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

Processos Auto-Organizados: Efeitos de substâncias químicas que agem no sistema nervoso sobre o desenvolvimento e padrão de dispersão larval pós-alimentar de dípteros (Calliphoridae e Muscidae).

Guilherme Gomes

The bottom half of the page features a large, abstract geometric background composed of overlapping triangles in various shades of blue and white, creating a dynamic, crystalline pattern.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração - Zoologia) .

Processos Auto-Organizados: Efeitos de substâncias químicas que agem no sistema nervoso sobre o desenvolvimento e padrão de dispersão larval pós-alimentar de dípteros (Calliphoridae e Muscidae).

GUILHERME GOMES

Orientador: Prof. Dr. CLAUDIO JOSÉ VON ZUBEN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração - Zoologia).

Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Julho de 2006

595.77 Gomes, Guilherme

G633p Processos auto-organizados: efeito de substâncias químicas que agem no sistema nervoso sobre o desenvolvimento e padrão de dispersão larval pós-alimentar de dípteros (Calliphoridae e Muscidae) / Guilherme Gomes. – Rio Claro : [s.n.], 2006

202 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Claudio José Von Zuben

1. Díptero. 2. Inseto. 3. Entomologia forense. 4. Controle de pragas. 5. Moscas. 6. Sistema nervoso. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI – Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico a minha família, principalmente aos meus pais.

"A maior e mais valiosa herança que deixarei a você é a educação....." (meus pais)

AGRADECIMENTOS

Existem pessoas que nos falam e nem as escutamos, há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam, mas há pessoas que, simplesmente, aparecem em nossa vida e que marcam para sempre (Cecília Meireles), são estas as pessoas que fizeram e hoje fazem parte da minha vida, e é uma alegria e prazer para mim, diante da vastidão do espaço e da intensidade do tempo, partilhar este planeta e esta época com vocês (Carl Sagan).

Agradeço todos que acompanharam o desenvolvimento deste trabalho, principalmente, ao meu orientador Cláudio José Von Zuben, e eterno conselheiro, pelo exemplo de honestidade e eterna sabedoria o qual me aturou por esses anos com minhas dificuldades, dúvidas e incertezas, mas, sempre soube o que e como falar, pela compreensão, pela atenção, pelo apoio e pela amizade; aos pesquisadores colegas do laboratório, pelas madrugadas no laboratório, momentos estes inesquecíveis (Helena, Jordan, Rodrigo, Rodolfo, André, Cássio, Gustavo e Marcela), aos funcionários do Departamento de Zoologia (Fernando, Cinara e Cris) e do Jacarezário (Eliseu e Marcelo), pelo eterno auxílio na minha pesquisa.

Agradeço à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de Mestrado, processo 04/12912-5 e pelos equipamentos obtidos através do processo 98/09939-6, modalidade Jovem Pesquisador (JP) do Prof. Dr. Cláudio José Von Zuben. Ao CNPq, pelos 6 meses de bolsa no início dos trabalhos.

Aos Prof. Dr. Arício Xavier Linhares, Fernando José Von Zuben e Marco Aparecido Pizano pela colaboração e sugestões no desenvolvimento dessa dissertação.

Assim como disse Fernando Pessoa: “O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.” Assim, agradeço à **todos** amigos pela agradável convivência e ajuda neste momento da minha vida, e principalmente os que estavam mais próximos (Lye Otani, André Sunao, Ivan C. Desuó, Vanessa Oliveira e outros já citados e que possa ter esquecido), mesmo aos distantes, os quais sinto muita saudade. Ao Prof. Dr. Augusto Shinya Abe pelas conversas durante o desenvolvimento do trabalho, e durante os poucos intervalos de diversão, porém inesquecíveis no Jacarezário, ao Prof. Dr. Edilberto Giannotti, pelas conversas no Departamento de Zoologia, e a todos professores deste Departamento.

Por último, mas, a quem eu realmente dedico e agradeço pela minha vida, minha família - aos meus irmãos Biel (Gabriel) e Leo (Leonardo), o qual é amigo de pesquisa também pelos conselhos e ajuda no desenvolver do trabalho e à **MEUS PAIS (Antonio e Ivete)** que sem dúvida nenhuma me deram e me ensinaram que o maior legado e tesouro de uma pessoa é o estudo, ou seja, a educação.

Eternamente agradecido, obrigado!

ÍNDICE

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E METODOLOGIA GERAL	
Resumo	4
Introdução geral	5
Objetivo	12
Material e Métodos	13
Referências Bibliográficas	21
 CAPÍTULO 2: Efeito de Diazepam no desenvolvimento larval de <i>Chrysomya. megacephala</i> (F.) (Diptera: Calliphoridae)	
Resumo	31
Introdução	32
Material e Método	34
Resultados e Discussão	37
Conclusões	46
Referências Bibliográficas	46
 CAPÍTULO 3: Efeito de Diazepam no desenvolvimento larval de <i>Musca domestica</i> (L.) (Diptera: Muscidae)	
Resumo	52
Introdução	53
Material e Método	55
Resultados e Discussão	58
Conclusões	65
Referências Bibliográficas	65
 CAPÍTULO 4: Efeito do Diazepam na dispersão larval pós-alimentar de <i>Chrysomya megacephala</i> (F.) (Diptera: Calliphoridae).	
Resumo	70
Introdução	71
Material e Método	73
Resultados e Discussão	77
Conclusões	95
Referências Bibliográficas	96
 CAPÍTULO 5: Efeito do Diazepam na dispersão larval pós-alimentar de <i>Musca domestica</i> (Diptera: Muscidae)	
Resumo	102
Introdução	103
Material e Método	105
Resultados e Discussão	109
Conclusões	121
Referências Bibliográficas	122
 CAPÍTULO 6: Efeito do Fipronil na dispersão pós-alimentar larval de <i>Chrysomya megacephala</i> (Diptera: Calliphoridae).	
Resumo	127
Introdução	128
Material e Método	130

Resultados e Discussão	134
Conclusões	148
Referências Bibliográficas	148

CAPÍTULO 7: Efeito do Fipronil na dispersão pós-alimentar larval de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae)

Resumo	154
Introdução	155
Material e Método	157
Resultados e Discussão	161
Conclusões	172
Referências Bibliográficas	173

CAPÍTULO 8: Análise da variação da umidade nas arenas de dispersão

Análise da variação da umidade nas arenas de dispersão	178
Referências Bibliográficas	182

CAPÍTULO 9: Discussão e considerações finais

Discussão e considerações finais	183
Conclusões	187
Referências Bibliográficas	188

LITERATURA CITADA	191
--------------------------------	------------

RESUMO

A ordem Diptera desperta grande interesse nos estudos científicos devido à importância agrícola, sanitária, veterinária e forense, dependendo da espécie em estudo. A espécie *Chrysomya megacephala* (Fabricius) foi introduzida há cerca de 30 anos no Brasil e é de considerável importância médico-sanitária, além de poder ser utilizada em estudos forenses, na estimativa de intervalo pós-morte (IPM) em humanos. A espécie *Musca domestica* (Linnaeus) tem distribuição cosmopolita e é bastante comum no ambiente urbano e pode também transportar formas infectantes de muitas doenças. Nessas moscas, após o desenvolvimento dos imaturos em substratos discretos e efêmeros, as larvas abandonam o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação, processo chamado de dispersão larval pós-alimentar. No entanto, em ambiente natural, tanto a fonte alimentar como o substrato de pupação podem estar contaminados com substâncias químicas, sendo que algumas destas podem ser de interesse forense ou ser aplicadas no controle de pragas. Assim, o principal objetivo do presente trabalho é procurar dar contribuição a um melhor conhecimento dos efeitos do ansiolítico Diazepam [Diazepam NQ[®] 10mg] sobre o desenvolvimento larval e comportamento de dispersão larval e do inseticida Fipronil [Regent 800 WG[®]] sobre a dispersão pós-alimentar das larvas de duas espécies de moscas (*C. megacephala* e *M. domestica*). Na análise do desenvolvimento larval, pôde-se observar que a presença de Diazepam no substrato alimentar aumenta o tempo de desenvolvimento larval, retardando o ganho de massa por tempo nas duas espécies estudadas, quando se compara ao grupo controle. Já o comportamento de dispersão larval foi alterado na presença de Fipronil ou de Diazepam, em relação ao controle, sendo que a profundidade de enterramento e a distância das pupas do centro de irradiação foram menores que quando comparado à arena controle para ambas as espécies, com algumas exceções nas arenas tratadas com o inseticida. Tais variações no desenvolvimento e na dispersão foram provavelmente causadas por mudanças metabólicas, sensoriais e motoras nos imaturos, em virtude das drogas utilizadas.

Palavras chave: Moscas-varejeiras, mosca doméstica, Entomologia Forense, Controle de pragas, Dispersão larval e desenvolvimento larval.

ABSTRACT

Some species of Diptera have a great medical and veterinary importance, acting as vectors of many diseases, addition of having a considerable agricultural, commercial and ecological importance and other ones having forensic importance. Flies utilize discrete and ephemeral breeding sites for larval nutrition. After the exhaustion of food, larvae begin dispersing in search of sites to pupate or to additional food sources, a process referred as post feeding larval dispersal. However, in natural environments these breeding or feeding sites can be contaminated with chemical substances. Some of these substances can be of forensic interest or be applied in pest control. In the present study, the main objective was to investigate the effect of Diazepam[®] [Diazepam NQ[®] 10mg] and Fipronil[®] [Regent 800 WG[®]] on immature stages of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). The larvae were reared on artificial diet and rabbit liver on which different dosages of Diazepam were administrated in order to study the effects of this drug on the development and post feeding larval dispersal of the two species. Different dosages of the insecticide Fipronil were disposed in circular arena used as pupation substrate to investigate the effects on post feeding larval dispersal. The results showed that time required for larval development were significantly longer in colonies fed in contact with Diazepam than in the control ones, delaying the increase of mass per unit time in the two studied species. The larval dispersal behavior was modified in the presence of Fipronil and Diazepam, in comparison to arenas without the drugs. It was also observed that the burial depth and distance of the irradiation center were shorter than in the control groups for the two species, with some exceptions occurring in the insecticide arena. Such variations in the development and dispersion probably were caused by changes in metabolic, sensorial and motor processes in the immature stages, caused by the drugs. These important results can be of use in forensic entomology and in pest control.

Key words. Blowfly, House fly, Forensic Entomology, Pest control, Post-feeding Larval Dispersal, Larval Development.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO E METODOLOGIA GERAL

Resumo.

Chrysomya megacephala (Fabricius) foi introduzida há cerca de 30 anos no Brasil e é de considerável importância médico-sanitária, além de poder ser utilizada em estudos forenses, na estimativa de intervalo pós-morte (IPM) em humanos. A espécie *Musca domestica* (Linnaeus) tem distribuição cosmopolita e é bastante comum no ambiente urbano e pode também transportar formas infectantes de muitas doenças. Nessas moscas, o estágio larval é o principal período em que ocorre competição por recursos alimentares. Após a exaustão destes recursos, as larvas abandonam o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação, processo chamado de dispersão larval pós-alimentar. No entanto, em ambiente natural, tanto o alimento para as larvas como o substrato de pupação podem estar contaminados com substâncias químicas, sendo que algumas destas podem ser de interesse forense ou ser aplicadas no controle de pragas. O principal objetivo do presente projeto é procurar dar contribuição a um melhor conhecimento de efeitos de substâncias químicas que atuem no sistema nervoso, sobre o tempo de desenvolvimento e o processo de dispersão pós-alimentar das larvas nestas duas espécies, envolvendo a investigação da distância percorrida e profundidade atingida pelas mesmas para empupar. Serão utilizadas simulações computacionais para melhor interpretação dos dados e que reflitam adequadamente esse processo de dispersão larval, frente às diferentes dosagens e substâncias químicas que serão utilizadas.

Introdução geral

Importância do estudo com Diptera

Os dípteros em geral despertam grande interesse nos estudos científicos devido ao grande número de espécies descritas, fácil manutenção sob condições experimentais, rápida produção de grande número de descendentes, importância agrícola por causarem danos econômicos à agricultura, e interesse como vetores de doenças tendo, desta forma, importância médico/veterinária (MARCONDES, 2001; PESSOA & MARTINS, 1988; STONEHOUSE *et al.*, 2004).

As moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) têm grande importância médico-sanitária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (FURLANETTO *et al.* 1984), podendo causar miíases nos animais e em humanos (GUIMARÃES *et al.*, 1983; ZUMPT, 1965), além de serem de fundamental importância em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (GOMES *et al.*, 2003; VON ZUBEN *et al.*, 1996; WELLS & GREENBERG, 1992).

Três espécies do gênero *Chrysomya* originárias do Velho Mundo e Australásia foram introduzidas no continente sul americano provavelmente por meio de navios (GUIMARÃES *et al.*, 1978, 1979). Em 1975, *C. megacephala* (Fabricius), *C. albiceps* (Wiedemann) e *C. putoria* (Wiedemann), foram descobertas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (GUIMARÃES *et al.*, 1978; IMBIRIBA *et al.*, 1977).

Dentre estas espécies, *C. megacephala* apresenta uma grande importância nos estudos forenses, por ser uma das espécies mais abundantes e que primeiro chegam aos corpos em decomposição (GUIMARÃES *et al.*, 1978) e também por se alimentarem dos mesmos durante seu estágio larval, podendo assim indicar o intervalo pós-morte (IPM), que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo (CATTS & GOFF, 1992), dado de extrema importância nas investigações criminais.

Musca domestica Linnaeus (Diptera: Muscidae) também transporta formas infectantes de muitas doenças humanas e de animais domésticos, podendo ser citadas febre tifóide, diarreias infantis, carbúnculo, cólera, ascaridíase, coccidioses, poliomelite, etc (GREENBERG, 1970, 1973; LEVINE & LEVINE, 1991; MARCONDES, 2001; SMITH, 1986). Além desta importância médico-sanitária, os nematóides *Habronema muscae* e

H. megastoma, que podem causar lesões gástricas e cutâneas em eqüinos, desenvolvem-se obrigatoriamente em *Stomoxys calcitrans* e *M. domestica*, caracterizando assim sua importância veterinária (MARCONDES, 2001). SUKONTASON *et al.* (2004) observaram ainda a presença de *M. domestica* em cadáveres humanos, indicando seu potencial uso na entomologia forense (BYRD & CASTNER, 2001; SMITH, 1986). Em estudo realizado na Espanha por ARNALDOS *et al.* (2001), *M. domestica* teve uma grande importância entre os insetos necrófagos, sendo uma das primeiras espécies que chegaram à carcaça nas primeiras horas do dia no verão.

Existe ainda uma preocupação crescente de populações urbanas com o aumento da proliferação de *M. domestica* nos últimos anos, principalmente próximo a locais que propiciem a proliferação destas moscas, como culturas de cana de açúcar, devido à utilização de práticas agrícolas, que criam um ambiente propício à criação de moscas, como é o caso da vinhaça (BURALLI & GUIMARÃES, 1985), e devido também ao manejo inadequado de esterco, especialmente em aviários, e também de lixo (MARCONDES, 2001).

Várias formas de controle destas moscas têm sido propostas, principalmente utilizando-se inseticidas, os quais agem das mais diferentes formas. Entretanto, o principal alvo de ação dos inseticidas tem sido o sistema nervoso, devido à alta eficácia e rápida resposta que proporcionam no controle de pragas (CASIDA & QUISTAD, 1998; LUND, 1985; MATSUMURA, 1985; WARE, 1989).

Sistema nervoso

Nos últimos anos, o sistema nervoso vem recebendo grande atenção devido ao desenvolvimento de novas tecnologias, aceitação da neurogênese em adultos de diversos animais (CAYRE *et al.*, 2002) e dos trabalhos envolvendo interface cérebro/computador, por meio de modelos matemáticos (redes neurais artificiais - RNA) (CANGELOSI & PARIS, 2004; GROSSBERG *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2003) ou por relações entre tecido cerebral e mecanismos artificiais (neuroengenharia) (CARMENA *et al.*, 2003; NICOLELIS, 2003). Um sistema extremamente ligado às funções do sistema nervoso é o sistema endócrino, o qual através de substâncias químicas, chamadas de hormônios, atua também sobre a regulação da fisiologia, desenvolvimento e atividades de

comportamento, de uma forma mais lenta que o sistema nervoso, mas também efetiva. Assim, os dois sistemas se complementam (CHAPMAN, 1998).

O elemento básico do sistema nervoso é a célula nervosa ou neurônio, que pode ter diferentes morfologias, sendo que os tipos básicos de células nervosas são monopolar, bipolar e multipolar, os quais se diferenciam pelo número de ramificações e localização do corpo celular. A maioria dos neurônios nos insetos são monopolares, ou seja, possuem uma única projeção no corpo celular; já as células periféricas são bipolares, recebendo estímulos do ambiente e transmitindo para o gânglio central. Algumas células multipolares, com muitas ramificações, ocorrem nos gânglios do sistema nervoso recebendo inúmeras informações (CHAPMAN, 1998).

Existe uma variedade de sinais químicos de transmissão do impulso nervoso/mensageiros químicos, produzidos pelos neurônios dos insetos, os quais podem ser agrupados em quatro classes, baseadas na sua estrutura química: acetilcolina, aminas biogênicas, aminoácidos e peptídeos (CHAPMAN, 1998).

Os mensageiros químicos podem ainda ser diferenciados pela sua função em três grupos: os neurotransmissores, que causam efeitos transitórios na sinapse possibilitando a transmissão da informação (exemplo: Acetilcolina); neuromoduladores, que podem modificar a transmissão sináptica (exemplo: Octopamina); e neurohormônios, os quais agem como hormônios (exemplo: Serotonina) (CHAPMAN, 1998).

Assim, qualquer substância química que interfira nestes processos, inibindo ou hiperativando estes mensageiros químicos, irá causar mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento do organismo em contato com a mesma (OMOTO, 2000).

Dentre estas substâncias que atuam no sistema nervoso dos insetos, tem-se os inseticidas, de grande emprego na agricultura e no controle de vetores de importância médica/veterinária e as drogas de utilização médica, lícitas ou não, que podem vir a ser encontrados em larvas de moscas que se alimentaram de cadáveres humanos em decomposição.

Drogas que atuam no sistema nervoso

Efeito de inseticidas: subsídios para controle de pragas e de vetores de importância médico/veterinária

MATSUMURA (1985) classificou os inseticidas, baseado no seu modo de ação, em: (a) físicos, (b) protoplasmáticos, (c) inibidores metabólicos, (d) agonistas de hormônios, (e) estomacais e neurotóxicos. O principal alvo de ação dos inseticidas tem sido o sistema nervoso, devido à alta eficácia e rápida resposta que proporcionam no controle de pragas (CASIDA & QUISTAD, 1998; LUND, 1985; MATSUMURA, 1985; WARE, 1989).

Os efeitos destas substâncias tóxicas ao sistema nervoso sobre o comportamento dos insetos têm sido pouco estudados, sendo que alguns trabalhos existentes com este enfoque são com larvas de *Sarcophaga bullata* (ZDÁREK *et al.*, 2004) em que se observa mudanças no comportamento de pupação destes dípteros; efeitos comportamentais e de mortalidade em vespas parasitas *Aphidius ervi* (DESNEUX *et al.*, 2004), efeitos de inseticidas no comportamento de procura por fonte alimentar e na repelência de culicídeos (ROBERTS *et al.*, 2000; SUNGVORNYOTHIN *et al.*, 2001; MATHENGE *et al.*, 2001; CHAREONVIRIYAPHAP *et al.*, 2001) e efeitos de deltamethrin no comportamento de deslocamento de coleópteros (BECKEL *et al.*, 2004).

Assim, estudos que procurem observar a atuação de inseticidas e drogas no sistema nervoso têm sido de fundamental importância para que se possa obter um melhor conhecimento do modo de ação, conseqüências comportamentais e mudanças fisiológicas nos seres vivos, além de, no caso de insetos pragas, auxiliarem na elaboração de programas de manejo da resistência destes à inseticidas (GEORGHIOU, 1983).

Efeito de drogas humanas: subsídios para entomologia forense

Na ciência forense, casos de mortes de pessoas por utilização de drogas lícitas ou não, direta ou indiretamente (ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003; CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; NEUTEL & PATTEN, 1997; POPE & KATZ, 1994) têm dificultado a investigação por parte dos peritos devido à ação destas drogas na decomposição do corpo e no ritmo de desenvolvimento de larvas de insetos necrófagos (BOUREL *et al.*, 2001; CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1997).

Suicídios, mortes ou mudanças de comportamento em usuários de drogas psicotrópicas, dentre elas os benzodiazepínicos (Diazepam), têm sido observados em vários estudos (BARBONE *et al.*, 1998; BERMAN *et al.* 2005; BOND, 1998; LESTER, 1995; DIETCH & JENNINGS, 1988; GARDNER & COWDRY, 1985; HALL & ZISOOK, 1981; NEUTEL & PATTEN, 1997; SZARA & LUDFORD, 1980). Investigações que procuram observar também mudanças na concentração de Diazepam em diferentes órgãos de rato, logo após sua morte, vêm sendo realizadas (SHIOTA *et al.*, 2004), e são de extrema importância para a ciência forense.

Dentre estes benzodiazepínicos, PIEN *et al.* (2004) observaram mudanças na morfologia de larvas e pupas e na taxas de desenvolvimento larval em *Calliphora vicina*, utilizando a substância *nordiazepam*. Já CARVALHO *et al.* (2001) observaram que Diazepam acelera o desenvolvimento larval de *C. albiceps* e *C. putoria*. Estes estudos envolvem a entomotoxicologia, ciência que procura analisar o efeito e quantificação de diferentes drogas sobre os insetos e também na taxa de desenvolvimento larval dos mesmos (GOFF & LORD, 1994; INTRONA *et al.*, 2001), os quais são de grande importância numa melhor estimativa do intervalo pós-morte (IPM).

Efeitos de substâncias químicas no comportamento de moscas-varejeiras praticamente não são relatados, sendo analisadas apenas mudanças no tempo de pupação das espécies, interferindo assim na estimativa do IPM nestes estudos.

Comportamento de dispersão larval de dípteros

As moscas-varejeiras utilizam-se de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos pelas fêmeas e para alimentação das larvas (HANSKI, 1987; PESCHKE *et al.*, 1987). O estágio larval é o principal período em que ocorre limitação de recursos alimentares em moscas-varejeiras (REIS *et al.*, 1994), e a competição por esses recursos é geralmente do tipo exploratória (LOMNICKI, 1988), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (ULLYETT, 1950). Após essa competição, as larvas começam a procurar por um sítio de pupação no habitat, ou por mais fonte de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, e esse processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG 1990).

Alguns estudos de dispersão larval em califorídeos vêm sendo realizados desde o trabalho de NUORTEVA (1977), como o de GREENBERG (1990), e outros envolvendo modelos, como os de dispersão larval pós-alimentar em ambiente restrito à uma única direção que se basearam em equações de difusão (BASSANEZI *et al.*, 1997), análises estatísticas (GODOY *et al.*, 1995; GODOY *et al.*, 1996; VON ZUBEN *et al.*, 1996), sob o enfoque de interações não-locais (BOLDRINI *et al.*, 1997), e através da utilização de arenas circulares para pupação (GOMES *et al.*, 2002, 2003).

Entretanto, ainda não existem trabalhos que observem o comportamento de dispersão larval e conseqüente padrão de distribuição espacial nos sítios de pupação, de indivíduos em contato com fontes alimentares e/ou substratos com substâncias químicas, as quais de alguma forma influenciem neste comportamento.

Estudos de dispersão e outros que observem tipos de comportamentos espaço-temporais de distribuição de espécies, muito comuns em ecologia populacional, vêm utilizando modelagens físico/matemáticas e simulações de fenômenos em sistemas complexos, para melhor compreensão e interpretação dos dados observados (TEWS *et al.*, 2004; ZIV, 1998), tendo em vista a grande quantidade de variáveis envolvidas e a interação existente entre as mesmas.

Modelagens computacionais de processos biológicos.

O computador é uma ferramenta de processamento de informação de propósito geral e de aplicação praticamente irrestrita. Com o computador, é possível realizar experimentos de simulação que envolvam a evolução no tempo de uma ou mais variáveis, permitindo desde a validação de hipóteses em processos de modelagem até a concepção de mundos virtuais cada vez mais fiéis a cenários reais que se queira reproduzir, para atender a uma infinidade de propósitos. Esta nova forma de descrever e investigar fenômenos pode inclusive representar o único meio de se abordar certos problemas matemáticos e científicos (WOLFRAM, 1994).

Desta forma, modelos matemáticos/físicos de fenômenos complexos através de simulação computacional têm melhorado a compreensão e interpretação de processos biológicos do mundo natural. Modelos realísticos baseados em leis físicas geralmente resultam em sistemas não lineares de equações diferenciais integrais ou parciais, sendo

extremamente comuns em fenômenos biológicos (ERMENTROUT & EDELSTEIN-KESHET, 1993).

