo qual foram enviadas as extrações iniciais e não os produtos de PCR) utilizando os *primers* Bakt_341F: CCTACGGGNGGCWGCAG e Bakt_805R: GACTACHVGGGTATCTAATCC, que também têm como alvo as regiões V3 e V4 do gene 16S rRNA.

Cada repetição das extrações iniciais foi misturada até atingir 50 μl total de volume, ou seja, foram enviados para sequenciamento 50 μl de uma solução de ovário (composta por uma alíquota de 16,5 μl das repetições 1, 2 e 3), 50 μl de uma solução da superfície dos ovos (composta por uma alíquota de 10 μl das repetições 1, 2, 3, 4 e 5) e 50 μl de uma solução de substrato (composta por uma alíquota de 16,5 μl das repetições 1, 2 e 3) para cada espécie. A concentração final de DNA de cada solução deveria ser maior do que 0,1 ng/μl para maiores chances de um sequenciamento bem-sucedido (Tabela B4).

Tabela B4 Concentração das amostras enviadas para a MacroGen Inc., cada amostra tinha um volume total de 50 μl.

Concentração de DNA (ng/μl)					
<i>C. megacephala</i>			<i>C. albiceps</i>		
Amostra ovário	Amostra ovo	Amostra substrato	Amostra ovário	Amostra ovo	Amostra substrato
45,5	1,8	27,8	51,8	9,26	32,9

Comunidade bacteriana dos substratos de *C. megacephala* e *C. albiceps*

Durante o processamento das amostras dos substratos de *C. megacephala* e *C. albiceps* não foram encontradas bases estranhas nem adaptadores, a amostra estava limpa. As métricas estão apresentadas na tabela B5.

Tabela B5 Métricas do processamento das sequências obtidas.

Amostra	Substrato de <i>C. albiceps</i>	Substrato de <i>C. megacephala</i>
Número total de <i>reads</i>	91.245	112.609
Tamanho dos <i>reads</i>	224,55	219,11
Conteúdo GC (%)	52,56	52,52
Número de <i>reads</i> classificados	91.182/99,93%	112.521/99,92%

No substrato de *C. megacephala* foram encontradas 293 espécies de bactérias (Figura B4').

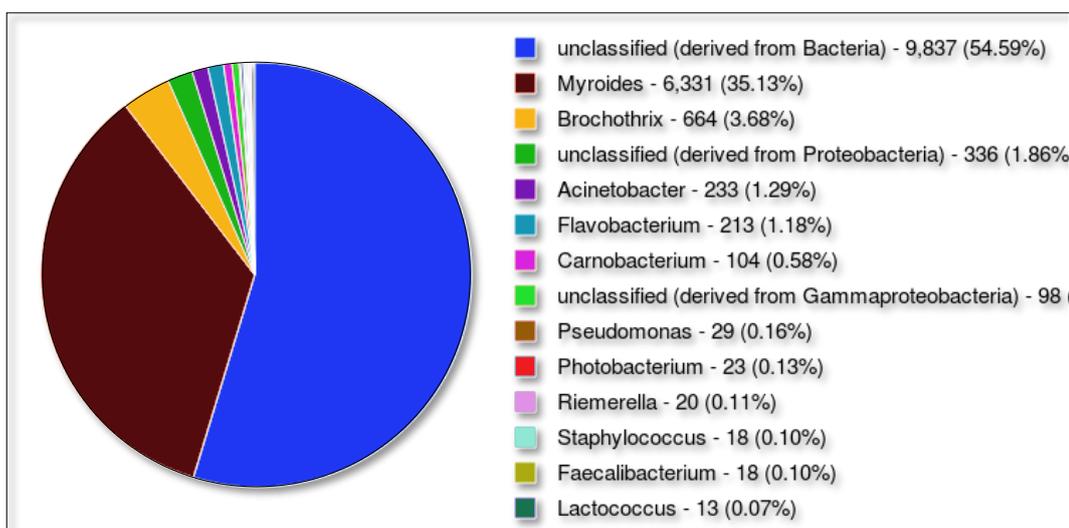


Figura B4' Valores e porcentagens das sequências encontradas para os gêneros bacterianos mais abundantes no substrato de *Chrysomya megacephala*.