Dentre estes estudos tem-se trabalhos com evolução artificial (algoritmos evolutivos), como por exemplo, na seleção de modelos de navegação em insetos (DALLE & COLLET, 2001), os quais têm ajudado a interpretação das formas de evolução; trabalhos com autômatos celulares (ACs), onde procuram propor AC para diferenciação celular que ocorre nos organismos (SILVA & MARTINS, 2003), para compreensão de agregação animal (PARRISH & EDELSTEIN-KESHET, 1999), ou seja, de fenômenos biológicos que se caracterizam pela extrema complexidade. Outros trabalhos que buscam relação entre os fenômenos biológicos e modelagens computacionais/físicas são as redes neurais artificiais, as quais procuram através dos fenômenos biológicos, propor modelos de inteligência artificial e se aproximar da forma de aprendizado dos seres vivos. Assim, a interdisciplinaridade tem merecido importância no desenvolvimento de qualquer tipo de trabalho, tendo em vista a melhor interpretação dos dados obtidos.

Embora existam muitas manifestações de auto-organização na natureza e que poderiam ser tomadas como casos de estudo, este projeto se propõe a investigar o processo de dispersão larval pós-alimentar em moscas das espécies *Chrysomya megacephala* e *Musca domestica*, após contato com substâncias químicas que atuam no sistema nervoso, e que poderão ou não modificar seu comportamento de dispersão, devido a seus modos de ação.

Na investigação de fenômenos espaço-temporais, incluindo dispersão larval pós-alimentar, as ferramentas computacionais mais empregadas e que apresentam maior flexibilidade para responder a comportamentos complexos são os autômatos celulares (ILACHINSKI, 2001; WOLFRAM, 1994). Estes serão empregados como instrumentos básicos de modelagem matemática e simulação computacional neste projeto, sendo exemplos tipos do emprego do paradigma *bottom-up*, podendo ser utilizados na modelagem e simulação de fenômenos vinculados a sistemas complexos, particularmente aqueles caracterizados por apresentar efeitos de dispersão e outros tipos de comportamentos espaço-temporais, muito comuns em ecologia populacional. O paradigma *bottom-up* é caracterizado pela iniciativa de explicar comportamentos de alto nível (comportamentos complexos) recorrendo a causas de baixo nível (baseadas em leis elementares).

Objetivos

O objetivo básico deste trabalho é procurar dar contribuição a um melhor conhecimento dos efeitos de substâncias químicas que atuem no sistema nervoso e conseqüentemente no metabolismo e comportamento de moscas, e desta forma buscar observar mudanças no desenvolvimento e comportamentais na dispersão larval pós-alimentar, sendo utilizados modelos e simulações computacionais para melhor compreensão e interpretação dos dados de dispersão. Para isto, as fontes de inspiração são os sistemas biológicos, em especial o sistema nervoso e como ele atua nos insetos para a geração, seleção e coordenação de comportamentos capazes de garantir a operação no ambiente.

A análise do desenvolvimento larval das diferentes espécies em substrato alimentar com a presença de substância química teve por objetivo esclarecer aspectos do efeito desta droga no incremento de peso por unidade de tempo, como:

- se a presença desta substância altera o padrão de desenvolvimento larval, e se positivo, se ocorre aumento ou diminuição do ganho de massa por tempo;
- se as espécies respondem da mesma forma à presença desta substância;
- se diferentes doses desta substância alteram o desenvolvimento larval procurando quantificar esta alteração;

Já o processo de dispersão larval pós-alimentar também foi investigado, considerando as duas espécies de dípteros, observando-se os efeitos que as drogas produzirão nos imaturos interferindo no comportamento de dispersão dos mesmos. Esta investigação é fundamental para se predizer:

- se as larvas depois de alimentadas e em contato com as drogas, via ingestão ou não, podem modificar ou não seu comportamento de dispersão na procura por um sítio de pupação, com relação à distância e profundidade;
- se as larvas melhor nutridas terão um comportamento diferente das outras, no caso de ingestão, sofrendo mais ou menos o efeito da droga e no caso de contato no substrato com a droga, poderiam sofrer menor efeito ou não;
- qual espécie de mosca percorre a maior distância durante o processo de competição por local de enterramento para pupação, e qual é mais susceptível aos efeitos das drogas;

- se existe uma diferença de nível de agregação para se empuparem quando se considera as diferentes drogas utilizadas;
- se diferenças na sensibilidade do sexo das moscas às drogas utilizadas;
- se finalmente, as duas espécies de moscas comportam-se de maneira similar ou não em termos de dispersão larval pós-alimentar, com e sem o efeito das drogas.

A motivação e a justificativa para este tipo de escolha são as seguintes:

- Os dípteros que serão utilizados neste trabalho têm importância na entomologia forense e são considerados pragas do ponto de vista médico/sanitário/veterinário; desta forma são necessários trabalhos que procurem compreender melhor sua biologia e auxiliar no seu controle.
- Efeitos de substâncias no sistema nervoso destes insetos e no comportamento de dispersão larval pós alimentar dos mesmos - tendo em vista a necessidade de trabalhos que analisem os efeitos destas drogas com enfoque forense (GOFF *et al.*, 1993) ou no controle destas pragas, possibilitando assim um manejo mais eficaz destas espécies.
- Proposição de novos enfoques de abordagem para o caso de dispersão larval pós-alimentar, através de modelagens e simulações computacionais, as quais melhorem a compreensão de sistemas biológicos complexos como este envolvendo dispersão.

Material e Métodos

Para atender os objetivos do presente projeto de pesquisa, foram necessárias cinco etapas básicas:

1. Realização de experimentos para coleta de dados:
 - Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais;
 - Formação das densidades larvais;
 - Preparação de arenas de dispersão;
 - Drogas utilizadas, suas disposições e dosagens;
 - Contagem e determinação da distância e profundidade de pupação em relação ao ponto de início da dispersão;
 - Determinação do peso das pupas;
 - Sexagem;
 - Mortalidade nos diferentes tratamentos;

2. Análise dos dados obtidos procurando relacioná-los aos efeitos que as substâncias químicas utilizadas causam no sistema nervoso
3. Análise e síntese dos modos básicos de interação dos indivíduos que compõem o agregado capaz de expressar comportamento auto-organizado; e possíveis modificações devido a atuação de fatores que modifiquem o padrão comportamental.
4. Modelagem matemática de processos auto-organizados
5. Simulação computacional

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* e *M. domestica* (FIGURA 1) foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizado como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs.



FIGURA 1. Fotos das espécies estudadas.
A – *Chrysomya megacephala* e B – *Musca domestica*.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para oviposição das fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F₁. Somente a geração F₂ foi utilizada nos experimentos, por ser progênie de uma que teve todo o seu desenvolvimento sob condições experimentais.

Como substratos alimentares para desenvolvimento larval das duas espécies estudadas, foram utilizados: meio artificial à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982) e fígado de coelho, que não estava previsto no cronograma inicial do projeto, objetivando uma comparação com os resultados obtidos na dieta oligídica (dieta composta por produtos orgânicos, que procura fornecer todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento,

sendo semelhante ao substrato natural de alimentação). Esta dieta artificial foi desenvolvida para Calliphoridae; no entanto, também foi utilizada para *M. domestica* após um teste piloto, no qual se obteve o desenvolvimento completo de ovo até adulto deste Muscidae.

Análise do desenvolvimento larval

Os ovos destas espécies foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os ovos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 hs) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais. Foram formadas densidades de 400 larvas por pote, sendo feitos três experimentos (três réplicas) para cada espécie. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em potes contendo dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982) (400 larvas em 125 gramas de dieta – 0,31g/larva) ou fígado de coelho (200 larvas em – $58,58 \pm 4,99$ g de fígado) como substrato alimentar, para desenvolvimento das larvas (mantendo uma relação aproximada de 0,3g de substrato alimentar por larva). Foram utilizados oito coelhos machos (obtidos no Biotério Central da Unesp - Botucatu – SP) com massa média de $1,682 \text{ Kg} \pm 141 \text{ g}$, os quais foram mortos mecanicamente para a obtenção do fígado, após o tratamento utilizado (controle – sem Diazepam e DL50 - tratados com Diazepam).

Dados que foram obtidos para desenvolvimento larval

Para a análise do desenvolvimento larval, foram coletados valores de massa das larvas em intervalos de 6 horas, até que se completasse o desenvolvimento larval e as mesmas procurassem um local para pupação, sendo que a primeira pesagem considerou larvas recém-eclodidas.

Em intervalos de seis horas, a massa foi individualmente registrada para uma amostra aleatória de 10 larvas de cada recipiente, que foram lavadas e secadas antes da pesagem. Após a pesagem (exemplares vivos), as larvas tiveram que ser devolvidas aos respectivos frascos, pois caso fossem retiradas, a variação na densidade larval (competição intra-específica) seria muito grande, e poderia causar uma resposta na taxa de desenvolvimento larval, como observado por IRELAND & TURNER (2006) e VON ZUBEN (1995), o que dificultaria a análise dos dados sobre a influência das drogas presentes.

Arenas de pupação

Após o desenvolvimento larval, foram separadas em torno de 100 larvas junto com o substrato alimentar, que foram depositadas no centro de arenas circulares de 30 cm de diâmetro e de 10 cm de profundidade forradas com areia (Figura 2), nas quais as larvas irradiaram para buscar seu sítio de pupação. Estas arenas foram colocadas em salas com temperatura variando entre 25°C e 27°C, com fotoperíodo de 24 h, ou seja, luz total, tendo em vista a tendência das larvas se enterrarem na presença da luz. Sendo os eixos x,y posicionados em relação aos pontos cardeais, como mostrado na Figura 2A.

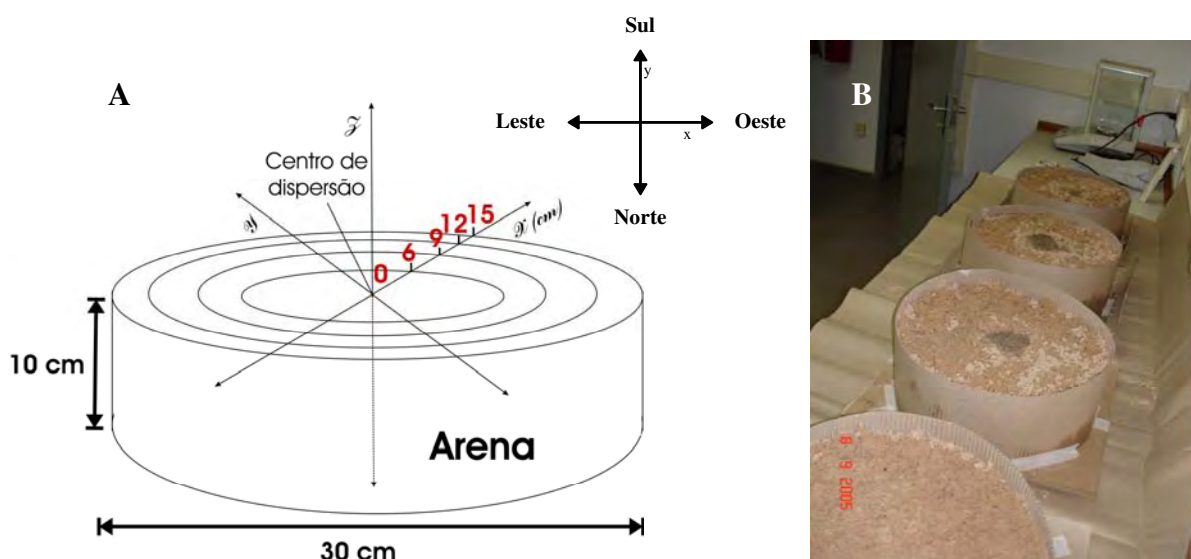


FIGURA 2. A - Esquema da arena e disposição dos eixos para obtenção de dados e B - foto das arenas utilizadas para estudo da dispersão larval pós-alimentar.

A areia utilizada no experimento foi previamente lavada em água corrente, para retirada de qualquer substância química presente na mesma e peneirada, para que ficasse mais homogênea no tamanho de seus grãos (diâmetro dos grãos < 1 mm), e posteriormente armazenada para ser utilizada na montagem das arenas. Foram montadas quatro arenas para cada droga analisada, sendo uma controle, uma com dose de referência (utilizada na agricultura para o Fipronil - **F** e DL50 do coelho para a droga neuroléptica, Diazepam - **D**), uma com a dose o dobro da de referência (**2F** e **2D**) e outra com metade da dose de referência (**F/2** e **D/2**).

O volume de areia colocado nas arenas recebia 800 mL de água antes de se montarem as arenas e as larvas iniciarem a dispersão, pois este substrato, se totalmente seco, impossibilitava que as larvas conseguissem se enterrar, causando a morte das mesmas. Assim, através de experimentos piloto, ficou definido este valor em volume de água necessário para umedecer o substrato. Após a montagem de todas as arenas, 50 mL de água eram dispersos pela superfície destas por meio de “spray”, pois o mesmo volume era disperso nas arenas tratadas com Fipronil, para desta forma padronizar a metodologia de todas as arenas de dispersão larval pós-alimentar. A Tabela 1 abaixo mostra a metodologia empregada nas arenas de dispersão.

TABELA 1. Metodologia utilizada nas arenas de dispersão larval pós -alimentar.

Denominação do tratamento	Tratamento realizado no substrato			
	Substrato alimentar larval		Substrato de pupação	
Controle	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 50 mL de água	areia
D/2	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (112,5µL) na dieta (125g)	Dispersão “spray” de 50 mL de água	areia
D	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (225µL) na dieta (125g)	Dispersão “spray” de 50 mL de água	areia
2D	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (450µL) na dieta (125g)	Dispersão “spray” de 50 mL de água	areia
Fígado Controle	Fígado de coelho (58,58 ± 4,99 g)	Aplicação de 3,02 mL* de solução veículo	Dispersão “spray” de 50 mL de água	areia
Fígado Diazepam	Fígado de coelho (58,58 ± 4,99 g)	Aplicação de 3,02 mL* de Diazepam NQ 10mg	Dispersão “spray” de 50 mL de água	areia
F/2	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 0,88 mg de Fipronil (50 mL)	areia
F	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 1,76 mg de Fipronil (50 mL)	areia
2F	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 3,52 mg de Fipronil (50 mL)	areia

* volume “exemplo” calculado de acordo com a massa média dos animais utilizados.

Dados da porcentagem de massa de água no substrato para pupação (areia), visando uma melhor interpretação da dispersão larval pós alimentar, também foram obtidos, por meio de amostras de diferentes porções da arena: centro (C) e periferia (P) em diferentes profundidades (de 0 a 2 cm; 4 a 6 cm e 8 a 10 cm), ou seja, C (0-2), C (4-6) e C (8-10); e P(0-2), P (4-6) e P (8-10). Estas foram pesadas antes da liberação das larvas e no momento em que era feita a análise dos dados de dispersão, e posteriormente foram levadas a uma estufa e mantidas a 110°C por 5 dias. Passado este tempo, foi obtida a porcentagem de água em cada amostra, nas diferentes regiões da arena.

Dados que foram obtidos na análise das arenas.

Após as larvas empuparem, elas foram individualmente localizadas e retiradas da areia, sendo medidas para cada uma, em cm, as coordenadas no eixo x,y e a

profundidade (z) do local de pupação em relação ao centro, com o auxílio de régua. Por meio dos dados de coordenada, foram obtidas a distância de cada pupa do centro de irradiação e a distância xyz , como pode ser observado na Figura 3. A contagem começou da periferia para o centro. (FIGURA 4)

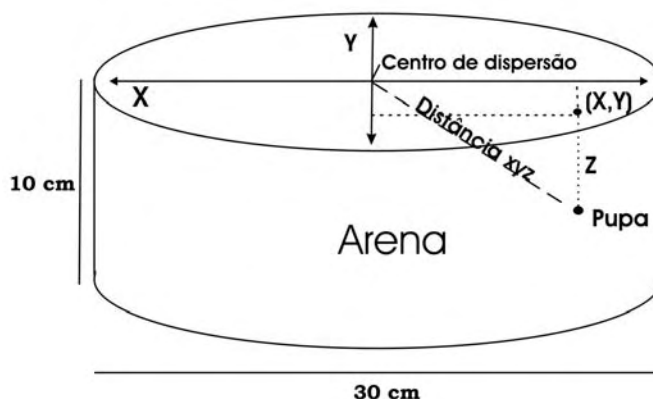


FIGURA 3. Esquema da arena de dispersão e como será calculada a distância xyz .



FIGURA 4. Metodologia utilizada para obtenção dos dados de dispersão larval pós-alimentar nas arenas.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989), com ajuda do programa MATLAB[®] 6.5.

Cada pupa foi individualizada em frascos de plástico e pesada em balança analítica da marca Ohaus[®], antes que ocorresse a emergência dos adultos. Os dados de peso em mg foram anotados na mesma planilha dos outros dados, para futura análise.

Após a pesagem, cada pupa foi devolvida ao seu respectivo frasco, para após a emergência, ser feita a sexagem dos adultos. Também foi observado o número de indivíduos mortos nas diferentes dosagens, espécies e drogas analisadas, já que substâncias neurotóxicas e neurolépticas foram utilizadas. Neste caso, foi observado o número de larvas mortas no substrato de pupação ou mortalidade no estágio de pupa, no qual, passados vários dias, não houve a emergência do adulto.

Drogas utilizadas, suas disposições e dosagens.

As substâncias químicas que foram utilizadas têm atuação no sistema nervoso. No caso dos inseticidas, foi utilizado o Fipronil (grupo químico: Fenil Pirazol) (inseticida - Regent[®] 800 WG), sendo que seus efeitos no sistema nervoso dos insetos foram amplamente estudados (DURHAN *et al.*, 2001) e no caso de drogas de importância forense, utilizou-se Diazepam (grupo químico: Benzodiazepínico) (ansiolítico - Diazepam NQ[®] 10mg - solução injetável – ampola de 2 mL - C₁₆H₁₃ClN₂O - 7-chloro-1-methyl -5-phenyl-2,3-dihydro-1H-1,4-benzodiazepin-2-one), que atua no sistema nervoso e apesar de ser muito estudado nos seres humanos, ainda necessita de mais investigações para melhor compreensão de sua atuação neural (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004). Cabe aqui salientar mais uma vez que estudos sobre o efeito desta substância em insetos são escassos.

Todos os indivíduos utilizados nos diferentes tratamentos tiveram como fonte alimentar a dieta artificial proposta por LEAL *et al.* (1982), a qual possui fontes de proteínas e carboidratos que são necessárias para o desenvolvimento destas larvas de dípteros; e também fígado de coelho, que não estava previsto no projeto inicial, mas é animal modelo em muitos estudos científicos e forenses.

Assim, o inseticida foi colocado no substrato de pupação, devido a seu uso na agricultura, e o antidepressivo na dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982) e/ou injetado no coelho, substância que pode estar presente no corpo da vítima (cadáver) em investigações médico-criminais. As dosagens utilizadas nos tratamentos foram iguais às utilizadas na agricultura, no caso do Fipronil (250g de p.c./ha que corresponde a $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg/cm², ou seja, 1,76 mg de Fipronil / arena), sendo disperso por meio de “spray” um volume total de 50 mL sobre toda a superfície da arena. E no caso do ansiolítico (Diazepam), foi colocado na dieta artificial ou injetado no animal-teste (coelho) DL50 (intravenosa) de coelho, ou seja, 9 mg/Kg (NIOSH, 2004).

A aplicação do Diazepam no animal-teste foi feita por meio de seringas de vidro de 3 mL, sendo injetado na veia marginal da orelha do animal o volume correspondente ao seu peso em relação à DL50 (9 mg/Kg – intervalo de tempo da administração: de 2 a 5 minutos). Os animais foram mortos mecanicamente após 45 minutos da administração intravenosa. Para esta análise do desenvolvimento, foram feitos apenas dois tratamentos: controle (injetado volume do veículo) e DL50 (Diazepam), não sendo

consideradas as outras dosagens (DL50/2 e 2*DL50), devido à dificuldade de obtenção da droga.

Foram utilizadas três dosagens na dieta artificial e no substrato de pupação: doses letais (agricultura - F ou organismo-teste - D), doses com metade da utilizada na agricultura ou DL50 (F/2 e D/2) e doses de duas vezes a concentração utilizada (2F e 2D), para todas as substâncias escolhidas, sendo que ao controle não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de LEAL *et al.* (1982).

Na Figura 5, pode-se observar um esquema de toda metodologia utilizada neste trabalho.

Esquema da metodologia utilizada no experimento

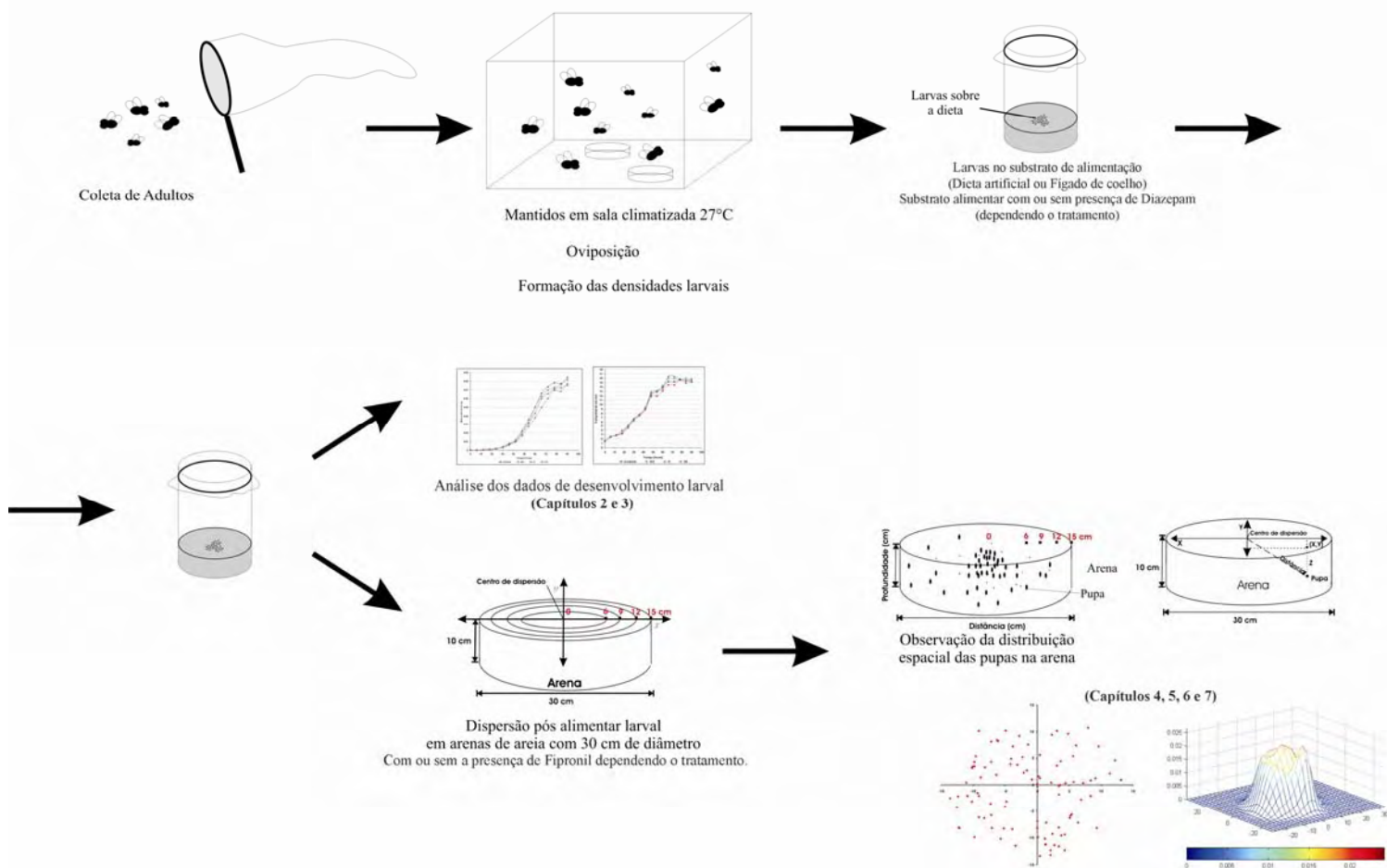


FIGURA 5. Esquema de toda a metodologia utilizada no experimento.

Análise estatística e utilização de ferramentas computacionais

Análise do desenvolvimento larval.

A análise estatística de todos os dados coletados no desenvolvimento larval destas moscas foi feita no programa SAS. Testes de ANOVA foram realizados usando Modelos Lineares Gerais (GLM), utilizando nível de significância de 5%, sendo que as médias dos tratamentos realizados foram comparadas usando-se o teste de comparação múltipla de Duncan.

Análise da dispersão larval pós-alimentar.

Testes de ANOVA e de comparação múltipla a posteriori de Bonferroni foram utilizados para se testar diferenças entre médias de profundidade e de distância dos tratamentos realizados.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989); e calculada a média da distância mínima entre as pupas e a média da mínima distância entre as pupas, nos diferentes tratamentos (doses) e substratos alimentares, sendo realizados com ajuda do programa MATLAB 6.5.

Referências Bibliográficas

- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- ARNALDOS, I; ROMERA E.; GARCÍA, M. D. & LUNA, A. An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the southeastern Iberian peninsula. **Int. J. Legal Med.** 114: 156–162, 2001.
- BARBONE, F.; MCMAHON, A.D.; DAVEY, P.G.; MORRIS, A.D.; REID, I.C.; MCDEVITT, D. G.; MACDONALD, T.M. Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. **The Lancet**, 532: 1331-1336, 1998.
- BASSANEZI, R. C., LEITE, M. B. F., GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, C. J., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F.. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Mem. Inst. O. Cruz**, 92(2): 281-286, 1997.

- BECKEL, H., LORINI, I. & LAZZARI, S. M. N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revta. Bras. Entomol.**, 48(1): 115-118, 2004.
- BERMAN, M. E.; JONES, G. D. & MCCLOSKEY, M. S. The effects of diazepam on human self-aggressive behavior. **Psychopharmacology**, 178: 100-106, 2005.
- BOLDRINI J. L., BASSANEZI, R. C., MORETTI, A.C., VON ZUBEN, C. J. GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **J. Theor. Biol.**, 185: 523-531, 1997.
- BOND, A.J. Drug-induced behavioural disinhibition: incidence, mechanisms and therapeutic implications. **CNS Drugs**, 9:41–57, 1998.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BURALLI, G. M. & GUIMARÃES, J. H. Controle de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera, Muscidae) em área de manejo de vinhaça (Macatuba, São Paulo, Brasil). **Rev. Bras. Zool.**, 3(1): 1-6, 1985.
- BYRD, J.H., CASTNER J.L. **Insects of forensic importance**. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Florida, p.43– 79, 2001.
- CANGELOSI, A. & PARIS, D. The processing of verbs and nouns in neural networks: Insights from synthetic brain imaging. **Brain and Language**: 89: 401–408, 2004.
- CARMENA, J. M., LEBEDEV, M. A., CRIST, R. E., O'DOHERTY, J. E., SANTUCCI, D. M., DIMITROV, D. F., PATIL, P. G., HENRIQUEZ, C. S. & NICOLELIS, M. A. L. Learning to control a brain-machine interface for reaching and grasping by primates. **Plos Biol.**, 1(2): 1-16, 2003.
- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CASIDA, J. E. & QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present and future? **Ann. Rev. Entomol.**, 43: 1-16, 1998.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.

- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CAYRE, M., MALATERRE, J. SCOTTO-LOMASSESE, S., STRAMBI, C. & STRAMBI, A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, 132: 1-15, 2002.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, 4th edition, Cambridge, p.770, 1998.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T; SUNGVORNYOTHIN, S; RATANATHAM, S; PRABARIPAI A Insecticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. **J. Am. Mosquito Control**: 17 (1): 13-22, 2001.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- DALLE, K. & COLLET, T. S. Using artificial evolution and selection to model insect navigation. **Cur. Biol.**, v.11 (17), p.1305-1316, 2001.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.
- DESNEUX, N., RAFALIMANANA, H. & KAISER, L. Dose–response relationship in lethal and behavioural effects of different insecticides on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. **Chemosphere**, 54: 619–627, 2004.
- DIETCH J.T.; JENNINGS, R.K. Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. **J. Clin. Psychiatry**, 49:184–188, 1988.
- DUHAM, E. W., SCHARF, M. E. & SIEGFRIED, B. D.. Toxicity and Neurophysiological Effects of Fipronil and Its Oxidative Sulfone Metabolite on European Corn Borer Larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Pest. Biochem. Physiol.**, 71: 97–106, 2001.
- ERMENTROUT, G. B. & EDELSTEIN-KESHET, L. Cellular automata approaches to biological modeling. **J. Theor. Biol.**, 160: 97-133, 1993.
- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA , G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.
- GARDNER, D.L & COWDRY R.W. (1985) Alprazolam-induced dyscontrol in borderline personality disorder. **Am. J. Psychiatry**, 142: 98–100, 1985.

- GEORGHIU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIU, G. P., SAITO, T. (eds), **Pest resistance to pesticides**. Plenum, New York, p. 769-792, 1983.
- GODOY, W. A.C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L., RIBEIRO, O. B. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **J. Appl. Entomol.**, 119: 263-266, 1995.
- GODOY, W. A.C., REIS S. F., VON ZUBEN, C. J. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. **J. Appl. Entomol.**, 120(4): 423-426, 1996.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M. L., BROWN, W. A., OMORI, A. I. & LAPOINTE, D. A. Preliminary observations of effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficollis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of post mortem interval, **J. Forensic Sci.**, 38: 316-322, 1993.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & GOVONE, J. S. Comportamento de dispersão larval radial pós alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. **Entomol. Vect.**, 9: 115-132, 2002.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.** 83: 1210-1214, 1990.
- GREENBERG, B. **Flies and disease. Biology, disease transmission**. New Jersey : Univ. Press. Princeton. v. 2, 1973.

- GREENBERG, B. **Flies and Disease. Classification and Biotic Associations**, Princeton University, New Jersey, p. 856, 1971.
- GROSSBERG, S., GOVINDARAJAN, K. K., WYSE, L. L. & COHEN, M. A. Artstream: a neural network model of auditory scene analysis and source segregation. **Neur. Net.**, 17: 511–536, 2004.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., BURALLI, G.M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 23 (4): 245-255, 1979.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HALL R.C.W., ZISOOK S.. Paradoxical reactions to benzodiazepines. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 11: 45–49, 1981.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol.**, 12: 257-266, 1987.
- ILACHINSKI, A. “**Cellular Automata: A Discrete Universe**”, World Scientific, 2001
- IMBIRIBA, A. S., IZUTANI, D.T., MILHORETO, I.T., LUZ, E. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). **Arq. Biol Tecnol.**, 20: 35-39, 1977.
- INTRONA, F., C.P. CAMPOBASSO & M.L. GOFF. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.** 120: 42-47, 2001.
- IRELAND, S. & TURNER, T. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. **Forensic Sci. Int.**, 2006 (in press).
- KIM, S. P., SANCHEZ, J. C., ERDOGMUS, D., RAO, Y. N., WESSBERG, J., PRINCIPE, J. C. & NICOLELIS, M. Divide-and-conquer approach for brain machine interfaces: nonlinear mixture of competitive linear models. **Neur. Net.**, 16: 865–871, 2003.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.

- LESTER, D. Case consultation: diffusion of responsibility in the care of a difficult patient. **Suicide Life Threat Behav.**, 25: 415–421, 1995.
- LEVINE, O. S. & LEVINE, M. M. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of Shigellosis. **Infect. Immun.**, 31: 445-452, 1991.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- LOMNICKI, A.. **Population ecology of individuals**. Princeton: Princeton Press, 233 p., 1988.
- LUND, A. E. Insecticides: effects on the nervous system. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**, Pergamon Press, New York, vol. 12, p. 9-56, 1985.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MATHENGE, EM; GIMNIG, JE; KOLCZAK, M; OMBOK M, IRUNGU LW, HAWLEY WA. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **J. Med. Entomol.**, 38 (4): 531-536, 2001.
- MATSUMURA, F.. **Toxicology of insecticides**. Plenum Press, New Cork, 598p., 1985.
- NEUTEL, C. I. & PATTEN, S. B. Risk of suicideattempts after benzodiazepine and/or antidepressant use. **AEP**, 7 (8): 568-574, 1997.
- NICOLELIS, M. A. L. Brain-machine interfaces to restore motor function and probe neural circuits. **Nature Neuroscience**, 4: 417-422, 2003.
- NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances**. Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.
- NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Volume 2: Physical Trauma. Tedeschi, C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.
- O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.

- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. **In: Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.
- PARRISH, J. K. & EDELTEIN-KESHETZ, L.. Complexity, Pattern, and Evolutionary Trade-Offs in Animal Aggregation. **Science**, 284: 99-101, 1999.
- PESCHKE, K.; KRAPP, D. & FULDNER, D. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. **Zool. Jb. Syst.**, **114**: 241-265, 1987.
- PESSÔA, S. B. & MARTINS A. V. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara, 11ª edição, Rio de Janeiro, p. 872, 1988.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- REIS, S.F.; G. STANGENHAUS, W.A.C. GODOY, C.J. VON ZUBEN & O.B. RIBEIRO. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.**, 38: 33-34, 1994.
- ROBERTS, DR; ALECRIM, WD; HSHIEH, P; GRIECO JP, BANGS M, ANDRE RG, CHAREONVIRIPHAP T A probability model of vector behavior: Effects of DDT repellency, irritancy, and toxicity in malaria control. **J. Vector. Ecol.**, 25 (1): 48-61, 2000.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.
- SADLER, D. W., FUKU, C., COURTE, F. & POUDEY, D, J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Sci. Int.**, 71: 191-197, 1995.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481–485, 1997.
- SAS Institute Inc., **SAS User's Guide: Statistics**, Version, 8th Edition, Cary, NC, USA, 2001.

- SHIOTA, H., NAKASHIMA, M., TERAZONO, H., SASAKI, H., NISHIDA, K., NAKAMURA, J. & TANIYAMA, K. Postmortem changes in tissue concentrations of triazolam and diazepam in rats. **Legal Medicine**, 6(4): 224-232, 2004.
- SILVA, H. S. & MARTINS, M. L.. A cellular automata model for cell differentiation. **Physica A**, 322: 555 – 566, 2003.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- STONEHOUSE, J., MUMFORD, J., POSWAL, A. MAHMOOD, R., MAKHDUM, A. H., CHAUDHARY, Z. M., BALOCH, K. N., MUSTAFA, G. & MCALLISTER, M. The accuracy and bias of visual assessments of fruit infestation by fruit flies (Diptera: tephritidae). **Crop Protection**, 23: 293–296, 2004.
- SUKONTASON, K., SUKONTASON, K. L., PIANGJAI, S., BOONCHU, N., KURAHASHI, H., HOPE, M. & OLSON, J. K. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. **Micron**, 35: 391–395, 2004.
- SUNGVORNYOTHIN, S; CHAREONVIRIYAPHAP, T; PRABARIPAI, A; THIRAKHUPT V, RATANATHAM S, BANGS MJ. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambdacyhalothrin. **J. Vector Ecol.**, 26 (2): 202-215, 2001.
- SZARA, S. I. & LUDFORD, J. P. **Benzodiazepines: A Review of Research Results**. NIDA Research Monograph, p.101, 1980.
- TEWS, J., MOLONEY, K. & JELTSCH, F. Modeling seed dispersal in a variable environment: a case study of the fleshy-fruited savanna shrub *Grewia flava*. **Ecol. Model.**, 175: 65–76, 2004.
- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 234 B: 77-174, 1950.
- VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)**. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WARE, G. W. **The pesticide book**. Thompson Publication, Fresno, 340p, 1989.

- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WOLFRAM, S., **Cellular Automata and Complexity – Collected Papers**, Addison-Wesley Publishing Company, 1994
- WORTON, B.J. Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies, **Ecology**, 70(1):164-168, 1989.
- ZDÁREK, J. VERLEYEN, P. MARES, M. DELECKOVÁ, L. & NACHMAN R.. Comparison of effects of pyrokinins and related peptides indentified from arthropods on pupariation behaviour in flesh fly (*Sarcophaga bullata*) larvae (Diptera: Sarcophagidae). **J. Ins. Physiol.**, 50: 233-239, 2004.
- ZIV, Y. The effect of habitat heterogeneity on species diversity patterns: a community-level approach using an object-oriented landscape simulation model (SHALOM). **Ecological Modelling**, 111: 135–170, 1998.
- ZUMPT, F.. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 267 p, 1965.

CAPITULO 2

EFEITO DE DIAZEPAM NO DESENVOLVIMENTO LARVAL DE
Chrysomya megacephala (F.) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

RESUMO

Chrysomya megacephala (Fabricius) é vista como mosca de importância forense em várias partes do mundo, podendo utilizar cadáveres humanos como substrato de alimentação larval, auxiliando assim na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) em investigações médico-criminais. Tal estimativa se baseia no tempo de desenvolvimento larval do inseto alvo; entretanto, este período do desenvolvimento pode ou não ser alterado quando houver a presença de substâncias químicas junto ao substrato alimentar. Estas substâncias, nos estudos forenses, podem ser drogas lícitas ou não, podendo ter causado a morte da pessoa ou estarem presentes nos tecidos da vítima por razões médicas. Assim, utilizou-se Diazepam NQ[®] (10mg solução injetável), que foi colocado no substrato alimentar (dieta artificial ou fígado de coelho) de *C. megacephala* em três dosagens: 4,5mg/Kg (DL50/2), 9mg/Kg (DL50 para coelho) e 18mg/Kg (2xDL50). Desta forma, houve quatro tratamentos analisados em dieta artificial: Controle, DL50/2, DL50 e 2xDL50; e dois tratamentos em fígado de coelho: Controle e DL50, sendo montada mais de um réplica para cada substrato alimentar. As larvas durante o desenvolvimento foram mantidas em BOD com temperatura de 27°C e fotoperíodo de 12 horas. A taxa de desenvolvimento larval foi obtida por meio da análise da massa das larvas em intervalos de seis horas, e o tempo total de desenvolvimento de *C. megacephala*, na situação controle, foi de aproximadamente 78 horas. Pode-se observar que os tratamentos com Diazepam diferiram significativamente do controle, havendo um retardo no padrão de desenvolvimento larval da espécie estudada, quando comparado com o controle, em ambos os substratos alimentares (fígado e meio artificial). As larvas que desenvolveram no fígado nos tratamentos utilizados,

apresentaram maior diferença no ganho de massa por tempo entre controle e DL50 que quando comparado com experimentos em meio artificial. Quanto maior a dosagem, maior o atraso na curva de desenvolvimento. Foi observado também efeito significativo do tipo de substrato sobre a massa das larvas durante o desenvolvimento; as que se alimentaram de fígado apresentam maiores massas comparadas às que se alimentaram de meio artificial. Assim pode-se observar que a presença de Diazepam no substrato alimentar de *C. megacephala* aumenta o tempo de desenvolvimento larval, retardando o ganho de massa por tempo, quando comparado ao grupo controle.

Introdução

O uso de tranqüilizantes no tratamento clínico, no controle da ansiedade por meio de substâncias chamadas ansiolíticas, dentre elas os benzodiazepínicos, pode gerar mudanças comportamentais, suicídios e, portanto estar relacionado com a morte destes usuários (BARBONE *et al.*, 1998; BERMAN *et al.*, 2005; BOND, 1998; DIETCH & JENNINGS, 1988; HALL & ZISOOK, 1981; LESTER, 1995; NEUTEL & PATTEN, 1997; SZARA & LUDFORD, 1980; WOODS, *et al.*, 1992). Uma grande quantidade de prescrições e também o uso ilícito de benzodiazepínicos para tratamento de insônia e ansiedade já vêm sendo relatados em diversas partes do mundo (WOODS, *et al.*, 1992), e seu controle se torna difícil devido à regulamentação nos diferentes países (WOODS, 1998). Dentre estes benzodiazepínicos, o Diazepam apresenta um modo de ação relativamente rápido, tornando-se assim uma substância bastante prescrita em clínicas e de freqüente uso ilícito.

Diversas drogas lícitas ou não, utilizadas direta ou indiretamente, vêm sendo encontradas em cadáveres devido ao abuso no uso e podendo estar relacionadas com a morte de pessoas (ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003; CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; POPE & KATZ, 1994). Dependendo a fase de decomposição do corpo, a droga não pode mais ser encontrada facilmente nos tecidos sendo assim, podem-se utilizar larvas de insetos que se desenvolveram no mesmo e verificar ou não a presença da droga nelas (GOFF *et al.*, 1993; INTRONA *et al.*, 2001; NOLTE *et al.*, 1992). No entanto, estas drogas por permanecerem no tecido dos cadáveres por um intervalo de tempo, possibilitando assim sua identificação, têm dificultado a investigação por parte dos peritos devido à ação destas na decomposição do corpo e assim, na estimativa do

intervalo pós-morte (IPM), que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo.

Assim, estudos que procurem avaliar mudanças nas concentrações de determinadas substâncias sobre diferentes órgãos do cadáver, são importantes para a ciência forense. SHIOTA *et al.* (2004) observaram variações na concentração de Diazepam (benzodiazepínico) em diferentes órgãos de rato, logo após sua morte. Esta constatação de variação da concentração de uma droga em um tecido é de extrema importância na estimativa do IPM, pois uma das metodologias mais eficientes na estimativa é a utilização de insetos necrófagos presentes no cadáver (SMITH, 1986). Estes insetos se alimentam do substrato em decomposição durante seu desenvolvimento, podendo assim indicar o intervalo pós-morte (IPM) (CATTS & GOFF, 1992; SMITH, 1986) e a variação da concentração da droga poderia alterar seu desenvolvimento (CATTS, 1992).

Caso haja a presença de alguma substância química no substrato de alimentação larval, esta pode atuar sobre os indivíduos interferindo nos processos de transmissão neural, inibindo ou ativando os mensageiros químicos, causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento dos organismos em contato com a mesma (OMOTO, 2000; HAYNES, 1988), mudanças estas que podem prejudicar a estimativa do IPM (CATTS, 1992; CATTS & GOFF, 1992). Assim os estudos toxicológicos para se verificar a presença de drogas no cadáver e o efeito destas drogas nos insetos são extremamente importantes para a ciência forense, sendo que se podem observar diferentes efeitos de drogas distintas nas diferentes espécies de insetos necrófagos (O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; CAMPOBASSO *et al.*, 2004; BOUREL ET AL., 2001; SADLER *et al.*, 1997; GOFF *et al.*, 1997; GOFF & LORD, 1994; CATTS, 1992).

Já o efeito da presença de benzodiazepínicos no substrato de alimentação larval foi observado por PIEN *et al.* (2004) na mosca *Calliphora vicina*, com alterações na morfologia de larvas e pupas e a taxa de desenvolvimento larval na presença de Nordiazepam. Já CARVALHO *et al.* (2001) observaram que Diazepam acelera o desenvolvimento larval de duas espécies de moscas, *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria*. Estes estudos envolvem a entomotoxicologia, ciência que procura quantificar e analisar o efeito de diferentes drogas sobre os insetos e também na taxa de

desenvolvimento larval (GOFF & LORD, 1994; INTRONA *et al.*, 2001), que é de grande importância numa estimativa mais precisa do intervalo pós-morte (IPM).

Dentre os insetos envolvidos na entomologia forense, a ordem Diptera é uma das mais importantes. As moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Família: Calliphoridae) têm grande importância na entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (BYRD & CASTNER, 2001; GOMES *et al.*, 2003; SMITH, 1986, VON ZUBEN *et al.*, 1996; WELLS & GREENBERG, 1992). A espécie *Chrysomya megacephala* apresenta uma grande importância nos estudos forenses, por ser uma das espécies que primeiro chega aos corpos em decomposição (GUIMARÃES *et al.*, 1978; LOPES DE CARVALHO & LINHARES, 2001) e também por se alimentar dos mesmos durante seu estágio larval.

Desta forma, estudos que observem os efeitos de diferentes drogas em espécies de moscas-varejeiras são importantes para a entomologia forense (entomotoxicologia) e vêm sendo realizados (O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; CAMPOBASSO *et al.*, 2004; BOUREL ET AL., 2001; SADLER *et al.*, 1997; GOFF *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 1994; GOFF & LORD, 1994; CATTS, 1992), mas há a necessidade de mais estudos envolvendo diferentes drogas e espécies de importância forense. Assim, este trabalho procurou verificar a taxa de desenvolvimento larval, por meio da análise da massa larval, de *C. megacephala* em contato com Diazepam (Benzodiazepínico).

Material e Métodos

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para postura pelas fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F₁, sendo que, somente a geração F₂ foi empregada nos experimentos.

Como substratos alimentares para desenvolvimento larval da espécie estudada, foram utilizados: meio artificial, à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982), e fígado de coelho, objetivando uma comparação com os resultados obtidos na dieta artificial.

Análise do desenvolvimento larval

Os ovos desta espécie foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a postura, os ovos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de 27±1°C e fotoperíodo de 12 h) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais.

Nos experimentos com dieta artificial como substrato alimentar, foram formadas densidades de 400 larvas por tratamento, sendo feitos três experimentos (três réplicas), sendo que cada réplica era composta por quatro frascos: três frascos com doses diferentes de Diazepam e um tratamento controle. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em frascos contendo meio artificial (LEAL *et al.*, 1982) (400 larvas em 125 gramas de dieta – 0,31g/larva).

Já a densidade larval nos tratamentos com substrato alimentar fígado de coelho foi de 200 larvas por frasco, devido à menor massa deste substrato alimentar (58,58 ± 4,99g de fígado), em relação à que foi considerada nos frascos com meio artificial (125g). Foram feitas duas réplicas, sendo que cada réplica era composta por dois frascos: um frasco com dose de Diazepam e um tratamento controle. Para obtenção do fígado (substrato alimentar larval), foram utilizados quatro coelhos machos (duas réplicas) obtidos no Biotério Central da Unesp (Botucatu – SP) com massa média de 1,682 Kg ± 141 g, os quais foram mortos mecanicamente e dissecados para retirada do fígado, após a aplicação do tratamento utilizado (controle – sem Diazepam e DL50 de coelho - tratados com Diazepam).

Dados que foram obtidos para desenvolvimento larval

Para a análise do desenvolvimento larval, foram observados valores de massa das larvas, em intervalos de seis horas, até que se completasse o desenvolvimento larval e as mesmas procurassem um local para pupação.

Nestes intervalos de seis horas, a massa foi individualmente registrada para uma amostra aleatória de 10 larvas de cada recipiente, que foram lavadas e secadas antes da pesagem.

Após a pesagem, as larvas foram devolvidas aos respectivos frascos, pois caso fossem retiradas e/ou mortas para avaliação do seu comprimento, a variação na densidade larval (competição intra-específica) seria muito grande, e poderia causar uma resposta na taxa de desenvolvimento larval, como observado por IRELAND & TURNER (2006) e VON ZUBEN (1995), com o nível de agregação larval interferindo nos resultados de competição por alimento, o que dificultaria a análise dos dados sob a influência das drogas presentes.

Doses utilizadas.

Foi utilizado o Diazepam (grupo químico: Benzodiazepínico) (ansiolítico - Diazepam NQ[®] 10mg - solução injetável - LABORATÓRIO NOVAQUÍMICA - ampolas de 2 mL), por causa de sua importância forense, já que está presente em casos de morte de pessoas com necessidade de administração médica desta droga (BERMAN *et al.*, 2005; BOND, 1998; DIETCH & JENNINGS, 1988; LESTER, 1995; HALL & ZISOOK, 1981; SZARA & LUDFORD, 1980).

Os indivíduos utilizados nos diferentes tratamentos tiveram como fonte alimentar a dieta artificial proposta por LEAL *et al.* (1982), a qual possui fontes de proteínas e carboidratos que são necessárias para o desenvolvimento destas larvas de dípteros; ou fígado de coelho, animal modelo em muitos estudos científicos e forenses (DE LETTER *et al.*, 2002).

Assim, o benzodiazepínico foi colocado na dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982) e/ou injetado no coelho. As doses do ansiolítico (Diazepam) utilizadas nos tratamentos foram a DL50 (intravenosa) do animal-teste (coelho), ou seja, 9 mg/Kg (NIOSH, 2004). Foram utilizadas três dosagens no meio artificial: DL50 – coelho = 9mg/Kg, doses com metade da utilizada DL50 (D/2) e doses de duas vezes a DL50 utilizada (2D), sendo que ao controle não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de LEAL *et al.* (1982).

A aplicação do Diazepam no animal-teste foi feita por meio de seringas de vidro de 3 mL, sendo injetado na veia marginal da orelha do animal o volume correspondente

ao seu peso em relação à DL50 (9 mg/Kg – intervalo de tempo da administração: de 2 a 5 minutos). Os animais foram mortos mecanicamente após 45 minutos da administração intravenosa. Para esta análise do desenvolvimento em fígado de coelho, foram feitos apenas dois tratamentos: controle (injetado volume do veículo) e DL50 (Diazepam).

Análise estatística e de outras ferramentas

A análise estatística de todos os dados coletados no desenvolvimento larval desta mosca foi feita no programa SAS[®]. Análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Duncan foram utilizados comparando as médias de massa dos indivíduos nos diferentes tratamentos realizados, utilizando-se nível global de significância de 5%. A variável dependente massa foi utilizada nas comparações entre os tratamentos, réplicas, tempo e suas interações.

Resultados e Discussão

A análise do desenvolvimento larval nos diferentes tratamentos mostrou diferenças estatísticas significativas entre as variáveis e interações obtidas em *C. megacephala*: réplicas (3 réplicas dieta + 2 réplicas fígado) ($F=244,3$; $p<0,0001$), tratamentos (doses) ($F=62,98$; $p<0,0001$), horas ($F=4114,13$; $p<0,0001$); réplica x dose ($F = 6,16$; $p<0,0001$); réplica x hora ($F=52,60$; $p<0,0001$); dose x hora ($F=7,34$; $p<0,0001$).