Entre as 293 espécies, 14 são abundantes no substrato de *C. megacephala* (Tabela B6).

Tabela B6 Espécies mais abundantes no substrato de *Chrysomya megacephala* de acordo com os valores de sequências encontradas.

Filo	Espécie	n.º de sequências
Proteobacteria	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	250
Bacteroidetes	<i>Myroides sp. ZB35</i>	1359
Proteobacteria	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	999
Proteobacteria	<i>Photobacterium profundum</i>	56392
Proteobacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3014
Proteobacteria	<i>Photobacterium gaetbulicola</i>	2151
Proteobacteria	<i>Acinetobacter ursingii</i>	3163
Firmicutes	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	474
Proteobacteria	<i>Photobacterium gaetbulicola Gung47</i>	2151
Proteobacteria	<i>Myroides odoratimimus</i>	5820
Proteobacteria	<i>Pseudomonas sp. 11K1</i>	404
Proteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	5865
Proteobacteria	<i>Acinetobacter defluvii</i>	1686
Proteobacteria	<i>Photobacterium profundum SS9</i>	56392

No substrato de *C. albiceps* foram encontradas 223 espécies de bactérias (Figura B5').

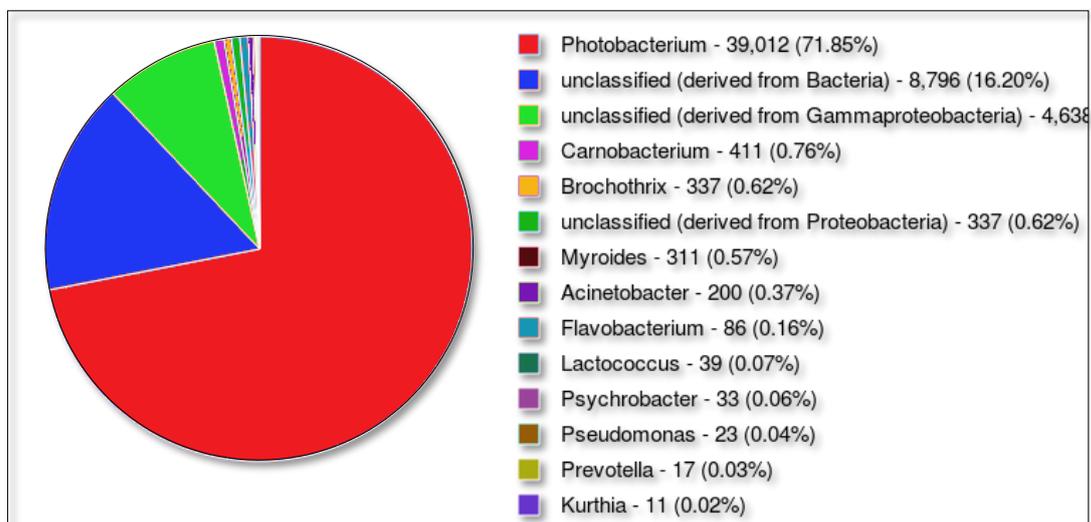


Figura B5' Valores e porcentagens das sequências encontradas para os gêneros bacterianos mais abundantes no substrato de *Chrysomya albiceps*.

Nota-se que as mesmas 14 espécies abundantes de *C. albiceps* foram exatamente iguais às encontradas para *C. megacephala*, porém em quantidades diferentes (Tabela B7).

Tabela B7 Espécies mais abundantes no substrato de *Chrysomya albiceps* de acordo com os valores de seqüências encontradas.