Pode-se observar que as réplicas utilizadas diferem no padrão de desenvolvimento larval, ou seja, as repetições de experimentos (réplicas) e substratos alimentares foram significativamente diferentes, a massa sofreu influência da réplica feita, assim como a dose também causou efeito no padrão de desenvolvimento. No entanto, quando se analisam diferentes substratos alimentares, as réplicas feitas em fígado foram semelhantes, já os que se desenvolveram em dieta artificial foram significativamente diferentes por análise de comparação múltipla, dados estes que podem ser observados na Tabela 1. Tal diferença pode ter sido causada pela sensibilidade da população à dieta artificial. No entanto, o efeito do Diazepam sobre o desenvolvimento larval nos diferentes substratos alimentares foi semelhante, ou seja, apesar de diferirem significativamente na média de massa, o ansiolítico reduziu o desenvolvimento, como pode ser visualizado na Figura 1 e 2.

TABELA 1. Análise estatística das réplicas e substratos por meio de comparação múltipla de Duncan.

Réplicas				
R1	R2	R3	F1	F2
A	B	C	D	D

R1 – réplica (dieta) 1, R2 – réplica (dieta) 2, R3 – réplica (dieta) 3,
F1 - réplica (fígado) 1 e F2 - réplica (fígado) 2. Letras diferentes indicam diferenças significantes entre as réplicas.

Pela observação dos dados estatísticos das interações [réplica x dose ($F = 6,16$; $p < 0,0001$); réplica x hora ($F = 52,60$; $p < 0,0001$); dose x hora ($F = 7,34$; $p < 0,0001$)], a réplica, a dose e hora utilizadas atuam no padrão de desenvolvimento larval de *C. megacephala* quando se analisa a massa das larvas, e o efeito de cada uma delas depende do efeito da outra, ou seja, dependendo da réplica observada o efeito de um tratamento foi diferente, assim como, as interações entre hora x tratamento e hora x réplica, sendo que este tipo de observação pode ser visualizado nas Figuras 1 e 2 e Tabelas 2, 3.

No entanto, apesar da diferença observada nas réplicas, o padrão geral obtido entre todas elas foi semelhante, ou seja, o ansiolítico alterou o desenvolvimento de forma parecida, ou seja, diminuindo o ganho de massa por intervalo de tempo, quanto maior a dose de Diazepam utilizada. Esta diferença observada entre as réplicas, tratamentos e substratos alimentares pode ser visualizada também nas Figuras 1 e 2 e Tabelas 2 e 3.

Na análise do efeito do Diazepam no desenvolvimento larval de *C. megacephala* foram montadas três réplicas em dieta artificial, sendo obtidos três gráficos, cada um com quatro curvas de desenvolvimento larval nos diferentes tratamentos feitos (controle, D/2, D e 2D) (Figura 1 e Tabela 2). Foi obtido também um gráfico de desenvolvimento larval sem influência de drogas (Figura 1A), por meio de um conjunto de dados de desenvolvimento larval controle. Pode se observar um intervalo de grande desenvolvimento larval entre 42 horas e 72 horas de desenvolvimento, chamado de período de mais rápido crescimento larval (LEVOT *et al.*, 1979).

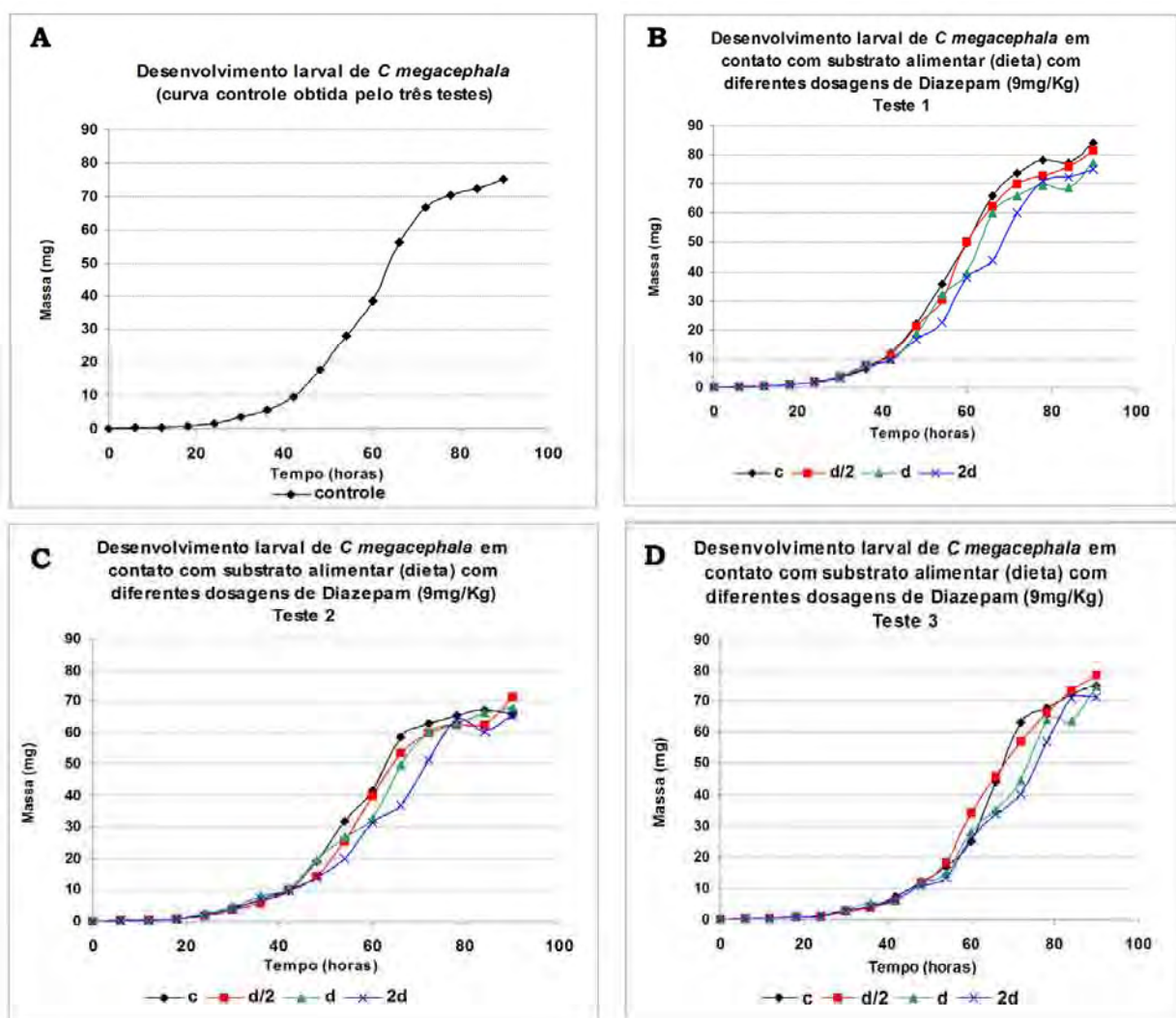


FIGURA 1. Gráficos das curvas de desenvolvimento (massa x tempo) de *C. megacephala* nos diferentes tratamentos, dosagens de Diazepam e réplicas feitas (réplicas). A – Curva do desenvolvimento controle, B – Réplica 1, C – Réplica 2 e D – Réplica 3. C – Controle, D/2 – doses com metade da utilizada D; D - 9mg/Kg e 2D - dose de duas vezes a D.

TABELA 2. Média da massa individual (mg) de 10 indivíduos pesados nos diferentes tratamentos e réplicas por intervalo de tempo utilizado (6 horas). Linhas pontilhadas delimitando o período de maior crescimento larval estabelecido.

horas	Média da massa (mg)											
	R1				R2				R3			
	C	D/2	D	2D	C	D/2	D	2D	C	D/2	D	2D
0	0.14	0.14	0.13	0.12	0.15	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.13	0.14
6	0.22	0.18	0.24	0.25	0.22	0.23	0.25	0.26	0.32	0.28	0.34	0.30
12	0.47	0.52	0.57	0.50	0.49	0.40	0.47	0.52	0.49	0.49	0.49	0.44
18	0.86	0.89	0.90	0.88	0.76	0.93	0.88	0.93	0.96	0.84	0.80	0.70
24	1.59	1.66	2.02	1.86	2.01	1.58	2.45	1.97	1.29	1.08	1.32	1.25
30	3.56	3.70	3.49	3.19	4.48	3.95	4.58	3.81	3.00	2.56	2.96	3.16
36	6.11	7.49	7.59	6.76	6.80	6.14	8.01	7.30	3.89	4.10	5.20	4.27
42	11.66	11.05	9.58	9.49	9.63	9.98	10.51	9.76	7.24	5.88	6.16	6.43
48	22.31	21.35	18.64	16.59	19.17	14.29	19.33	14.09	11.99	11.77	11.68	10.62
54	35.56	30.38	32.20	22.52	31.88	25.29	26.92	19.78	16.74	18.08	14.53	13.42
60	49.61	50.25	39.22	37.96	41.70	39.80	32.58	31.54	24.91	34.09	27.93	26.04
66	65.96	62.53	60.12	43.85	58.58	53.40	49.62	36.96	44.10	45.94	35.18	33.73
72	73.50	69.93	65.91	59.93	62.80	59.75	60.38	51.57	63.25	57.12	44.57	40.27
78	78.19	72.71	69.75	70.83	65.21	62.21	62.86	63.91	68.07	66.08	63.97	56.93
84	77.40	76.16	68.63	72.51	67.07	62.41	66.15	60.16	72.46	73.72	63.69	70.85
90	84.21	81.55	77.28	75.20	65.99	71.51	67.99	65.37	75.45	78.83	75.00	71.24

C – Controle, D/2 – doses com metade da utilizada D; D - 9mg/Kg e 2D - dose de duas vezes a D.

A análise estatística dos dados de desenvolvimento larval de *C. megacephala* em dieta artificial mostrou que as três réplicas são estatisticamente diferentes entre si (Tabela 1). No entanto, o Diazepam causou, nas três réplicas obtidas, um retardo no desenvolvimento larval, diminuindo o ganho de massa por unidade de tempo, como pode ser observado nas curvas com as diferentes doses do ansiolítico (Figura 1B, C e D e comparando-se os dados de média de massa nos intervalos de tempo, na Tabela 2). Foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (C, D/2, D e 2D); R1: (F=24,28; p<0,0001), R2: (F=15,31; p<0,0001), R3: (F=18,33; p<0,0001), ou seja, a presença de Diazepam no substrato alimentar (meio artificial) causou mudanças no desenvolvimento larval de *C. megacephala* nas diferentes doses e na comparação com o controle. Quanto maior a dose de Diazepam oferecida na dieta (tratamentos), maior o retardo no desenvolvimento larval de *C. megacephala*, ou seja, o ganho de massa pelas

larvas por tempo foi proporcionalmente menor quanto maior a concentração da droga (Figura 1 e Tabela 2).

A interação tratamento (dose) x hora em todas as réplicas realizadas foi significativa, R1: ($F=2,77$; $p<0,0001$), R2: ($F=3,39$; $p<0,0001$), R3: ($F=3,74$; $p<0,0001$), ou seja, dependendo do tratamento que se observa, o valor da massa obtida sofre variação conforme a hora observada, ou seja, como pode ser observado também na Figura 1, os tratamentos com Diazepam (principalmente o D/2) apresentam às vezes valores maiores que o controle, e às vezes, menores.

O desenvolvimento larval de *C. megacephala* em fígado de coelho nos dois tratamentos realizados (Controle e DL50 - coelho) e duas réplicas, pode ser observado na Figura 2 e Tabela 3.

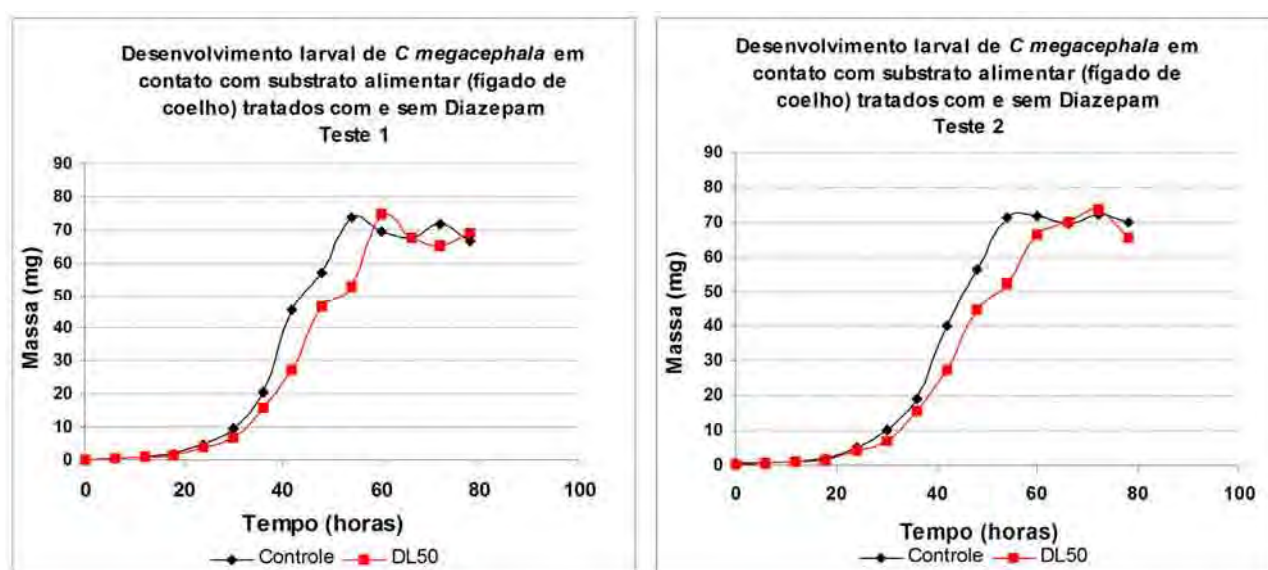


FIGURA 2. Curvas de desenvolvimento (massa x tempo) de *C. megacephala* nos diferentes tratamentos (controle e DL50 Diazepam coelho – 9mg/Kg) e réplicas feitas (réplica). A – Réplica 1 e B – Réplica 2.

Tabela 3. Média da massa individual (mg) de 10 indivíduos pesados nos diferentes tratamentos e réplicas por intervalo de tempo utilizado (6 horas). Linhas pontilhadas delimitam o período de maior crescimento larval estabelecido.

	F1		F2	
	C	D	C	D
0	0.15	0.14	0.33	0.13
6	0.29	0.30	0.30	0.29
12	0.98	0.95	1.00	0.96
18	1.84	1.56	1.85	1.53
24	4.86	3.92	4.93	3.93
30	9.78	6.83	9.82	6.69
36	20.77	15.86	19.09	15.65
42	45.30	27.41	39.94	27.13
48	56.97	46.26	56.57	44.33
54	73.67	52.47	71.22	52.11
60	69.53	74.56	71.66	66.21
66	67.71	67.62	69.34	70.22
72	71.99	65.19	72.12	73.58
78	66.34	69.09	70.12	65.30
84	0.00	0.00	0.00	0.00
90	0.00	0.00	0.00	0.00

C – Controle e D - 9mg/Kg de diazepam.

A análise por meio de comparação múltipla do desenvolvimento larval (massa) em fígado, mostrou que as réplicas realizadas não se diferenciaram estatisticamente (Tabela 1). Entretanto, assim como observado no desenvolvimento com meio artificial, o desenvolvimento larval em fígado de coelho com a droga também sofreu um retardo (Figura 1 e Figura 2), quando comparado com o controle, mas o decréscimo no ganho de massa por tempo, comparando com o controle, foi muito maior neste substrato alimentar, que quando comparado ao meio artificial, como pode ser observado na Figura 2 e na taxa de incremento (Figura 3). Os tratamentos (Controle e DL50) mostraram-se significativamente diferentes nas duas réplicas realizadas (F1[Réplica 1 fígado]: $F=53,91$; $p<0,0001$ e F2 [Réplica 2 fígado]: $F=49,24$; $p<0,0001$). A interação tratamento x hora também mostrou diferenças significativas tanto em F1 ($F=13,05$; $p<0,0001$) quanto em F2 ($F=7,29$; $p<0,0001$), como foi observado no substrato dieta artificial.

Os tratamentos (doses) puderam ser diferenciados nas réplicas realizadas e substratos alimentares, por meio de comparação múltipla, e foi observado que o desenvolvimento larval tornou-se mais diferenciado quanto maior a dose de Diazepam

utilizada no substrato alimentar (Tabela 4). Sendo que o tratamento D/2, em todas as réplicas realizadas em dieta, não se diferenciou do controle, provavelmente pela resistência da espécie e ao pequeno efeito desta baixa concentração do ansiolítico.

TABELA 4. Análise estatística dos tratamentos nos réplicas por meio de comparação múltipla de Duncan.

Tratamento	Réplicas				
	R1	R2	R3	F1	F2
C	A	A	A	A	A
D/2	A	A	A	-	-
D	B	A	B	B	B
2D	C	B	B	-	-

R1 – réplica (dieta) 1, R2 – réplica (dieta) 2, R3 – réplica (dieta) 3,
F1 - réplica (fígado) 1 e F2 - réplica (fígado) 2. Letras diferentes indicam diferenças significantes entre as réplicas e tratamentos.

Pode-se observar também que as réplicas com substrato alimentar fígado de coelho, se diferenciam das réplicas com meio artificial (Tabela 1); as médias obtidas no substrato alimentar fígado de coelho foram maiores quando se compara com as médias em dieta para o mesmo intervalo de tempo (Tabela 2 e 3) e pode-se observar também que o desenvolvimento em fígado foi mais curto que em dieta (Figuras 1 e 2). Assim, o substrato alimentar tem efeito na massa, dependente do tratamento, no desenvolvimento larval de *C. megacephala* ($F=6,16$; $p<0,0001$). Assim, a variação na massa nas diferentes réplicas e tratamentos foi causada pela influência do substrato alimentar utilizado e da dose (tratamento).

Tal variação no desenvolvimento sob diferentes substratos alimentares também foi observada por IRELAND & TURNER (2006) em *Calliphora vomitoria* e por KANESHRAJAH & TURNER (2004) em *Calliphora vicina*, nos quais diferentes grupos de larvas foram tratados com diferentes tecidos (cérebro, músculo, pulmão, fígado) de porcos, e estes grupos tiveram diferenças no tempo de desenvolvimento larval em cada tratamento feito. CLARK *et al.* (2006), observaram a mesma mudança no padrão de desenvolvimento larval em *Lucilia sericata*.

Esta variação no acréscimo de massa por tempo pode ser melhor avaliada, observando-se a taxa de incremento nos diferentes tratamentos feitos, obtida para o intervalo com maior ganho de massa por tempo (chamado de período de mais rápido

crescimento larval). Assim, a Figura 3, a seguir, mostra como este dado variou nos tratamentos observados. Para cálculo desta taxa de incremento, foi utilizada a taxa média de incremento de massa por período (seis horas) em relação à massa final do período de mais rápido crescimento (proposta por VON ZUBEN, 1995).

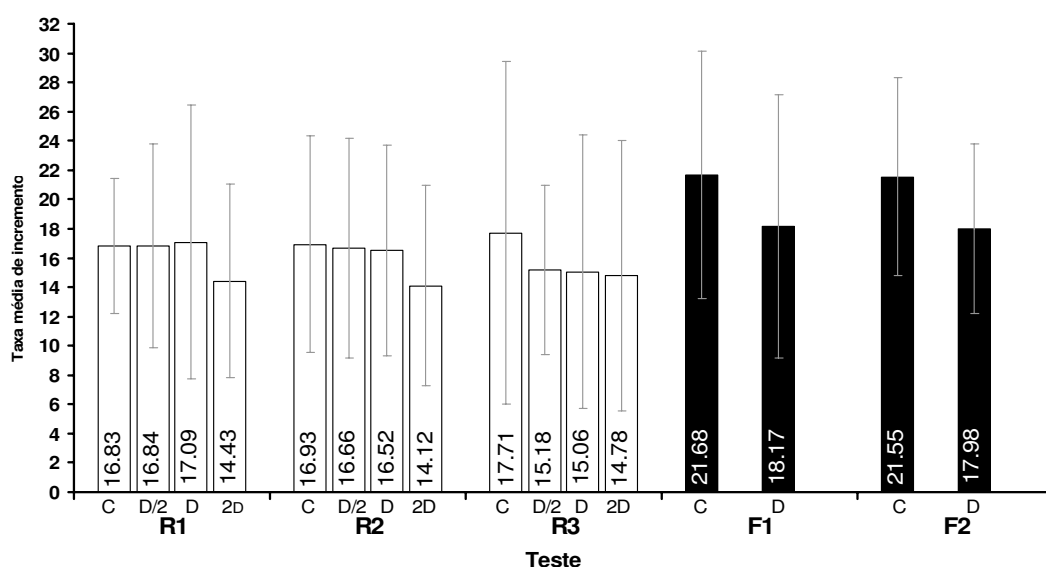


FIGURA 3. Taxa média e desvio padrão do incremento de massa por período em relação à massa final do período de mais rápido crescimento larval. Valores da média das taxas de incremento e barra de desvio padrão. Substrato alimentar larval: meio artificial (R1, R2 e R3) e Fígado de coelho (F1 e F2). Tratamentos C (controle), D/2 (metade DL50 de Diazepam para coelho), D (DL50 coelho) e 2D (dobro DL50 coelho).

Analisando a Figura 3, pode-se perceber que o desvio padrão obtido das taxas de incrementos dos tratamentos não permite tal distinção entre elas, sendo os valores de ganho de massa por tempo parecidos.

Já o período de maior desenvolvimento larval se diferenciam, entre os tratamentos de substratos alimentares, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, em C (dieta) o intervalo é de 32 h até 72 h, enquanto que nos tratamentos com Diazepam (dieta) o intervalo é de 32 h até 84 h. Já nos experimentos com fígado de coelho, em C o intervalo é de 30 h até 54 h, já nos tratamentos com Diazepam (dieta) o intervalo é de 30 h até 60 h. Assim, quando se utiliza o fígado como substrato alimentar, as diferenças entre estas taxas tornam-se ainda maiores, pois o ganho de massa por tempo é maior e o período de desenvolvimento larval é menor. Desta forma, o tempo de desenvolvimento

larval e o intervalo de maior crescimento larval, comparando-se os substratos alimentares utilizados e os diferentes tratamentos se diferenciaram.

Estas variações no tempo de desenvolvimento dos tratamentos entre os diferentes substratos alimentares se devem provavelmente a diferenças físicas e nutricionais entre o fígado e a dieta utilizada e, à densidade de indivíduos utilizada permitindo a formação de agregados larvais diferentes, como observado por VON ZUBEN (1995) e IRELAND & TURNER (2006). No entanto, a densidade utilizada no substrato alimentar fígado foi menor que no meio artificial, mas o desenvolvimento neste substrato foi mais rápido. Diferenças no desenvolvimento larval em aglomerados larvais e tipos de substratos alimentares (fígado, cérebro e músculo) vêm sendo observadas em *Calliphora vomitoria* por IRELAND & TURNER (2006).

No desenvolvimento com fígado, ficou evidente também o comportamento dinâmico do aglomerado larval, sendo que a atividade de movimentação no controle era muito maior que a atividade das larvas que se alimentavam de substrato com Diazepam.

Desta forma, pode-se observar que o este ansiolítico (Diazepam) causou um retardo no desenvolvimento larval de *C. megacephala*, diferentemente do observado em *C. albiceps* e *C. putoria* por CARVALHO *et al.* (2001), em que ambas as espécies sofreram uma aceleração no desenvolvimento larval quando em contato com o Diazepam.

Esta diminuição na atividade talvez fosse causada por mudanças fisiológicas nas larvas em função do benzodiazepínico presente no meio, tendo em vista sua provável atuação sobre o sistema GABAérgico de *C. megacephala*. Os benzodiazepínicos agem interagindo com receptores de neurotransmissores inibitórios diretamente ativados pelo GABA (GOODMAN & GILMAN, 2003). Neste caso, podem potencializar a ação dos neurotransmissores GABA, atuando sobre os receptores GABA_A, ou seja, ocorre um maior influxo de íons cloro para o neurônio pós-sináptico, dificultando assim sua despolarização e conseqüentemente, causando uma diminuição da velocidade de transmissão do impulso neural, o que deprime o sistema nervoso central (GOODMAN & GILMAN, 2003; ROGAWSKI & LOSCHER, 2004).

Os benzodiazepínicos, entre eles o Diazepam, têm efeito sobre o sistema nervoso central de humanos, podendo causar: sedação, hipnose, diminuição da ansiedade, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e atividade anticonvulsivante, além de

vasodilatação coronária e bloqueio neuromuscular em doses muito altas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Este modo de ação dos benzodiazepínicos pode ter causado uma diminuição do metabolismo larval de *C. megacephala* e conseqüentemente uma menor atividade dinâmica do agregado larval em ambos os substratos alimentares, acarretando em um menor ganho de massa por unidade de tempo, como é observado nas curvas de desenvolvimento larval com doses maiores D e 2D, principalmente, as quais se diferenciaram significativamente do controle.

Conclusões

Os resultados do presente estudo mostraram que o Diazepam altera o padrão de desenvolvimento larval de *C. megacephala*, retardando o ganho de massa por tempo. Assim, altera o tempo requerido para o desenvolvimento larval, podendo gerar erros na estimativa do IPM, ao se utilizar técnicas/métodos entomológicos, caso não seja levada em conta a presença desta droga.

São necessários também mais estudos visando avaliar os efeitos deste ansiolítico no metabolismo, nas células e a nível molecular, para uma melhor compreensão dos efeitos gerados no desenvolvimento larval, além de mais estudos com outras espécies de insetos de importância forense com diferentes drogas e doses.

Referencias Bibliográficas

- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- BARBONE, F.; MCMAHON, A.D.; DAVEY, P.G.; MORRIS, A.D.; REID, I.C.; MCDEVITT, D. G.; MACDONALD, T.M. Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. **The Lancet**, 532: 1331-1336, 1998.
- BERMAN, M. E.; JONES, G. D. & MCCLOSKEY, M. S. The effects of diazepam on human self-aggressive behavior. **Psychopharmacology**, 178: 100-106, 2005.
- BOND, A.J. Drug-induced behavioural disinhibition: incidence, mechanisms and therapeutic implications. **CNS Drugs**, 9:41-57, 1998.

- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BYRD, J.H., CASTNER J.L. **Insects of forensic importance**. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Florida, p.43– 79, 2001.
- CAMPOBASSO, C. P.; GHERARDI, M.; CALIGARA, M.; SIRONI, L.; INTRONA, F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **Int. J. Legal Med.** 118: 210-214, 2004.
- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeasten Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annu. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CLARK, K.; EVANS, L. AND WALL. R.. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. **Forensic Sci. Int.**, 156 (2-3): 145-149, 2006.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.
- DE LETTER, E. A., CLAUWAERT, K. M., LAMBERT, W. E., VAN BOCXLAER, J. F., DE LEENHEER, A. P., PIETTE, M. H. Distribution study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. **J. Anal. Toxicol.**, 26 (2): 113-118, 2002.
- DIETCH J.T.; JENNINGS, R.K. Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. **J. Clin. Psychiatry**, 49:184–188, 1988.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of

- the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M. L., BROWN, W. A., OMORI, A. I. & LAPOINTE, D. A. Preliminary observations of effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficollis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of post mortem interval, **J. Forensic Sci.**, 38: 316-322, 1993.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **Goodman e Gilman; as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed., Rio de Janeiro:Mc-Graw-Hill, p. 1647, 2003.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HALL R.C.W., ZISOOK S.. Paradoxical reactions to benzodiazepines. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 11: 45-49, 1981.
- HAYNES, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol.**, 33: 149-168, 1988.
- INTRONA, F., C.P. CAMPOBASSO & M.L. GOFF. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.** 120: 42-47, 2001.
- IRELAND, S. & TURNER, T. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. **Forensic Sci. Int.**, 2006 (in press).
- KANESHRAJAH, G. & TURNER, B.D. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. **Int. J. Legal Medic.**, 118: 242-244, 2004.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LESTER, D. Case consultation: diffusion of responsibility in the care of a difficult patient. **Suicide Life Threat Behav.**, 25: 415-421, 1995.

- LEVOT, G.W., BROWN, K. R., SHIPP, E. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. **Bull. Entomol. Res.**, 69: 469-475, 1979.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- CARVALHO, L. M. & LINHARES, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil, **J. Forensic Sci.**, 46 (3): 604-608, 2001.
- NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.** Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.
- NOLTE, K.B., R.D. PINDER & W.D. LORD. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. **J. Forensic Sci.**, 37: 1179-1185, 1992.
- O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.
- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. **In: Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.
- SADLER, D. W., FUKU, C., COURTE, F. & POUDE, D. J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Sci. Int.**, 71: 191-197, 1995.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481-485, 1997.
- SAS Institute Inc., **SAS User's Guide: Statistics**, Version, 8th Edition, Cary, NC, USA, 2001.

- SHIOTA, H., NAKASHIMA, M., TERAZONO, H., SASAKI, H., NISHIDA, K., NAKAMURA, J. & TANIYAMA, K. Postmortem changes in tissue concentrations of triazolam and diazepam in rats. **Legal Medicine**, 6(4): 224-232, 2004.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- SZARA, S. I. & LUDFORD, J. P. **Benzodiazepines: A Review of Research Results**. NIDA Research Monograph, p.101, 1980.
- VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)**. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WOODS, J. H. Problems and opportunities in regulation of benzodiazepines, **J. Clin. Pharmacol.**, 38: 773-782, 1998.
- WOODS, J. H., Katz, J. L. & Winger, G. Benzodiazepines: Use, Abuse, and Consequences. **Pharmacol. Rev.**, 44(2): 151-347, 1992.

CAPITULO 3

EFEITO DE DIAZEPAM NO DESENVOLVIMENTO LARVAL DE *Musca domestica* (L.) (DIPTERA: MUSCIDAE)

Resumo

Musca domestica (Linnaeus) é uma espécie de distribuição cosmopolita e altamente sinantrópica, sendo bastante estudada e tendo importância médico/sanitária, veterinária e forense. Este muscídeo pode ser encontrado em cadáveres em decomposição tendo potencial uso na entomologia forense na estimativa do IPM (Intervalo Pós-Morte). Tal estimativa se baseia no tempo de desenvolvimento larval do inseto alvo; entretanto, este período do desenvolvimento pode ou não ser alterado quando houver a presença de substâncias químicas junto ao substrato alimentar. Estas substâncias, sendo drogas lícitas ou não, podem ter causado a morte da pessoa ou estarem presentes nos tecidos da vítima por razões médicas. Assim, utilizou-se Diazepam NQ[®] (10mg solução injetável), que foi colocado no substrato alimentar de larvas de *M. domestica* (dieta artificial ou fígado de coelho) em três dosagens: 4,5mg/Kg (DL50/2), 9mg/Kg (DL50 para coelho) e 18mg/Kg (2xDL50). Desta forma, existiram quatro tratamentos analisados em dieta artificial: Controle, DL50/2, DL50 e 2xDL50; e dois tratamentos em fígado de coelho: Controle e DL50, sendo montados mais de um experimento para cada substrato alimentar. As larvas, durante o desenvolvimento, foram mantidas em BOD com temperatura de $27 \pm 0,5^{\circ}$ C e fotoperíodo de 12 horas. A taxa de desenvolvimento larval foi obtida por meio da análise da massa das larvas em intervalos de seis horas, e o tempo total de desenvolvimento, na situação controle, de *M. domestica* foi de aproximadamente 84 horas. O desenvolvimento larval em fígado não foi bem sucedido; após 42 horas de desenvolvimento larval, o aglomerado larval praticamente não existia, ou seja, muitos indivíduos não se desenvolveram e acabaram morrendo devido à baixa densidade larval sobrevivente. Já na dieta artificial, pode-se observar que os tratamentos com Diazepam

diferiram significativamente do controle, havendo um retardo no padrão de desenvolvimento larval da espécie estudada, quando comparado com o controle. Quanto maior a dose, maior o atraso na curva de desenvolvimento. Assim pode-se perceber que a presença de Diazepam no substrato alimentar de *M. domestica* aumenta o tempo de desenvolvimento larval, retardando o ganho de massa por tempo quando comparado ao grupo controle.

Introdução

O gênero *Musca* (Diptera, Muscidae) compreende cerca de 60 espécies encontradas principalmente no Velho Mundo (CARVALHO, 2002; SACCÁ, 1964). Já no Novo Mundo, apenas duas espécies estão presentes, *M. autumnalis* e *M. domestica*, tendo esta última distribuição cosmopolita e não estando presente apenas nas regiões árticas, antárticas e em grandes altitudes (MARICONI *et al.*, 1999). *Musca domestica* provavelmente não é originária do Novo Mundo (LEGNER & MCCOY, 1966), sendo tratada como espécie exótica. É uma espécie altamente sinantrópica e onívora, o que favorece a sua dispersão e distribuição pelos continentes (CARVALHO, 2002; MARICONI *et al.*, 1999). Consequentemente, ela tem uma grande relação com o ambiente humano (GREENBERG, 1971), sendo uma espécie bastante estudada e de importância em várias áreas de pesquisa, como de importância médica, pois este muscídeo pode transportar formas infectantes de muitas doenças humanas e de animais domésticos, podendo ser citadas: febre tifóide, diarreias infantis, carbúnculo, cólera, ascaridíase, coccidioses, poliometrite, etc (MARCONDES, 2001).

Além desta importância médico/sanitária, os nematóides *Habronema muscae* e *H. megastoma*, que podem causar lesões gástricas cutâneas em eqüinos, desenvolvem-se obrigatoriamente em *Stomoxys calcitrans* e *M. domestica*, caracterizando assim sua importância veterinária (MARCONDES, 2001). SUKONTASON *et al.* (2004) observaram ainda a presença de *M. domestica* em cadáveres humanos, indicando seu potencial uso na entomologia forense (BYRD & CASTNER, 2001; SMITH, 1986). Em estudo realizado na Espanha por ARNALDOS *et al.* (2001), *M. domestica* destaca-se entre os insetos necrófagos, sendo uma das primeiras espécies que chegaram à carcaça nas primeiras horas dos dias no verão.

Na entomologia forense, o uso dos insetos pode ajudar os peritos a estimar o intervalo pós-morte (IPM), por meio do estudo do desenvolvimento larval de espécies ou sucessão faunística presente no cadáver (SMITH, 1986). O IPM envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo (CATTS & GOFF, 1992), sendo uma estimativa de extrema importância nas investigações criminais. No entanto, alguns fatores podem prejudicar a estimativa do IPM, tais como se as larvas coletadas tiverem sido dessecadas, congeladas ou contaminadas por substâncias químicas presentes no cadáver (CATTS, 1992; NUORTEVA *et al.*, 1974), como drogas lícitas ou não.

Os diferentes modos de ação de drogas na decomposição do corpo e no ritmo de desenvolvimento de larvas de insetos necrófagos, dentre eles moscas-varejeiras, têm dificultado a investigação por parte dos peritos, da estimativa do IPM (CATTS, 1992; BOUREL *et al.*, 2001; GOFF *et al.*, 1997; GOFF & LORD, 1994; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1997). Casos de mortes de pessoas por utilização de drogas, lícitas ou não, direta ou indiretamente, são comumente relatados (ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003; CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; POPE & KATZ, 1994; PANNELL *et al.*, 2001).

Dentre estas drogas, cabe salientar que em estudos com usuários de benzodiazepínicos (entre eles Diazepam), têm sido observadas mortes ou mudanças de comportamento (BERMAN *et al.*, 2005; BOND, 1998; DIETCH & JENNINGS, 1988; GARDNER & COWDRY, 1985; LESTER, 1995; HALL & ZISOOK, 1981; SZARA & LUDFORD, 1980; WOODS, *et al.*, 1992). Estudos que procuram observar também diferenças na concentração de Diazepam em vários órgãos de rato, logo após sua morte, vêm sendo realizados (SHIOTA *et al.*, 2004), e são de extrema importância para a ciência forense.

Trabalhos que observem o efeito de benzodiazepínicos em moscas de importância forense vêm sendo realizados, PIEN *et al.* (2004) estudaram o efeito de Nordiazepam na morfologia de larvas e pupas, e na taxas de desenvolvimento larval em *Calliphora vicina*. Já CARVALHO *et al.* (2001) observaram que Diazepam acelera o desenvolvimento larval em *Chrysomya albiceps* e *Chrysomya putoria*. Estes estudos envolvem a entomotoxicologia (GOFF & LORD, 1994; INTRONA *et al.*, 2001), ciência que procura quantificar e analisar o efeito de diferentes drogas sobre os insetos (CARVALHO *et al.*, 2001; SADLER *et al.*, 1995) e também na taxa de desenvolvimento larval dos

mesmos (CATTS, 1992; BOUREL *et al.*, 2001; GOFF *et al.*, 1997; GOFF & LORD, 1994; O'BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1997), que é de grande importância numa estimativa mais precisa do intervalo pós-morte (IPM).

A presença de alguma substância química (drogas clínicas ou inseticidas) no substrato de alimentação larval de insetos pode atuar sobre os indivíduos de diferentes espécies interferindo nos processos de transmissão neural, inibindo ou ativando os mensageiros químicos, causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento do organismo em contato com a mesma (OMOTO, 2000; HAYNES, 1988). Estas mudanças podem levar a uma sub - ou super - estimativa do IPM (CATTS, 1992), caso evidências entomológicas sejam utilizadas em investigações médico-criminais e não se considere o efeito de substâncias químicas sobre o desenvolvimento larval destes insetos.

Assim, há a necessidade de estudos que avaliem a presença e os efeitos de diferentes substâncias químicas no substrato alimentar em diferentes espécies de insetos, para que se possa obter uma melhor estimativa do IPM, nos casos em que houver substâncias químicas no cadáver. Este trabalho visa analisar o desenvolvimento de *M. domestica* em diferentes doses de Diazepam, um benzodiazepínico de grande uso clínico.

Material e Métodos

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *M. domestica* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para postura pelas fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção de geração F₁, e somente a geração F₂ foi empregada nos experimentos.

Como substratos alimentares para desenvolvimento larval da espécie estudada, foram utilizados: meio artificial, à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja,

nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982), e fígado de coelho, objetivando uma comparação com os resultados obtidos na dieta artificial.

Condições do desenvolvimento larval

Os ovos desta espécie foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a postura, os ovos foram separados e mantidos em placas de Petri com papel de filtro umedecido e colocados em BOD (temperatura de 27±1°C e fotoperíodo de 12 h) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais.

Nos experimentos com substrato alimentar - meio artificial, foram formadas densidades de 400 larvas por tratamento, sendo feitos dois experimentos (duas réplicas), sendo que cada réplica era composta por quatro frascos: três frascos com doses diferentes de Diazepam e um controle. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em frascos contendo meio artificial (LEAL *et al.*, 1982) (400 larvas em 125 gramas de dieta – 0,31g/larva).

Já a densidade larval nos tratamentos com substrato alimentar - fígado de coelho - foi de 200 larvas por frasco, devido à menor massa deste substrato alimentar (58,58 ± 4,99g de fígado), em relação à que foi considerada nos frascos com meio artificial (125g). Foram montados dois experimentos (réplicas), sendo que cada réplica era composta por dois frascos: um com Diazepam e um tratamento controle. Para obtenção do fígado (substrato alimentar larval), foram utilizados quatro coelhos machos obtidos no Biotério Central da Unesp (Botucatu – SP) com massa média de 1,682 Kg ± 141 g, os quais foram mortos mecanicamente e dissecados para retirada do fígado, após a aplicação do tratamento utilizado (controle – sem Diazepam e DL50 de coelho - tratados com Diazepam).

Droga utilizada e tratamentos considerados

Foi utilizado o Diazepam (grupo químico: Benzodiazepínico) (ansiolítico - Diazepam NQ 10mg - solução injetável - LABORATÓRIO NOVAQUÍMICA - ampolas de 2 mL), por causa de sua importância forense, pois pode estar presente nos tecidos de pessoas que utilizam esta droga (BARBONE *et al.*, 1998; BERMAN *et al.* 2005; BOND,

1998; DIETCH & JENNINGS, 1988; GARDNER & COWDRY, 1985; LESTER, 1995; HALL & ZISOOK, 1981; SZARA & LUDFORD, 1980).

O Diazepam atua no sistema nervoso e apesar de ser muito estudado nos seres humanos, ainda necessita de mais investigações para melhor compreensão de sua atuação neural (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004). Cabe aqui salientar que estudos sobre o efeito desta substância em insetos são escassos.

Os indivíduos utilizados nos diferentes tratamentos tiveram como fonte alimentar a dieta artificial proposta por LEAL *et al.* (1982), a qual possui fontes de proteínas e carboidratos que são necessárias para o desenvolvimento destas larvas de dípteros; ou fígado de coelho, animal modelo em muitos estudos científicos e forenses (DE LETTER *et al.*, 2002).

Assim, o benzodiazepínico foi colocado na dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982) e/ou injetado no coelho, imitando situação em que pode estar presente no corpo da vítima (cadáver) em investigações médico-criminais. As doses de Diazepam utilizadas nos tratamentos foram relacionadas à DL50 (intravenosa) do animal-teste (coelho), ou seja, 9 mg/Kg (NIOSH, 2004). Foram utilizadas três dosagens no meio artificial: DL50 – coelho = 9mg/Kg, doses com metade da utilizada DL50 (D/2) e doses de duas vezes a DL50 utilizada (2D), sendo que ao controle não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de LEAL *et al.* (1982).

A aplicação do Diazepam no animal-teste foi feita por meio de seringas de vidro de 3 mL, sendo injetado na veia marginal da orelha do animal o volume correspondente ao seu peso em relação à DL50 (9 mg/Kg – intervalo de tempo da administração: de 2 a 5 minutos). Os animais foram mortos mecanicamente após 45 minutos da administração intravenosa. Para esta análise do desenvolvimento em fígado de coelho, foram feitos apenas dois tratamentos: controle (injetado solução fisiológica 0,9% NaCl) e DL50 (Diazepam).

Dados obtidos na análise do desenvolvimento larval

Para a análise do desenvolvimento larval, foram observados valores de massa das larvas, em intervalos de seis horas, começando com larvas recém-eclodidas até que se completasse o desenvolvimento larval e as mesmas procurassem um local para pupação.

Nestes intervalos de seis horas, a massa foi individualmente registrada para uma amostra aleatória de 10 larvas de cada recipiente, que foram lavadas e secadas antes da pesagem.

Após a pesagem, as larvas foram devolvidas aos respectivos frascos, pois caso fossem retiradas e/ou mortas para avaliação do seu comprimento, a variação na densidade larval (competição intra-específica) seria muito grande, e poderia causar uma resposta na taxa de desenvolvimento larval, como observado por IRELAND & TURNER (2006) e VON ZUBEN (1995), o que dificultaria a análise dos dados sob a influência das drogas presentes.

Análise estatística e utilização de ferramentas computacionais

A análise estatística de todos os dados coletados no desenvolvimento larval desta mosca foi feita no programa SAS[®]. Análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Duncan foram utilizados comparando as médias de massa dos indivíduos nos diferentes tratamentos realizados, utilizando nível de significância de 5%. A variável dependente massa foi utilizada nas comparações entre os tratamentos, réplicas, tempo e suas interações.

Resultados e discussão

O desenvolvimento larval de *M. domestica* no substrato alimentar fígado de coelho, nos diferentes tratamentos (controle e DL50-coelho), não foi bem sucedido, como pode ser observado na figura 1. Pôde-se observar que, após 42 horas de desenvolvimento larval, o aglomerado larval praticamente não existia, ou seja, muitos indivíduos não se desenvolveram e acabaram morrendo, talvez pela baixa densidade larval de *M. domestica* formando o aglomerado, o que pode dificultar o desenvolvimento larval, como já observado por IRELAND & TURNER (2006) e VON ZUBEN (1995) em moscas-varejeiras, ou talvez pelo tipo de substrato alimentar disponível à espécie, que pode não ter sido muito atrativo para este muscídeo.

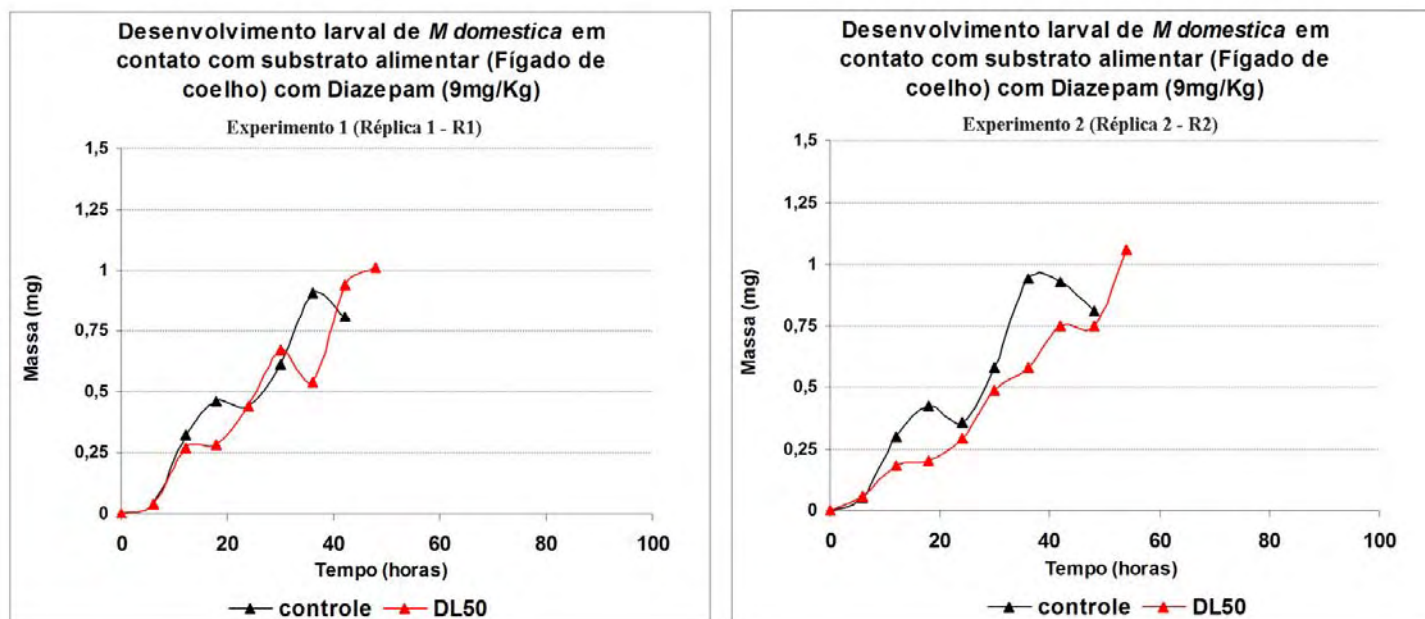


FIGURA 1. Gráficos das curvas de desenvolvimento (massa x tempo) de *M. domestica* nos diferentes tratamentos (controle e DL50 Diazepam coelho – 9mg/Kg) e réplicas feitas (réplica). A – Réplica 1 e B – Réplica 2.

Já a análise do desenvolvimento larval de *M. domestica* em meio artificial (substrato alimentar) nos diferentes tratamentos foi bem sucedida, e mostrou diferenças estatísticas significativas entre algumas variáveis e interações observadas: réplicas ($F = 12,12$; $p = 0,0005$), tratamento (dose) ($F = 67,42$; $p = 0,0001$), horas ($F = 1104,75$; $p = 0,0001$); réplica x tratamento ($F = 3,10$; $p = 0,0246$); réplica x hora ($F = 1,05$; $p = 0,4049$); tratamento x hora ($F = 5,45$; $p = 0,0001$). Pode-se observar que as réplicas e os tratamentos foram significativamente diferentes, quando se avalia a variável dependente massa; desta forma, a presença do Diazepam e as réplicas apresentaram influências sobre a massa dos indivíduos, como pode também ser observado na Figura 2 e Tabela 1, ou seja, o ansiolítico causou significativa redução no ganho de massa por intervalo de tempo. Estas diferenças nos valores e nas curvas obtidas pelas médias de massa nos tratamentos e réplicas podem ser visualmente diferenciadas pela Tabela 1 e Figura 2.

Pela análise das interações pode-se constatar, utilizando um nível de significância de 5%, que a distinção entre as massas é causada pelo tratamento e pela réplica; assim, o efeito das doses de Diazepam causou mudanças nos valores de massa, mas dependente de qual réplica é analisada. No entanto, utilizando-se um nível de significância de 1%, não se pode fazer tal afirmação. Assim, a réplica e o tratamento podem atuar conjuntamente nos valores de massa obtidos. Esta possível distinção

significativa na interação réplica x tratamento pode ser explicada provavelmente pelo desenvolvimento larval observado em D/2 quando se comparam as réplicas (Figura 2). Este tratamento na R1 apresentou valores em intervalos de tempo de taxa de desenvolvimento maiores que o obtido no controle, fato que não foi observado em R2.

Já interação réplica x hora não foi significativamente diferente, mostrando que a média das massas nas diferentes horas analisadas não depende da réplica observada, ou seja, os valores são iguais.

Assim, pode-se perceber que existe um efeito da dose (Tratamento) de Diazepam sobre o desenvolvimento larval, dependendo da réplica que se observa, e esta diferença pode ser melhor visualizada no decorrer do tempo observado, como demonstrado na Figura 2, que mostra as duas réplicas (teste inicial e réplica) e suas curvas de desenvolvimento larval de *M. domestica*, em dieta artificial nos diferentes tratamentos (controle, D/2, D e 2D) com/sem Diazepam, além do gráfico de desenvolvimento larval sem influência de drogas (Figura 2A).