Filo	Espécie	n.º de seqüências
Proteobacteria	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	205
Bacteroidetes	<i>Myroides sp. ZB35</i>	875
Proteobacteria	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	857
Proteobacteria	<i>Photobacterium profundum</i>	46351
Proteobacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2412
Proteobacteria	<i>Photobacterium gaetbulicola</i>	1927
Proteobacteria	<i>Acinetobacter ursingii</i>	2390
Firmicutes	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	265
Proteobacteria	<i>Photobacterium gaetbulicola Gung47</i>	1927
Proteobacteria	<i>Myroides odoratimimus</i>	4546
Proteobacteria	<i>Pseudomonas sp. 11K1</i>	402
Proteobacteria	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	4546
Proteobacteria	<i>Acinetobacter defluvii</i>	1518
Proteobacteria	<i>Photobacterium profundum SS9</i>	46351

Abaixo (Figuras B6' e B7') estão as curvas de rarefação dos substratos.

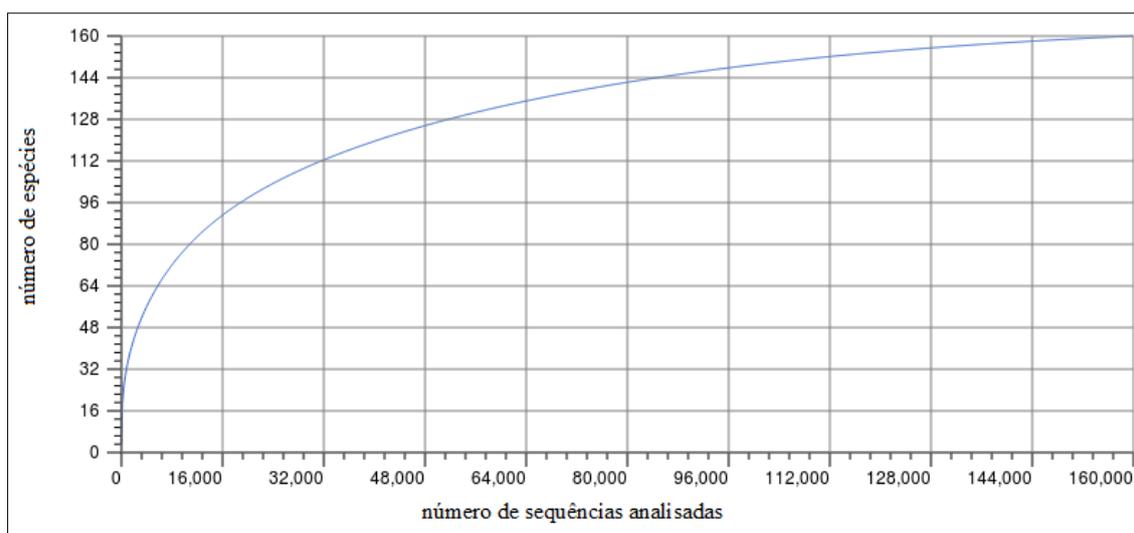


Figura B6' Curva de rarefação para as seqüências encontradas no substrato de *Chrysomya megacephala*.