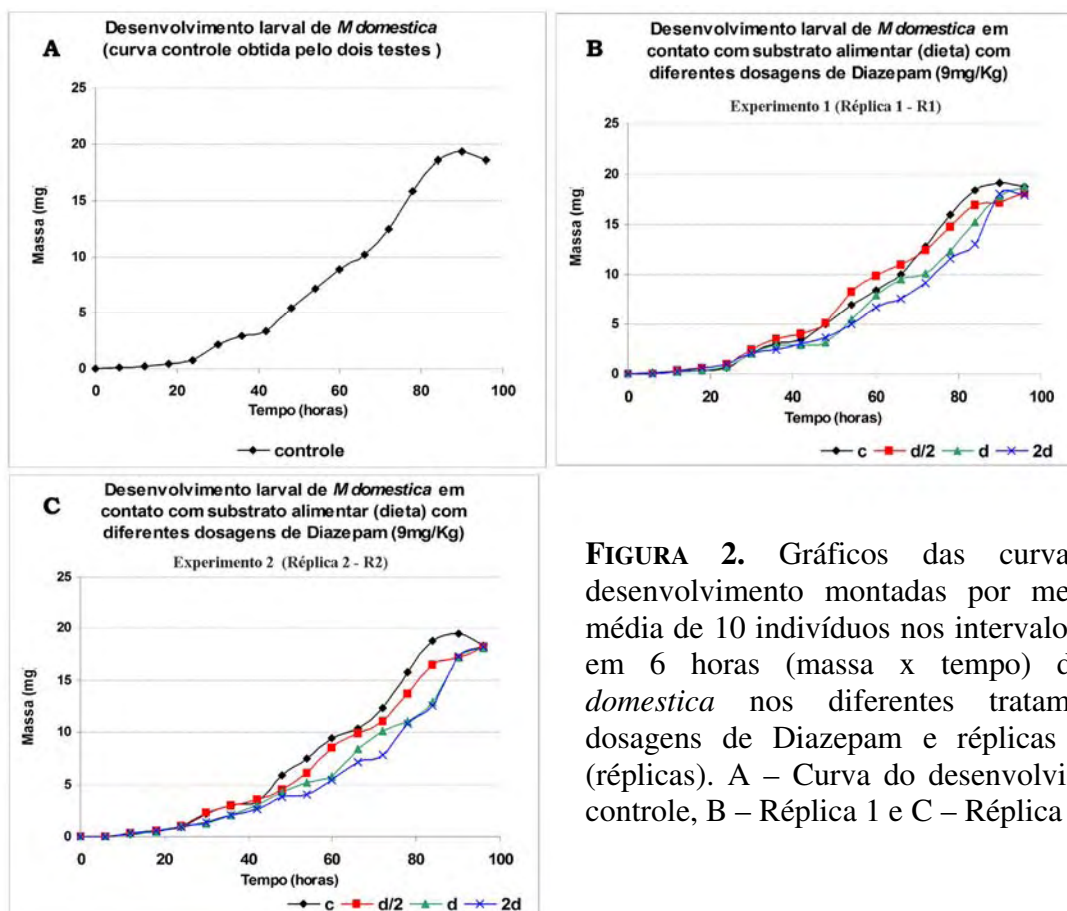


FIGURA 2. Gráficos das curvas de desenvolvimento montadas por meio da média de 10 indivíduos nos intervalos de 6 em 6 horas (massa x tempo) de *M. domestica* nos diferentes tratamentos, dosagens de Diazepam e réplicas feitas (réplicas). A – Curva do desenvolvimento controle, B – Réplica 1 e C – Réplica 2

Analisando-se os gráficos obtidos (Figura 2), pôde-se observar um retardo no desenvolvimento larval de *M. domestica* quando o substrato alimentar possui a Diazepam nos duas réplicas realizadas, principalmente em D e 2D, sendo significativas a diferenças entre os tratamentos ($F = 12,12$; $p = 0,0005$); e quanto maior a concentração da substância psicotrópica, menor o ganho de massa pelas larvas no decorrer do intervalo de tempo observado (Tabela 1).

O tempo de desenvolvimento larval e o intervalo de maior crescimento larval, comparando-se os tratamentos, também foram alterados, como pode ser observado na Tabela 1. O intervalo de maior crescimento larval no controle e DL/2 foi entre 48 e 84 horas; já nos tratamentos D e 2D entre 48 e 90 horas, sendo que a partir de 90 horas, a média de massa nos tratamentos é similar (Figura 2 e Tabela 1).

TABELA 1. Média da massa (mg) individual de 10 indivíduos pesados nos diferentes tratamentos e réplicas por intervalo de tempo utilizado (6 horas). Linhas pontilhadas delimitando o período de maior crescimento larval estabelecido.

horas	R1				R2			
	C	D/2	D	2D	C	D/2	D	2D
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.08	0.06	0.05	0.04	0.03	0.04	0.03	0.04
12	0.25	0.38	0.28	0.29	0.27	0.36	0.32	0.37
18	0.39	0.60	0.38	0.58	0.57	0.60	0.51	0.56
24	0.57	1.02	0.72	0.93	0.94	1.06	1.02	0.95
30	2.10	2.42	2.03	2.03	2.22	2.29	1.31	1.44
36	3.00	3.57	2.88	2.42	2.96	2.95	2.04	2.08
42	3.37	4.02	2.96	3.05	3.32	3.59	2.99	2.61
48	5.06	5.15	3.16	3.70	5.83	4.45	4.28	3.84
54	6.92	8.24	5.54	4.98	7.46	6.06	5.15	4.04
60	8.46	9.88	7.88	6.75	9.43	8.57	5.71	5.41
66	9.97	10.99	9.48	7.56	10.39	9.95	8.40	7.13
72	12.77	12.49	10.11	9.18	12.27	11.01	10.12	7.82
78	15.98	14.78	12.34	11.63	15.78	13.74	11.09	10.86
84	18.47	16.98	15.27	13.08	18.81	16.48	12.86	12.59
90	19.13	17.23	17.84	18.06	19.48	17.16	17.21	17.26
96	18.80	18.18	18.73	17.98	18.30	18.21	18.09	18.23

R1 – Réplica 1, **R2** – Réplica 2, **C** – Controle, **D/2** – metade da DL50, **D** – DL50 de diazepam para coelho, **2D** – o dobro da DL50.

Diferenças significativas entre os tratamentos foram observadas nas duas réplicas montadas: R1 ($F = 32,87$; $p = 0,0001$) e R2 ($F = 35,86$; $p = 0,0001$) e por meio de comparação múltipla, pode-se observar que quanto maior a dose utilizada do ansiolítico, maior a chance de se diferenciar do controle (Tabela 2). Tendo em vista que os tratamentos D e 2D, nas duas réplicas realizadas, se diferenciaram do controle, assim a presença do Diazepam no substrato alimentar alterou o padrão de desenvolvimento larval de *M. domestica*, diminuindo o ganho de massa por tempo principalmente no período de mais rápido crescimento (Figura 2 e Tabela 1).

TABELA 2. Análise estatística dos tratamentos nas réplicas por meio de comparação múltipla de Duncan. Letras diferentes indicam diferenças significantes na massa dos indivíduos entre os tratamentos.

Tratamento	Réplicas	
	R1	R2
C	A	A
D/2	A	B
D	B	C
2D	C	C

R1 – réplica (dieta) 1, R2 – réplica (dieta) 2

Estas respostas foram causadas provavelmente pela ação do Diazepam sobre o metabolismo deste inseto, alterando a atividade metabólica larval e conseqüentemente o ganho de massa por tempo. Tal variação no acréscimo de massa por tempo pode também ser avaliada, observando-se a taxa de incremento nos diferentes tratamentos feitos, obtida para o intervalo com maior ganho de massa por tempo (chamado de período de mais rápido crescimento larval). Assim, a Figura 3 a seguir, mostra como este dado variou nos tratamentos observados. Para cálculo desta taxa de incremento, foi utilizada a taxa média de incremento de massa por período (6 horas) em relação à massa final do período de mais rápido crescimento (proposta por VON ZUBEN, 1995).

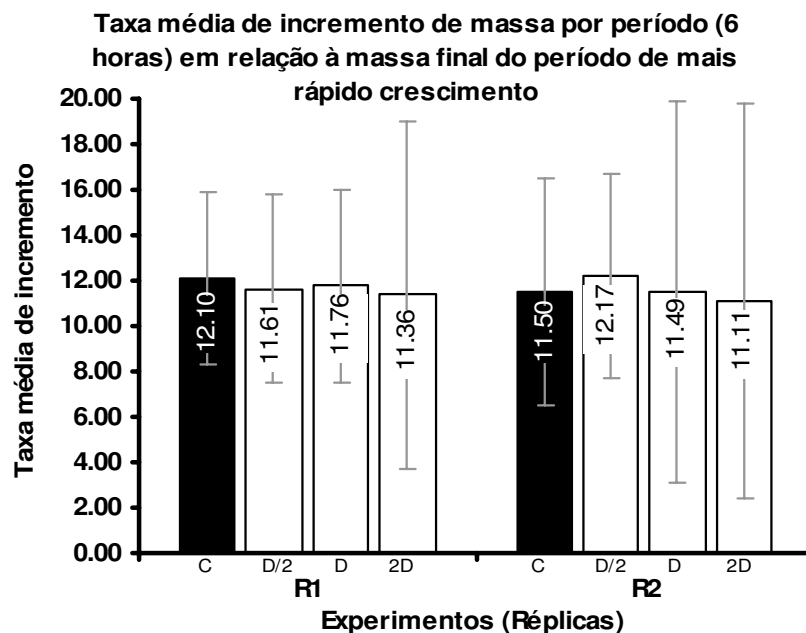


Figura 3. Taxa média de incremento de massa por período em relação à massa final do período de mais rápido crescimento larval. Valores da média das taxas de incremento e barra do desvio padrão. Tratamentos C (controle), D/2 (metade DL50 de Diazepam para coelho), D (DL50 coelho) e 2D (dobro DL50 coelho).

Pode-se observar que quando se aumenta a dose de Diazepam no substrato alimentar, a taxa de incremento não se torna significativamente diferente entre os tratamentos (Tabela 3), mas podem-se observar alterações no desvio padrão entre os tratamentos, principalmente comparando-se 2D com C e D/2. No entanto, como já foi discutido, a análise da massa individual nos diferentes tratamentos mostrou diferença significativa. Pode-se observar na Figura 2 e nas análises estatísticas que o Diazepam reduziu o ganho de massa nos tratamentos em comparação ao controle, alterando assim, o padrão de desenvolvimento larval. Mas esta variação não foi observada nas taxas de incremento que mostram o ganho de massa durante o período de mais rápido crescimento; isto deve ter relação com o fato dos valores de taxa de incremento terem sido obtidos em intervalos muito pequenos (6 em 6h).

Além disso, analisando o desvio padrão na Figura 3 e as curvas dos tratamentos na Figura 2 pode perceber também, que quando se aumenta a dose do benzodiazepínico, maior é o desvio padrão obtido no período, e há uma “ondulação” na curva de desenvolvimento quando o Diazepam está presente, diferentemente do observado no tratamento controle. No controle, o período de mais rápido crescimento apresenta taxas

de desenvolvimento mais constantes (sem as ondulações), havendo uma maior uniformidade no ganho de massa durante os intervalos analisados (6 h) (fato constatado também pelo desvio padrão menor). Assim, a presença do Diazepam acarreta uma maior irregularidade no ganho de massa, provavelmente ocasionada pela sensibilidade à droga dos indivíduos analisados nas diferentes fases do desenvolvimento, o que causaria uma maior variação na amostragem, que é visualizada nos desvios padrão e nas curvas de desenvolvimento.

Esta diminuição na atividade talvez seja causada por mudanças fisiológicas nas larvas em função do benzodiazepínico presente no meio, tendo em vista sua provável atuação sobre o sistema GABAérgico deste inseto. Os benzodiazepínicos agem interagindo com receptores de neurotransmissores inibitórios diretamente ativados pelo GABA (GOODMAN & GILMAN, 2003). Neste caso, podem potencializar a ação dos neurotransmissores GABA, atuando sobre os receptores GABA_A, ou seja, ocorre um maior influxo de íons cloro para o neurônio pós-sináptico, dificultando assim sua despolarização e conseqüentemente, causando uma diminuição da velocidade de transmissão do impulso neural, o que deprime o sistema nervoso central (GOODMAN & GILMAN, 2003; ROGAWSKI & LOSCHER, 2004).

Os benzodiazepínicos, entre eles o Diazepam, têm efeito sobre o sistema nervoso central, podendo causar em humanos: sedação, hipnose, diminuição da ansiedade, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e atividade anticonvulsivante, além de vasodilatação coronária e bloqueio neuromuscular em doses muito altas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Este modo de ação dos benzodiazepínicos pode ter causado uma diminuição do metabolismo larval de *M. domestica* e, conseqüentemente, uma menor atividade dinâmica do agregado larval em ambos os substratos alimentares, acarretando em um menor ganho de massa por unidade de tempo, como é observado, principalmente, nas curvas de desenvolvimento larval com doses maiores D e 2D, as quais se diferenciaram significativamente do controle.

Conclusões

A presença do Diazepam no substrato alimentar larval alterou o padrão de desenvolvimento larval de *M. domestica*, retardando o ganho de massa por tempo. Assim, altera o tempo requerido para o desenvolvimento larval, podendo gerar erros na estimativa do IPM, ao se utilizar técnicas/métodos entomológicos, sem levar em conta a presença desta droga. No entanto, são necessários também estudos para avaliar os efeitos deste ansiolítico e de outras drogas no metabolismo, nas células e a nível molecular, para uma melhor compreensão dos efeitos gerados no desenvolvimento larval, em diferentes espécies de importância forense.

Referências Bibliográficas

- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- ARNALDOS, I; ROMERA E.; GARCÍA, M. D. & LUNA, A. An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the southeastern Iberian peninsula. **Int. J. Legal Med.** 114: 156–162, 2001.
- BARBONE, F.; MCMAHON, A.D.; DAVEY, P.G.; MORRIS, A.D.; REID, I.C.; MCDEVITT, D. G.; MACDONALD, T.M. Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. **The Lancet**, 532: 1331-1336, 1998.
- BERMAN, M. E.; JONES, G. D. & MCCLOSKEY, M. S. The effects of diazepam on human self-aggressive behavior. **Psychopharmacology**, 178: 100-106, 2005.
- BOND, A.J. Drug-induced behavioural disinhibition: incidence, mechanisms and therapeutic implications. **CNS Drugs**, 9:41–57, 1998.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BYRD, J.H., CASTNER J.L. **Insects of forensic importance**. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Florida, p.43– 79, 2001.
- CARVALHO, C. J.; B. **Muscidae (Diptera) of Neotropical Region – Taxonomy**. Ed. UFPR, Curitiba, p.287, 2002

- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeasten Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.
- DE LETTER, E. A., CLAUWAERT, K. M., LAMBERT, W. E., VAN BOCXLAER, J. F., DE LEENHEER, A. P., PIETTE, M. H. Distribution study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. **J. Anal. Toxicol.**, 26 (2): 113-118, 2002.
- DIETCH J.T.; JENNINGS, R.K. Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. **J. Clin. Psychiatry**, 49:184–188, 1988.
- GARDNER, D.L & COWDRY R.W. (1985) Alprazolam-induced dyscontrol in borderline personality disorder. **Am. J. Psychiatry**, 142: 98–100, 1985.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **Goodman e Gilman; as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed., Rio de Janeiro:Mc-Graw-Hill, p. 1647, 2003.
- GREENBERG, B. **Flies and Disease. Classification and Biotic Associations**, Princeton University, New Jersey, p. 856, 1971.
- HALL R.C.W., ZISOOK S.. Paradoxical reactions to benzodiazepines. **Br. J. Clin. Pharmacol**, 11: 45–49, 1981.

- HAYNES, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol.**, 33: 149-168, 1988.
- INTRONA, F., C.P. CAMPOBASSO & M.L. GOFF. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.** 120: 42-47, 2001.
- IRELAND, S. & TURNER, T. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. **Forensic Sci. Int.**, 2006 (in press).
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LEGNER, E. F. & MCCOY, C. W. The house fly *Musca domestica* Linnaeus as an exotic species in the Western Hemisphere incites biological control studies. **Can. Entomol.**, 98(3): 243-248, 1966.
- LESTER, D. Case consultation: diffusion of responsibility in the care of a difficult patient. **Suicide Life Threat Behav.**, 25: 415–421, 1995.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MARICONI, F. A. M., GUIMARÃES, J. H. & BERTI-FILHO, E. A mosca domestica e algumas outras moscas nocivas. FEALQ, Piracicaba, p. 135, 1999.
- NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances.** Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.
- NUORTEVA, P.; SCHUMANN, H.; ISOKOSKI, M. & LAIAHO, K. Studies on the possibilities of using blowflies (Diptera: Calliphoridae) as medicolegal indicators in Finland. **Ann. Ent. Fenn.**, 40: 70-74, 1974.
- O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.
- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. **In: Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.

- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.
- SACCÁ, G. Comparative bionomics in the genus *Musca*. **Ann. Rev. Entomol.**, 9:341-358, 1964.
- SADLER, D. W., FUKU, C., COURTE, F. & POUDEY, D, J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Sci. Int.**, 71: 191-197, 1995.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481–485, 1997.
- SHIOTA, H., NAKASHIMA, M., TERAZONO, H., SASAKI, H., NISHIDA, K., NAKAMURA, J. & TANIYAMA, K. Postmortem changes in tissue concentrations of triazolam and diazepam in rats. **Legal Medicine**, 6(4): 224-232, 2004.
- SMITH, K. G. V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- SUKONTASON, K., SUKONTASON, K. L., PIANGJAI, S., BOONCHU, N., KURAHASHI, H., HOPE, M. & OLSON, J. K. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. **Micron**, 35: 391–395, 2004.
- SZARA, S. I. & LUDFORD, J. P. **Benzodiazepines: A Review of Research Results**. NIDA Research Monograph, p.101, 1980.
- VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)**. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WOODS, J. H., Katz, J. L. & Winger, G. Benzodiazepines: Use, Abuse, and Consequences. **Pharmacol. Rev.**, 44(2): 151-347, 1992.

CAPÍTULO 4

Efeito do Diazepam na dispersão larval pós-alimentar de
Chrysomya megacephala (F.) (Diptera: Calliphoridae).

Resumo

As larvas de *Chrysomya megacephala*, após a exaustão dos recursos alimentares, abandonam o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação, processo chamado de dispersão larval pós-alimentar. No entanto, a fonte alimentar larval pode estar contaminada com substâncias químicas. Assim, utilizou-se no presente trabalho o Diazepam (antidepressivo – Diazepam NQ 10mg - injetável), para avaliar o efeito no comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *Chrysomya megacephala*, pois esta substância pode interferir nos processos neurológicos, inibindo ou hiperativando os neuro-transmissores, podendo causar mudanças fisiológicas (no desenvolvimento e no comportamento), as quais têm importância na estimativa do IPM (intervalo pós-morte - ciência forense). A dispersão pós-alimentar larval foi analisada em quatro arenas circulares (quatro tratamentos) preenchidas com areia, com diâmetro de 30 cm e profundidade de 10 cm. Os tratamentos em dieta artificial, foram: Controle, DL50 de Diazepam para coelho (9mg/Kg), metade da DL50 - coelho e o dobro da DL50 – coelho; já no fígado, apenas tratamento controle e DL50. O Diazepam foi colocado na dieta artificial ou aplicado no coelho. As larvas que se desenvolveram nestes substratos alimentares, ao atingirem o 3º instar, foram soltas no centro das arenas (100 larvas liberadas em cada tratamento), e posteriormente, após a formação das pupas, os dados referentes à profundidade e ao posicionamento de cada pupa na arena foram analisados. Foi observado nos tratamentos com Diazepam, que a profundidade de enterramento e a distância das pupas do centro de irradiação foram menores que quando comparado à arena controle. Tais variações na dispersão foram provavelmente causadas por mudanças sensoriais e motoras em virtude da droga utilizada.

Introdução

As moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Família: Calliphoridae) são originárias do Velho Mundo e Australásia (GUIMARÃES *et al.*, 1978, 1979) e têm grande importância médico-sanitária (GUIMARÃES *et al.*, 1983; FURLANETTO *et al.*, 1984; ZUMPT, 1965) e forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (GOMES *et al.*, 2003; VON ZUBEN *et al.*, 1996; WELLS & GREENBERG, 1992). A espécie *C. megacephala* foi recentemente introduzida no Brasil e descoberta na região sudeste na década de 70 (GUIMARÃES *et al.*, 1978; LAURENCE, 1981), e apresenta uma grande importância nos estudos forenses, por ser uma das espécies que primeiro chega aos corpos em decomposição (GUIMARÃES *et al.*, 1978; LOPES DE CARVALHO & LINHARES, 2001).

As moscas-varejeiras utilizam-se destes substratos discretos e efêmeros (corpos em decomposição), para posturas dos ovos pelas fêmeas e para alimentação das larvas (HANSKI, 1987; PESCHKE *et al.*, 1987), tendo assim importante papel da estimativa do intervalo pós-morte (IPM) em humanos, que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo, dado de extrema importância nas investigações criminais (SMITH, 1986).

O estágio larval é o principal período em que ocorre limitação de recursos alimentares em moscas-varejeiras (LOMINICKI, 1988), e a competição por esses recursos é geralmente do tipo exploratória (REIS *et al.*, 1994), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (ULLYETT, 1950). Após essa competição, as larvas começam a procurar por um sítio de pupação no habitat, ou por mais fonte de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, e esse processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG, 1990).

Alguns estudos de dispersão larval em califorídeos vêm sendo realizados desde os trabalhos de GRENN (1951) e de NUORTEVA (1977), como o de GREENBERG (1990), e outros envolvendo modelos, como os de dispersão larval pós-alimentar em ambiente restrito a uma única direção que se basearam em equações de difusão (BASSANEZI *et al.*, 1997), análises estatísticas (GODOY *et al.*, 1995; GODOY *et al.*, 1996; VON ZUBEN *et al.*, 1996), sob o enfoque de interações não-locais (BOLDRINI *et al.*, 1997), e através da

análise de dispersão em arenas circulares para pupação (GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2005).

Além disso, estudos de dispersão e outros que observem tipos de comportamentos espaço-temporais, muito comuns em ecologia populacional, vêm utilizando modelagens físico/matemáticas e simulações de fenômenos em sistemas complexos, para melhor compreensão e interpretação dos dados observados (TEWS *et al.*, 2004; ZIV, 1998), tendo em vista a grande quantidade de variáveis envolvidas e a interação existente entre as mesmas.

No entanto, ainda não existem trabalhos que observem o comportamento de dispersão larval e conseqüente padrão de distribuição espacial nos sítios de pupação, de indivíduos em contato com fontes alimentares e/ou substratos de pupação com substâncias químicas (inseticidas ou drogas lícitas ou não), as quais podem influenciar neste e em outros comportamentos. Estas substâncias químicas podem interferir nos processos neurais, inibindo ou hiperativando os mensageiros químicos (neurotransmissores), causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento do organismo em contato com a mesma (OMOTO, 2000).

Na ciência forense, casos de mortes de pessoas por utilização de drogas lícitas ou não, direta ou indiretamente (ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003; CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; POPE & KATZ, 1994) têm dificultado a investigação por parte dos peritos devido à ação destas drogas na decomposição do corpo e no ritmo de desenvolvimento de larvas de insetos necrófagos (CATTS, 1992; BOUREL *et al.*, 2001; GOFF *et al.*, 1997; GOFF & LORD, 1994; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1997).

Suicídios, mortes ou mudanças de comportamento em usuários de benzodiazepínicos (entre eles Diazepam), têm sido observados em vários estudos (BERMAN *et al.* 2005; BOND, 1998; DIETCH & JENNINGS, 1988; GARDNER & COWDRY, 1985; HALL & ZISOOK, 1981; LESTER, 1995; SZARA & LUDFORD, 1980; WOODS, *et al.*, 1992). Estudos que procuram observar também mudanças na concentração de Diazepam em diferentes órgãos de rato, logo após sua morte, vêm sendo realizados (SHIOTA *et al.*, 2004), e são de extrema importância para a ciência forense.

Dentre estes benzodiazepínicos, PIEN *et al.* (2004) observaram mudanças na morfologia de larvas e pupas e na taxas de desenvolvimento larval em *Calliphora*

vicina, utilizando a substância *nordiazepam*. Já CARVALHO *et al.* (2001) observaram que Diazepam acelera o desenvolvimento larval em *C. albiceps* e *C. putoria*.

A estimativa do IPM constitui-se em um dos aspectos mais importantes em estudos de medicina legal (SMITH, 1986), sendo que a não consideração da dispersão pós-alimentar poderia prejudicar seriamente a estimativa da mesma (GOMES *et al.*, 2002, 2003; VON ZUBEN *et al.*, 1998). No entanto, estudos que observem os efeitos na dispersão larval pós alimentar destes dípteros, de substâncias químicas presentes tanto na fonte alimentar como no substrato de pupação, não têm sido relatados. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do Diazepam (Benzodiazepínico) no padrão de comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* em arenas circulares.

Material e Métodos

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para postura pelas fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção de geração F_1 , e somente a geração F_2 foi empregada nos experimentos.