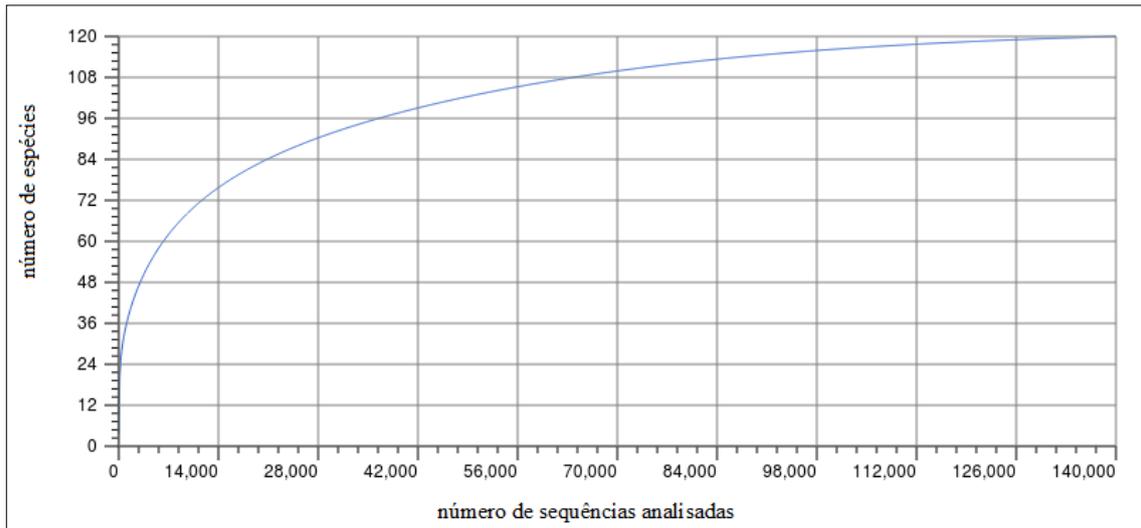


Figura B7' Curva de rarefação para as sequências encontradas no substrato de *Chrysomya albiceps*.

Análises dos extratos em hexano

O cromatograma da figura B-8' é referente aos resultados encontrados na análise apenas do hexano (branco) utilizado para coletar os extratos que foram aplicados nos bioensaios, a grande quantidade de picos indica a grande variedade de contaminantes, tendo em vista que apenas o hexano (o primeiro pico) deveria estar presente.

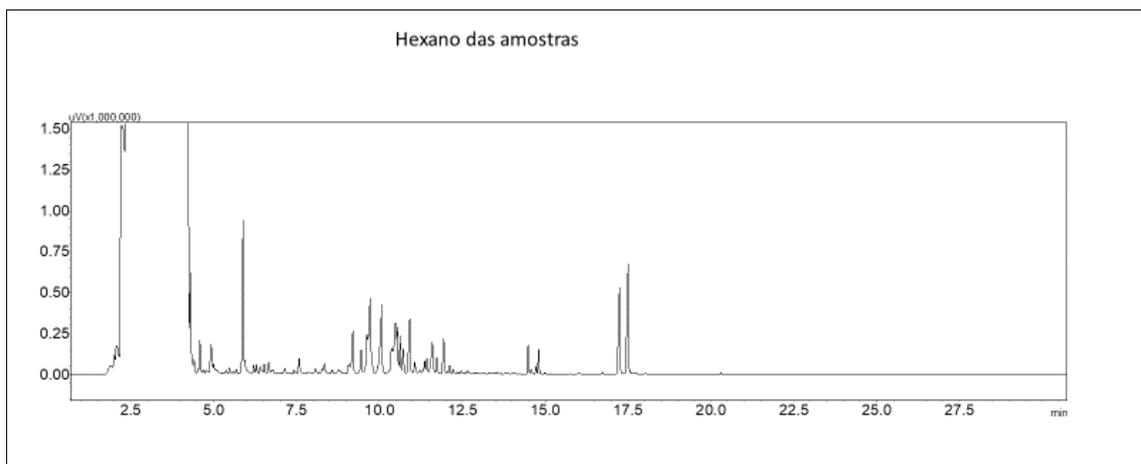


Figura B8' Cromatograma do hexano utilizado nos bioensaios. O eixo "x" é o tempo de retenção e o "y" é a intensidade do sinal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – APÊNDICE A