Como substratos alimentares para desenvolvimento larval da espécie estudada, foram utilizados: meio artificial, à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982), e fígado de coelho, objetivando uma comparação com os resultados obtidos na dieta artificial.

Os ovos destas espécies foram depositados pelas fêmeas (F_1) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os ovos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais. Foram formadas densidades de 400 larvas por pote, sendo feitos três experimentos (três réplicas) com substrato alimentar

dieta artificial e dois experimentos para fígado de coelho. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em potes contendo dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982) (400 larvas em 125 gramas de dieta – 0,31g/larva) ou fígado de coelho (200 larvas em – $58,58 \pm 4,99$ g de fígado) como substrato alimentar, para desenvolvimento das larvas. Foram utilizados oito coelhos machos (obtidos no Biotério Central da Unesp - Botucatu – SP) com massa média de $1,682 \text{ Kg} \pm 141 \text{ g}$, os quais foram mortos mecanicamente para a obtenção do fígado, após o tratamento utilizado (controle – sem Diazepam e DL50 - tratados com Diazepam).

Após o desenvolvimento larval que durou aproximadamente 84h, foram separadas em torno de 100 larvas junto com o substrato alimentar, que foram depositadas no centro de uma arena circular de 30 cm de diâmetro e de 10 cm de profundidade forrada com areia [aproximadamente 7 dm^3] (Figura 1), na qual as larvas irradiaram para buscar seu sítio de pupação. Estas arenas foram colocadas em salas com temperatura variando entre 25°C e 27°C, com fotoperíodo de 24 h, ou seja, luz total.

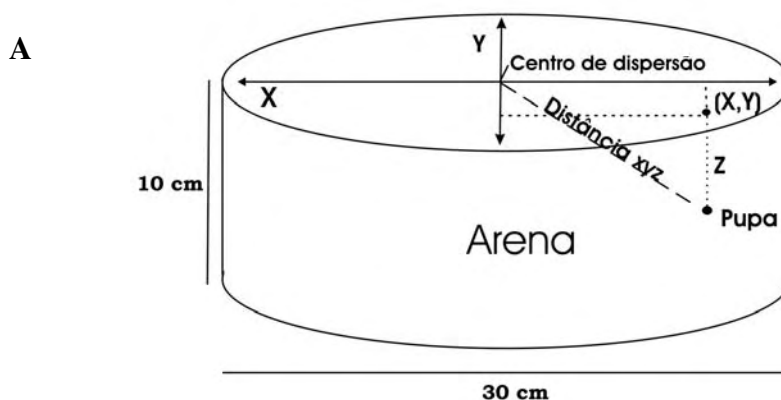


FIGURA 1. Esquema e foto das arenas utilizadas para estudo da dispersão larval pós-alimentar.

A areia utilizada no experimento foi previamente lavada em água corrente, para retirada de qualquer substância química presente na mesma, e peneirada para que ficasse mais homogênea no tamanho de seus grãos (diâmetro dos grãos era menor que 1 mm), e posteriormente armazenada para ser utilizada na montagem das arenas. Foram montadas quatro arenas para análise da dispersão em dieta artificial, sendo uma controle, uma com a DL50 do organismo-teste (coelho) (**D**), uma com dosagem o dobro

da DL50 (**2D**) e outra com metade da dosagem DL50 (**D/2**). Já para o fígado de coelho, foram montadas duas arenas: Controle (C) e DL50 – coelho (D).

O volume de areia colocado nas arenas recebia 800 mL de água antes de se montar as arenas e iniciar a dispersão, pois este substrato, se totalmente seco, impossibilitava que as larvas conseguissem se enterrar, causando a morte das mesmas. Assim, através de experimentos piloto, ficou definido este valor em volume de água necessário para umedecer o substrato. A Tabela 1 abaixo mostra a metodologia empregada nas arenas de dispersão.

TABELA 1. Metodologia utilizada no substrato alimentar nas arenas de dispersão.

Denominação do tratamento	Substrato alimentar larval	
Controle	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento
D/2	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (112,5µL) na dieta (125g)
D	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (225µL) na dieta (125g)
2D	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (450µL) na dieta (125g)
Fígado Controle	Fígado de coelho (58,58 ± 4,99 g)	Aplicação de 3,02 mL* de solução veículo
Fígado Diazepam	Fígado de coelho (58,58 ± 4,99 g)	Aplicação de 3,02 mL* de Diazepam NQ 10mg

* volume “exemplo” calculado de acordo com a massa média dos animais utilizados.

Dados que foram obtidos na análise das arenas.

Após as larvas empuparem, elas foram individualmente localizadas e retiradas da areia, sendo medidas para cada uma, as coordenadas no eixo x,y e a profundidade (z) do local de pupação em relação ao centro, com o auxílio de régua. Através dos dados de coordenada foram obtidas a distância de cada pupa do centro de irradiação e a distância xyz, como pode ser observado na Figura 1. A contagem começou da periferia para o centro.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos mesmos na arena, como proposto por WORTON (1989), com ajuda do programa MATLAB 6.5.

Cada pupa foi individualizada em frascos de plástico e pesada em balança analítica da marca Ohaus[®], antes que ocorresse a emergência dos adultos. Os dados de peso foram anotados na mesma planilha dos outros dados, para futura análise.

Após a pesagem, cada pupa foi devolvida ao seu respectivo frasco, para após a emergência ser feita a sexagem dos adultos. Também foi observado o número de

indivíduos mortos nos diferentes tratamentos (doses de Diazepam e controle), por meio do número de larvas mortas no substrato de pupação ou mortalidade no estágio de pupa, no qual, passados vários dias, não houve a emergência do adulto.

Droga utilizada, suas disposições e dosagens.

Foi utilizado o Diazepam (grupo químico: Benzodiazepínico) (ansiolítico - Diazepam NQ 10mg - solução injetável - LABORATÓRIO NOVAQUÍMICA - ampolas de 2 mL), por causa de sua importância forense, já que está presente em casos de morte de pessoas com necessidade de administração médica desta droga (BERMAN *et al.*, 2005; BOND, 1998; DIETCH & JENNINGS, 1988; GARDNER & COWDRY, 1985; LESTER, 1995; HALL & ZISOOK, 1981; SZARA & LUDFORD, 1980).

O Diazepam atua no sistema nervoso e apesar de ser muito estudado nos seres humanos, ainda necessita de mais investigações para melhor compreensão de sua atuação neural (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004). Cabe aqui salientar que estudos sobre o efeito desta substância em insetos são escassos.

Os indivíduos utilizados nos diferentes tratamentos tiveram como fonte alimentar a dieta artificial proposta por LEAL *et al.* (1982), a qual possui fontes de proteínas e carboidratos que são necessárias para o desenvolvimento destas larvas de dípteros; ou fígado de coelho, animal modelo em muitos estudos científicos e forenses (DE LETTER *et al.*, 2002).

Assim, o benzodiazepínico foi colocado na dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982) e/ou injetado no coelho, substância que pode estar presente no corpo da vítima (cadáver) em investigações médico-criminais. As doses do ansiolítico (Diazepam) utilizadas nos tratamentos foram a DL50 (intravenosa) do animal-teste (coelho), ou seja, 9 mg/Kg (NIOSH, 2004). Foram utilizadas três dosagens no meio artificial: DL50 – coelho = 9mg/Kg, doses com metade da utilizada DL50 (D/2) e doses de duas vezes a DL50 utilizada (2D), sendo que o controle não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de LEAL *et al.* (1982).

A aplicação do Diazepam no animal-teste foi feita por meio de seringas de vidro de 3 mL, sendo injetado na veia marginal da orelha do animal o volume correspondente ao seu peso em relação à DL50 (9 mg/Kg – intervalo de tempo da administração: de 2 a 5 minutos). Os animais foram mortos mecanicamente após 45 minutos da administração

intravenosa. Para esta análise do desenvolvimento em fígado de coelho, foram feitos apenas dois tratamentos: controle (injetado volume do veículo) e DL50 (Diazepam).

Análise estatística e utilização de ferramentas computacionais.

Análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Bonferroni foram utilizados comparando as médias de profundidade, de distância e massa dos tratamentos realizados, utilizando nível de significância de 5%.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989); e calculada a média da distância mínima entre as pupas e a média da mínima distância entre as pupas, nos diferentes tratamentos (doses) e substratos alimentares. As ferramentas utilizadas na melhor interpretação dos dados obtidos foram feitas com ajuda do programa MATLAB[®] 6.5, sendo obtidos gráficos e valores necessários para interpretação dos resultados.

Resultados e discussão

A análise do efeito do Diazepam na dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* pode ser feita pela observação da Tabela 2, a qual mostra a média dos dados obtidos referentes às pupas (coordenadas, profundidade, distância do centro de irradiação, Distância x,y,z e massa larval), de *C. megacephala*, nas réplicas realizadas, e nos diferentes substratos alimentares e tratamentos.

TABELA 2. Média de cada dado obtido da dispersão de *C. megacephala* nas arenas. R1 – réplica 1, R2 – réplica 2 e R3 – réplica 3. D/2 – metade de D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro de D.

	média	x	y	profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Distância xyz (cm)	Massa indivíduo (mg)
Dieta R1	Controle	-1,22	-1,29	6,54	8,86	11,49	55,1
	D/2	0,65	0,18	6,31	9,17	11,45	51,7
	D	-0,88	1,24	6,35	8,75	11,21	55,1
	2D	-0,94	0,01	5,16	8,20	10,13	52,4
Dieta R2	Controle	-0,55	-0,07	6,28	8,70	11,22	48,6
	D/2	-1,17	1,30	6,83	7,65	10,76	49,9
	D	-1,43	1,16	5,52	8,44	10,47	51,6
	2D	-0,12	1,34	5,42	7,40	9,50	51,8
Dieta R3	Controle	0,21	2,32	6,15	7,54	10,03	55,5
	D/2	0,14	0,94	5,80	6,96	9,54	59,5
	D	-0,79	0,46	6,01	6,70	9,46	56,4
	2D	-0,05	-1,53	5,12	6,93	9,13	59,8
Fígado Coelho	Controle	-0,16	1,05	5,96	9,15	11,29	59,8
	D	-0,79	-0,51	5,42	8,76	10,69	55,4

A análise da variável dependente profundidade nas réplicas realizadas com meio artificial não diferiram significativamente entre si ($F = 1,73$; $p = 0,18$), mas a distância foi significativamente diferente entre elas ($F = 24,95$; $p = 2,51 \cdot 10^{-11}$). Tal diferença obtida provavelmente se deve à réplica 3 (R3), no qual as médias de distância xy obtidas são menores que as obtidas em R1 e R2, como pode ser observada na Tabela 2.

Analisando os dados obtidos de profundidade nos diferentes tratamentos e réplicas em dieta artificial, pode-se observar que o tratamento influenciou na profundidade ($F = 11,57$; $p = 1,80 \cdot 10^{-07}$) da localização das pupas, ou seja, na localização do sítio de pupação, sendo que o controle possui a maior profundidade e esta vai diminuindo quanto maior a dose de Diazepam utilizada (Tabela 2). Por meio da análise de comparação múltipla, a média de profundidade do tratamento 2D é estatisticamente diferente das demais; no entanto, as outras médias não são significativamente diferentes entre si (valores da média de profundidade de 2D menores que os outros tratamentos, como pode ser observado na Tabela 2). A interação entre réplica x tratamento não apresentou significância ($F = 1,91$; $p = 0,08$) quando se analisa a profundidade, ou seja, apenas o tratamento causou mudanças na profundidade das pupas encontradas.

Já analisando a variável dependente Distância (xy) nos experimentos com dieta artificial, pode-se observar também que o tratamento influenciou na distância percorrida pelas larvas ($F = 2,78$; $p = 0,040$), diminuindo a dispersão do centro quanto maior a dosagem utilizada (Tabela 2). No entanto, as réplicas se diferenciaram significativamente ($F = 24,95$; $p = 2,51 \cdot 10^{-11}$). Já a interação réplica x tratamento não diferiu significativamente ($F = 1,19$; $p = 0,31$). Assim, o tratamento e a réplica atuaram na variação entre as distâncias, mas o efeito de cada um parece que não foi dependente do outro. Na Tabela 2, vê-se que a réplica 1 (R1) teve as médias de distância mais altas, e a réplica 3, as mais baixas. Isso aconteceu para todos os tratamentos destas duas réplicas. Quanto aos tratamentos, vê-se que em geral o Controle teve distâncias em média maiores, mas o teste de comparações múltiplas constatou diferença significativa apenas entre o Controle e o tratamento 2D. Assim, apenas a dose 2D apresentou diferença significativa em relação à distância (xy) de dispersão larval, como também foi observado em relação à profundidade. Desta forma, a presença de Diazepam causou uma diminuição na distância e profundidade de escolha de um sítio para pupação comparado ao controle (sem a droga) (Tabela 2).

Desta forma, o ansiolítico presente no substrato de alimentação causou uma mudança do padrão de dispersão larval, consequência de prováveis mudanças fisiológicas (metabólicas e sensoriais) nas larvas presentes nestes tratamentos. Tal mudança metabólica pôde ser observada no comportamento dinâmico do agregado larval dentro dos frascos, onde foi observada uma menor atividade dinâmica do aglomerado larval. Esta menor atividade de deslocamento poderia ter se refletido também no comportamento de dispersão no substrato de pupação (fato discutido anteriormente), nos tratamentos em que o ansiolítico (Diazepam) estava presente.

Esta modificação da atividade dinâmica é provavelmente causada pelo modo de atuação dos benzodiazepínicos no sistema nervoso (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004), acarretando provavelmente uma diminuição da atividade metabólica e conseqüentemente na movimentação das larvas no substrato. O ansiolítico pode ter afetado também o sistema sensorial larval, pois trata-se de uma substância que funciona como um neurotransmissor, a qual pode modificar o estado de equilíbrio do sistema nervoso, podendo assim afetar e alterar o padrão de dispersão larval com uma diminuição da distância percorrida pelas larvas.

Tal padrão de dispersão diferenciado também pode ser confirmado por meio da análise da Figura 6 (gráficos densidade / distribuição obtidos, como proposto por WORTON, 1989), em que fica constatado que as larvas que se alimentaram de dieta ou fígado tratado com Diazepam se distribuíram mais próximas ao centro de dispersão ((x,y);(0,0)). Os gráficos do controle densidade/distribuição e dispersão xy, comparados com os tratamentos com o ansiolítico, apresentam picos mais “planos” ou área das curvas de nível maiores, o que indica uma densidade de indivíduos mais distribuídos nas arenas. Já nos tratamentos com Diazepam, as pupas estão mais próximas ao centro de dispersão, ou seja, picos maiores e áreas menores, como podem ser observados na Figura 2, comparando-se os tratamentos nas réplicas (Figura 2A, 2B e 2C). As cores presentes no gráfico representam a grandeza da densidade (em relação ao número de pupas encontradas) de indivíduos distribuídos nas arenas, cores tendendo ao vermelho indicam maior quantidade de indivíduos distribuídos em determinada região da arena e cores tendendo ao azul menor quantidade.

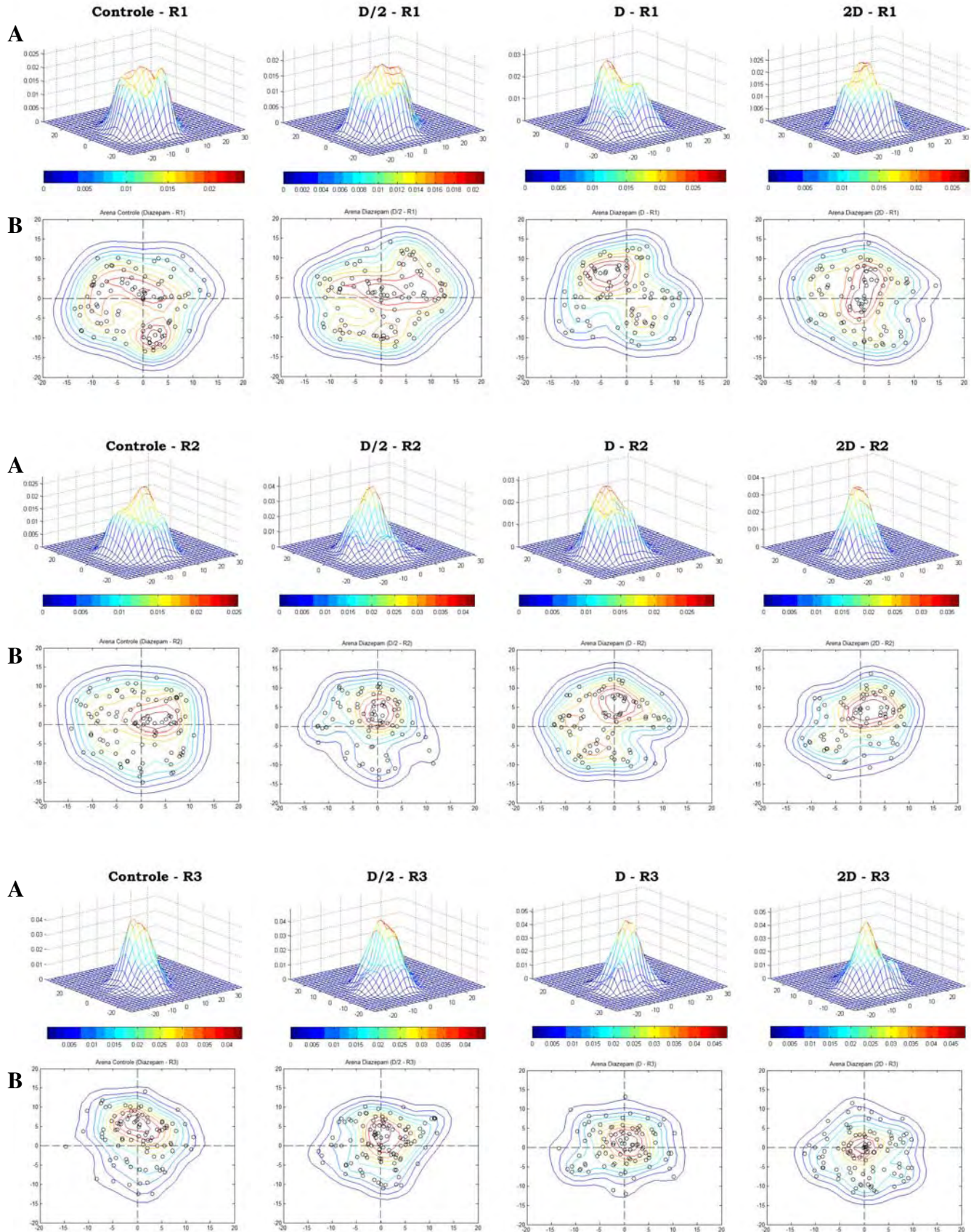


FIGURA 2. Gráficos de Distribuição/densidade e Dispersão x,y das pupas nas arenas nos diferentes tratamentos de Diazepam em dieta artificial, nas três réplicas . A - Análise em 3 dimensões da distribuição, B - Análise da base. R1 – réplica 1, R2 – réplica 2 e R3 – réplica 3. D/2 – metade de D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro de D.

O tipo de dieta utilizado no desenvolvimento larval deste díptero também causou mudanças no padrão de dispersão larval. Em relação a distância (xy), pode se observar que o efeito do tipo de substrato de alimentação larval (meio artificial ou fígado de coelho) ($F = 10,44$; $p = 0,0013$) e dos tratamentos (C e D) ($F = 4,06$; $p = 0,043$) são significantes, ou seja, mudar do fígado para o meio artificial tem influência na distância caminhada a partir do centro de dispersão e mudar do tratamento C - controle para D-Diazepam (DL50) (em fígado) também tem influência na distância. Como a interação substrato x tratamento não foi significativa ($F = 0,0043$; $p = 0,95$), concluímos que o tratamento altera a distância percorrida e o substrato alimentar também, mas de formas independentes. O sexo das larvas também não mostrou ter influência na distância caminhada para todos os tratamentos, substratos alimentares e réplicas realizadas ($F = 0,14$; $p = 0,87$). Já as interações não foram significativas quando se analisa a distância: substrato x tratamento ($F = 0,0043$; $p = 0,95$); substrato x sexo ($F = 0,78$; $p = 0,46$); tratamento x sexo ($F = 0,71$; $p = 0,49$); substrato x tratamento x sexo ($F = 0,31$; $p = 0,73$).

Na Tabela 3 pode-se observar que, no tratamento C as larvas caminharam mais do que as presentes nos experimentos correspondentes do tratamento D, não dependendo do sexo nem do substrato alimentar. Analisando-se o substrato alimentar, pode observar que as larvas que se desenvolveram no fígado caminharam mais na busca de um sítio de pupação comparando com o meio artificial, tanto no tratamento C quanto no D e para ambos sexos. Tal variação pode estar relacionada à massa obtida nos diferentes substratos alimentares e a densidade do agregado larval.

Tabela 3. Comparação entre as distâncias xy (cm) percorridas na dispersão larval pós alimentar de *C. megacephala*, nos diferentes tratamentos, sexo e substratos alimentares.

Tratamento	Subs. Alimen.	Sexo			Total
		Indet.*	M	F	
C	Dieta	8.29	8.42	8.46	8.38
	Fígado	8.99	9.38	9.17	9.15
	Total	8.55	8.77	8.67	8.65
D	Dieta	8.19	7.50	7.91	7.96
	Fígado	8.84	9.04	8.19	8.76
	Total	8.41	8.16	8.01	8.25
Total	Dieta	8.24	8.02	8.22	8.17
	Fígado	8.92	9.21	8.67	8.96
	Total	8.48	8.49	8.37	8.45

Indet* - indeterminado devido a não emergência do adulto. M – macho, F – fêmea. C – controle, D – DL50 de Diazepam para coelho.

Em relação à profundidade, assim como observado em relação à distância, tanto o tratamento ($F = 7,20$; $p = 0,032$) quanto o tipo de substrato ($F = 4,63$, $p = 0,0074$) foram significantes. O sexo das larvas não mostrou ter influência na profundidade caminhada para todos os tratamentos, substratos alimentares e réplicas realizadas ($F = 0,41$; $p = 0,66$), como observado para a distância. As interações não foram significativas quando se analisa a profundidade: substrato x tratamento ($F = 0,39$; $p = 0,53$); substrato x sexo ($F = 1,19$; $p = 0,31$); tratamento x sexo ($F = 0,32$; $p = 0,73$); substrato x tratamento x sexo ($F = 2,22$; $p = 0,11$). Ou seja, o tratamento e o substrato alteram a profundidade, mas a forma com que alteram não são dependentes um do outro.

Os indivíduos submetidos ao tratamento controle escolheram seu sítio de pupação mais profundamente que os indivíduos submetidos ao tratamento D, não importando o sexo e o substrato alimentar (tabela 4). Já a profundidade do sítio de pupação nas larvas que se desenvolveram no fígado foi geralmente menor que a observada nos tratamentos com meio artificial, não importando o tratamento (C ou D), ou o sexo.

TABELA 4. Comparação entre as profundidades (cm) percorridas na dispersão larval pós alimentar de *C. megacephala*, nos diferentes tratamentos, sexo e substratos alimentares.

Tratamento	Subs. Alimen.	Sexo			Total
		Indet.*	M	F	
C	Dieta	6.40	6.55	5.98	6.32
	Fígado	5.82	5.79	6.49	5.96
	Total	6.18	6.27	6.13	6.20
D	Dieta	6.02	5.87	5.93	5.96
	Fígado	5.15	5.91	5.27	5.42
	Total	5.73	5.89	5.69	5.77
Total	Dieta	6.19	6.26	5.96	6.15
	Fígado	5.49	5.85	5.87	5.69
	Total	5.95	6.10	5.93	5.99

Indet* - indeterminado devido a não emergência do adulto.

M – macho, F – fêmea. C – controle, D – DL50 de Diazepam para coelho.

Nas arenas em que as larvas receberam como substrato alimentar fígado de coelho (Tabela 2), pôde-se observar o mesmo resultado obtido nas arenas em que as larvas se alimentaram de dieta, ou seja, a distância e a profundidade percorrida pelas larvas em contato com o benzodiazepínico foi menor que as observadas nas arenas controle.

A Figura 3 mostra o padrão de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* em cada um dos tratamentos (controle e DL50 de coelho do Diazepam) em fígado, por meio de gráficos de distribuição/densidade (WORTON, 1989) e dispersão x,y. Assim como observado no substrato alimentar, a presença do Diazepam causou uma maior densidade de indivíduos nas regiões centrais (picos mais pronunciados) em comparação ao controle. Esta maior densidade de indivíduos nas regiões mais centrais se refletiu na menor média de distância obtida, e discutida anteriormente, nos tratamentos em que o Diazepam estava presente.