- ALVES, S. M. A bioinformática e sua importância para a biologia molecular. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, v. 3, n. 4, p. 18-25, 2013.
- ANDRADE, M. A.; SANDER, C. Bioinformatics: from genome data to biological knowledge. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 675–683, 1997.
- BEVERIDGE, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725–4733, 15 ago. 1999.
- BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M.; STANLEY, J.T., (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. New York: **Springer-Verlag**. 2001.
- BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; GARRITY, G.M.; STALEY, J.T., (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria*, 2nd edn. US: **Springer-Verlag**. 2005.
- CAMPOS, T. DE O. Espectrofotometria e análise de imagens: correlação entre métodos aplicados a quantificação de DNA. 21 nov. 2014.
- CHAUHAN, A.; GOYAL, M. K.; CHAUHAN, P. GC-MS technique and its analytical applications in science and technology. **J. Anal. Bioanal. Tech**, v. 5, n. 6, p. 222, 2014.
- CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, maio 2010.
- COCHRANE, G.; KARSCH-MIZRACHI, I.; TAKAGI, T. International Nucleotide Sequence Database Collaboration. The international nucleotide sequence database collaboration. **Nucleic Acids Res.**; 44(Database issue):48–50, 2016.
- COLE, J.R.; WANG, Q.; FISH, J.A.; CHAI, B.; MCGARRELL, D.M.; SUN, Y.; BROWN, C.T.; PORRAS-ALFARO, A.; KUSKE, C.R.; TIEDJE, J.M. Ribosomal database project: data and tools for high throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Res.**; 42(Database issue):633–42, 2014.
- CORDEIRO, M. C. R. Engenharia genética: conceitos básicos, ferramentas e aplicações. 2003.
- DURBANO, J. P. M. [et al.]. **Bioinformática na extensão universitária**: Uma abordagem prática. João Pessoa: UFPB, 2006.
- GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 3, p. e6, mar. 2013.
- HEPP, D.; NONOHAY, J. S. A importância das técnicas e análises de DNA. **Scientia**, 2016.
- HUANG, K. C. et al. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 49, p. 19282–19287, 2008.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2761–2764, 2007.

KRIEG, N.R.; STALEY, J.T.; BROWN, D.R.; HEDLUND, B.P.; PASTER, B.J.; WARD, N.L.; LUDWIG, W.; WHITMAN, W.B. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*, 2nd edn. New York: **Springer-Verlag**; 2010.

KOMAREK, J.; HAUER, T. Cyanodb.cz – On-line database of cyanobacterial genera. – Word-wide electronic publication. <http://www.cyanodb.cz>, **Univ. of South Bohemia & Inst. of Botany AS CR**, 2010.

MARDIS, E. R. DNA sequencing technologies: 2006–2016. **Nature Protocols**, v. 12, n. 2, p. 213–218, fev. 2017.

MATIAS, V. R. F. et al. Cryo-Transmission Electron Microscopy of Frozen-Hydrated Sections of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 20, p. 6112–6118, 15 out. 2003.

MCDONALD, D.; PRICE, M.N.; GOODRICH, J.; NAWROCKI, E.P.; DESANTIS, T.Z.; PROBST, A.; ANDERSEN, G.L.; KNIGHT, R.; HUGENHOLTZ, P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. **The ISME Journal**, v. 6, n. 3, p. 610–618, mar. 2012.

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 386, 19 set. 2008.

MULLIS, K. B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.

PARTE, A.C. LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Res.** ;42(Database issue):613–6, 2014

PERSSON, B. Bioinformatics in protein analysis. In: **Proteomics in Functional Genomics**. [s.l.] Springer, 2000. p. 215–231.

PRICE, M.N.; DEHAL, P.S.; ARKIN, A.P. Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. **Mol Biol Evol.**; 26(7):1641–50, 2009.

ROCHA, F. R.; TEIXEIRA, L. S. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, v. 27, p. 807–812, 2004.

ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 259–261, set. 2008.

SCHEID, N. M. J.; FERRARI, N.; DELIZOICOV, D. A construção coletiva do conhecimento científico sobre a estrutura do DNA. **Ciênc. educ.(Bauru)**, p. 223–233, 2005.

SCHLOSS, P. D. et al. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 1 dez. 2009.

SILVA, V. G. **Implementação de um método de validação do controlo de qualidade em amostras de DNA armazenadas no Biobanco-IMM**. PhD Thesis—[s.l.] Escola Superior de Saúde Egas Moniz, 2014.

VOS, P.D.; GARRITY, G.M.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H.; WHITMAN, W.B. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 3: The Firmicutes, 2nd edn. New York: **Springer-Verlag**. 2009.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 15 ago. 2007.

WEIER, H. U.; GRAY, J. W. A Programmable System to Perform the Polymerase Chain Reaction. **DNA**, v. 7, n. 6, p. 441–447, 1 jul. 1988.

YILMAZ, P. et al. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D643–D648, 1 jan. 2014.

ZHANG, J. et al. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake. **Science of The Total Environment**, v. 618, p. 1254–1267, 15 mar. 2018.