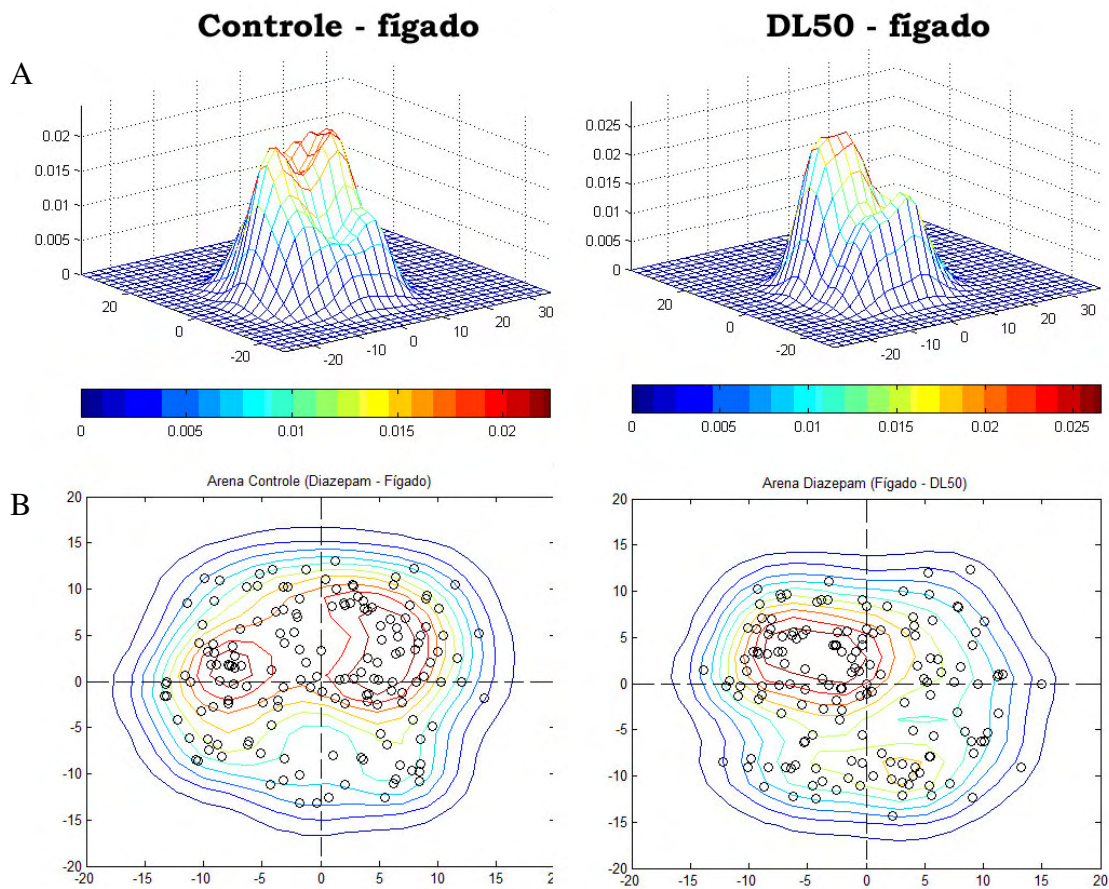


FIGURA 3. Gráficos de Distribuição/densidade e Dispersão x,y das pupas nas arenas nos diferentes tratamentos de Diazepam em fígado de coelho. A - Análise em 3 dimensões da distribuição, B - Análise da base.

Assim apesar dos substratos apresentarem semelhanças no efeito do ansiolítico utilizado, pôde-se observar nas Tabelas 3 e 4, mudanças na média das variáveis obtidas para análise de dispersão quando se compara tratamentos iguais e diferentes substratos alimentares (meio artificial e fígado de coelho), tal diferença observada poderia ser

causado pelo efeito da massa na dispersão larval, como já observado por GOMES *et al.* (2006), onde foram relatadas correlações entre massa, distância e profundidade em *C. megacephala* e *C. albiceps* em diferentes condições experimentais.

Com relação ao efeito da massa, vê-se que o substrato tem um efeito significativo ($F = 13,85$; $p = 0,00021$) e a interação entre o substrato e o tratamento também ($F = 5,28$; $p = 0,0218$). Já o efeito do tratamento isolado é quase significativo ($F = 2,76$; $p = 0,097$). Assim o efeito do tratamento na massa depende do substrato alimentar utilizado e vice-versa, ou seja, dependendo o tratamento que eu utilizo o efeito sobre a massa será dependente do substrato alimentar.

Pode-se observar na Tabela 5, que a massa total nos tratamentos é praticamente a mesma, por isso o efeito do tratamento não é significativo, ao nível de 5%. Já o efeito do substrato alimentar mostra que os indivíduos tratados com fígado possuem maior massa que os tratados com meio artificial; assim, a massa pode ter sido a responsável pela mudança no padrão de dispersão larval em diferentes substratos alimentares.

TABELA 5. Comparação entre as massas (mg) nos diferentes substratos alimentares, tratamentos e sexo.

Tratamento	Subs. Alimen.	Sexo			Total
		Indet.*	M	F	
C	Dieta	53.19	52.88	52.66	52.94
	Fígado	59.97	60.89	57.77	59.78
	Total	55.74	55.82	54.16	55.35
D	Dieta	56.16	52.29	52.38	54.34
	Fígado	55.74	55.98	53.83	55.38
	Total	56.02	53.87	52.91	54.72
Total	Dieta	54.79	52.63	52.54	53.61
	Fígado	57.87	58.46	55.77	57.59
	Total	55.88	54.93	53.59	55.04

Indet* - indeterminado devido a não emergência do adulto.

M – macho, F – fêmea. C – controle, D – DL50 de Diazepam para coelho.

Além da escolha do sítio de pupação que pode ter sido influenciada pela massa das larvas, a emergência e sobrevivência das pupas nas diferentes regiões da arena (profundidade e distância) também podem ter sido afetadas pela massa dos indivíduos e pela substância química utilizada. Assim as Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 procuram informar a preferência na escolha do sítio de pupação e a sobrevivência nos diferentes

tratamentos e porções da arena, e as Tabelas 6 e 7 mostram os valores da média das variáveis observadas entre pupas com ou sem emergência de adultos.

Observando as Figuras 4, 6, 8 e 10, as quais mostram a distribuição das pupas, em que foi observada a emergência de adultos, em relação à profundidade e distância do centro de dispersão, pode-se perceber que quando se utiliza o substrato alimentar fígado de coelho, no tratamento C, há menor variação nos valores de porcentagem de sobrevivência tanto em relação à profundidade, como à distância, com menores valores de sobrevivência em profundidades e distâncias intermediárias (Figuras 4 e 6, analisando o controle). Já na dieta artificial, a sobrevivência foi maior nas regiões mais próximas à superfície e mais próximas ao centro de dispersão, diminuindo na medida em que se aumentam a distância e profundidade (Figuras 8 e 10). Estas variações podem ter sido influenciadas por diversos fatores, desde o efeito do substrato, da massa das larvas até mesmo de fatores presentes no meio de dispersão, como umidade, temperatura, as quais poderiam atuar sobre a escolha das larvas por meio da preferência sensorial.

A preferência das pupas pode ser observada nas Figuras 5, 7, 9 e 11. Analisando-se os substratos alimentares, comparando-se os controles, pode-se perceber uma preferência no fígado de se encontrar maior quantidade de pupas em maior profundidade que na dieta (Figuras 5 e 9), o que já foi discutido anteriormente (Tabelas 2 e 4). Já em relação à distância, esta parece não ter variado muito com o substrato alimentar, sendo que no fígado pode-se perceber uma ligeira tendência a ficarem mais distantes que nos experimentos com dieta artificial (Figuras 7 e 11), como foi observado e discutido anteriormente também (Tabela 2 e 3).

Já em relação aos diferentes tratamentos em um mesmo substrato alimentar, no fígado pode-se perceber que a porcentagem de emergência quando o Diazepam estava presente, em relação à profundidade, tendeu a aumentar nas maiores profundidades e diminuir nas pupas próximas à superfície (Figura 4), sendo que a preferência pela escolha do sítio foi nas menores profundidades (Figura 5). Já na dieta, a sobrevivência comparada ao controle aumentou em D/2 e diminuiu em D e 2D, sendo que as pupas próximas à superfície mantiveram a emergência de adultos parecida ao controle (Figura 8). No entanto, a preferência pela escolha do sítio em relação a profundidade, pareceu

ser semelhante em D/2 e D, já em 2D houve uma maior quantidade de pupas nas regiões mais superficiais (Figura 9).

Já em relação à distância, o Diazepam no fígado tendeu causar uma diminuição da distância na escolha do sítio de pupação (Figura 7); já a sobrevivência das larvas diminuiu nas regiões mais próximas à superfície (Figura 4) e aumentou um pouco nas regiões intermediária de distância (3-12 cm) do centro (Figura 6). Na dieta, comparando-se ao controle, o Diazepam aumentou a sobrevivência das pupas em geral no tratamento D/2 e diminuiu nos tratamentos D e 2D (Figura 10). Já a preferência da distância para escolha do sítio de pupação parece não ter sofrido mudanças significativas (Figura 11).

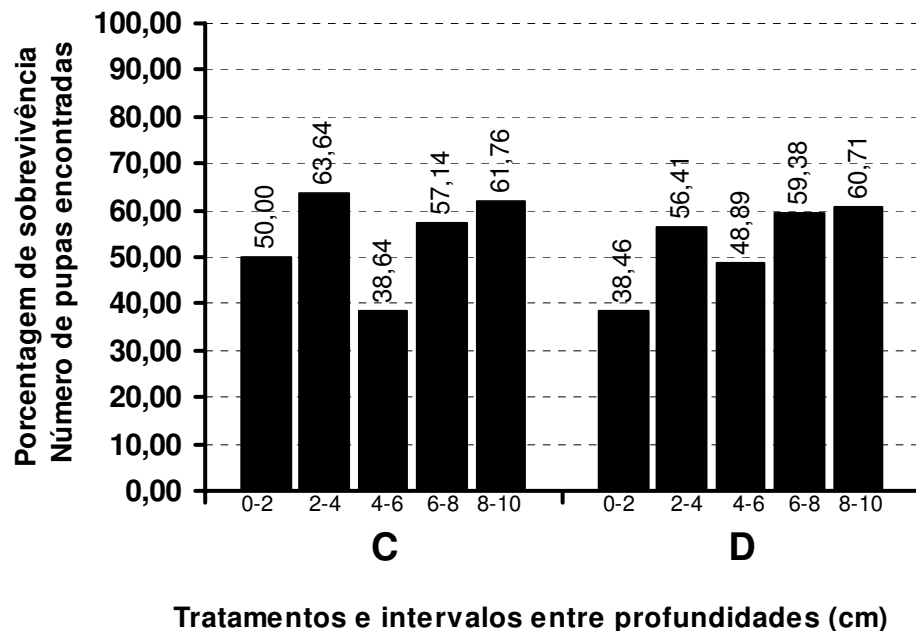


FIGURA 4. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de profundidades (cm). Substrato alimentar fígado de coelho. C – controle, D – DL50 de Diazepam para coelho.

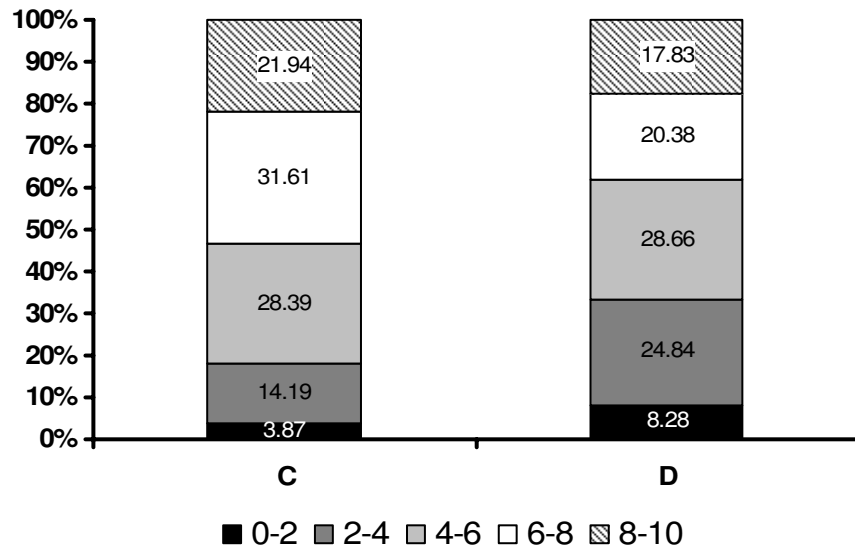


FIGURA 5. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de profundidade (cm) nos diferentes tratamentos. Substrato alimentar fígado de coelho. C – controle, D – DL50 de Diazepam para coelho.

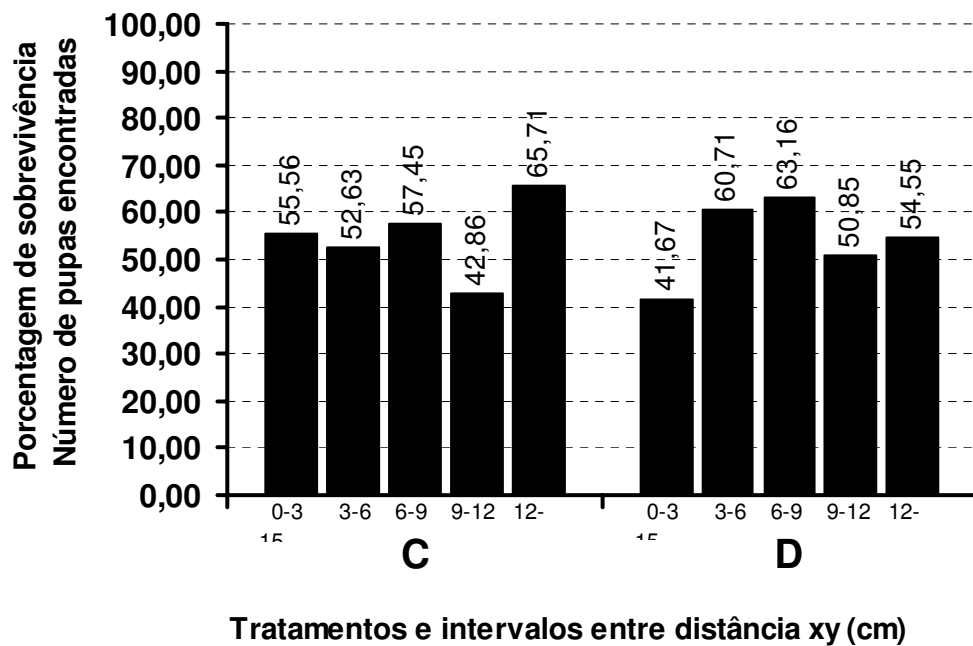


FIGURA 6. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de distância xy (cm). Substrato alimentar fígado de coelho. C – controle, D – DL50 de Diazepam para coelho.

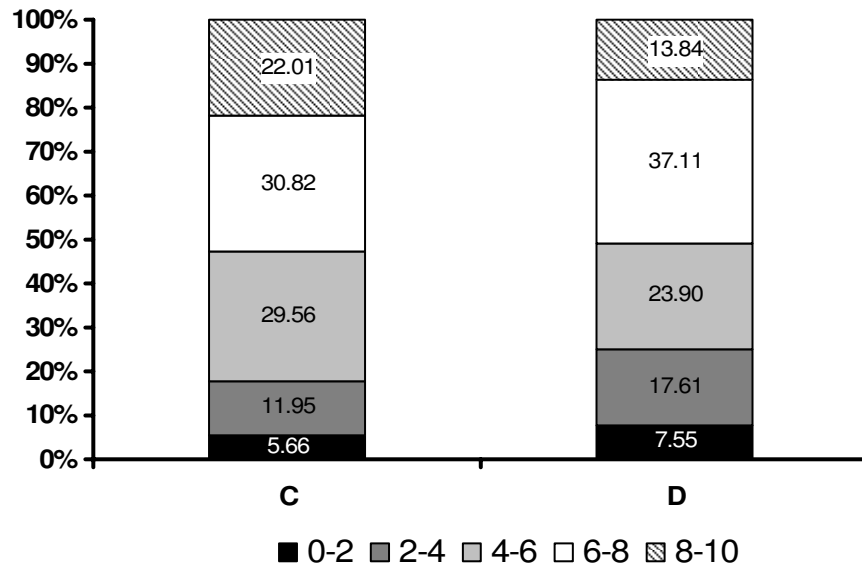


FIGURA 7. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de distância xy (cm) nos diferentes tratamentos. Substrato alimentar fígado de coelho. C – controle, D – DL50 de Diazepam para coelho.

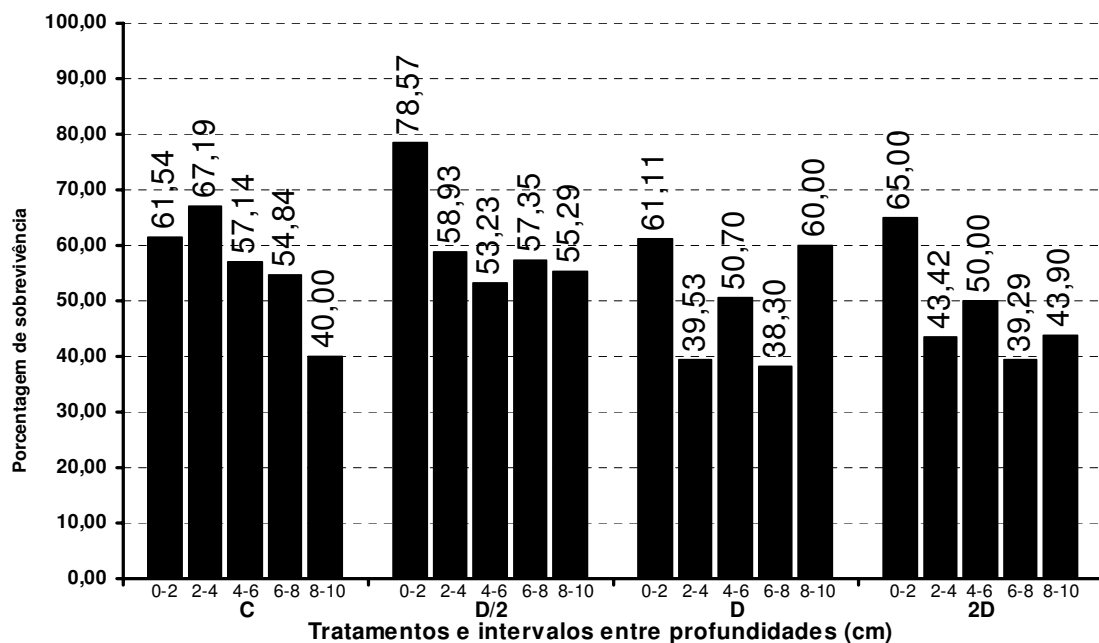


FIGURA 8. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de profundidades (cm). Substrato alimentar dieta artificial. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

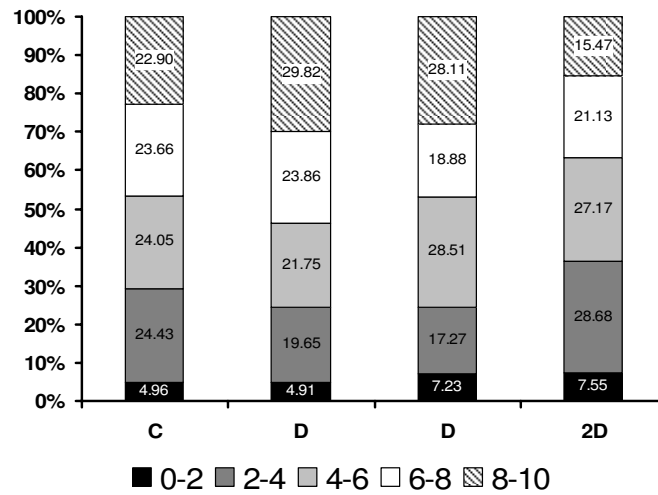


FIGURA 9. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de profundidade (cm) nos diferentes tratamentos. Substrato alimentar dieta artificial. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

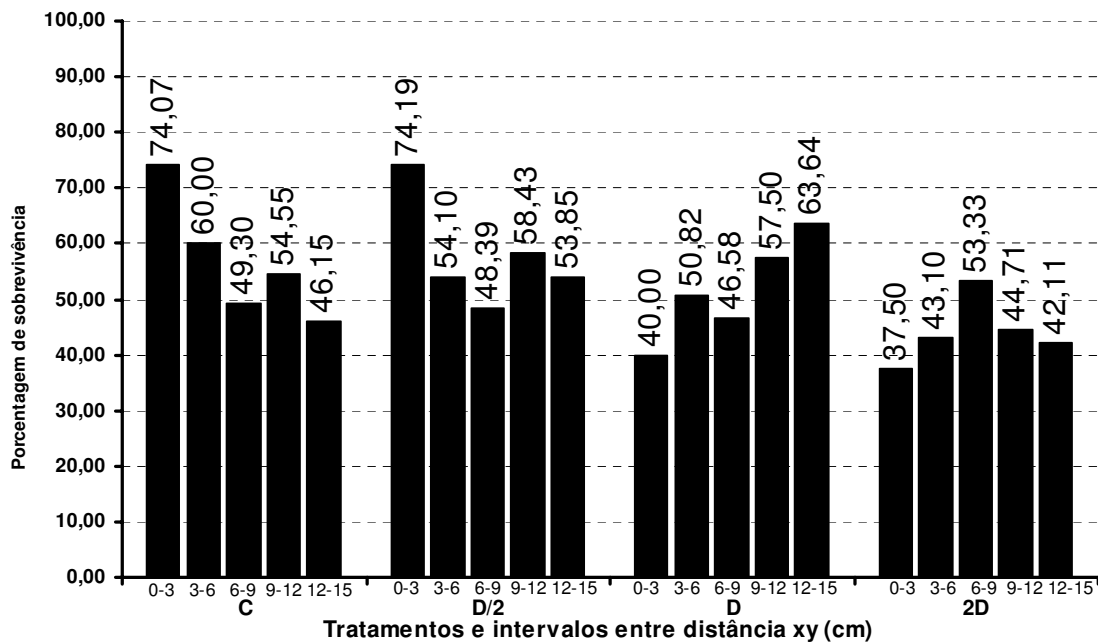


FIGURA 10. Porcentagem de sobrevivência (emergência de adultos) de pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de distância xy (cm). Substrato alimentar dieta artificial. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

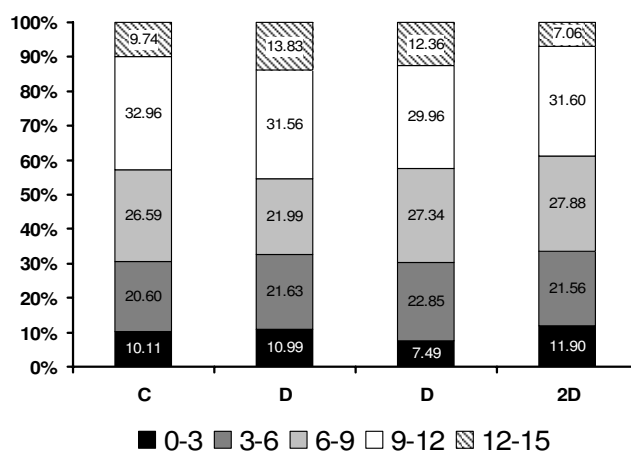


FIGURA 11. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de distância xy (cm) nos diferentes tratamentos. Substrato alimentar dieta artificial. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

Observando as Tabelas 6 e 7, pôde-se perceber que a presença de Diazepam em altas dosagens no substrato de alimentação larval, reduziu os valores de todas as variáveis observadas não importando o grupo de pupas analisado, ou seja, pupas em que houve (Tabela 6) ou não a emergência do adulto (Tabela 7).

TABELA 6. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que houve emergência do adulto de *C. megacephala*, nos diferentes tratamentos e substratos alimentares.

	Tratamento	Média das pupas em que houve emergência de adultos		
		Desvio padrão entre parênteses.		
Fígado	C	Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)
	D	6.08 (2.29)	9.29 (3.49)	59.6 (9.56)
Meio artificial	C	5.64 (2.54)	8.68 (3.31)	55.1 (9.61)
	D/2	6.27 (2.43)	8.44 (3.59)	52.8 (7.85)
	D	6.42 (2.28)	8.10 (3.32)	51.6 (7.11)
	2D	5.90 (2.40)	7.70 (3.30)	52.3 (7.54)
		5.31 (2.56)	7.55 (3.61)	51.1 (9.47)

C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

TABELA 7. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que não houve emergência do adulto de *C. megacephala*, no diferentes tratamentos e substratos alimentares.

	Tratamento	Média das pupas em que não houve emergência de adultos Desvio padrão entre parênteses.		
		Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)
Fígado	C	5.82 (2.16)	8.99 (3.21)	59.97 (8.09)
	D	5.15 (2.52)	8.84 (3.75)	55.74 (8.44)
Meio artificial	C	6.40 (2.50)	8.29 (3.28)	53.19 (7.59)
	D/2	6.14 (2.64)	7.74 (3.87)	52.44 (7.28)
	D	6.02 (2.59)	8.19 (3.30)	53.51 (7.11)
	2D	5.11 (2.69)	7.50 (3.41)	51.10 (8.83)

C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

Um outro fator que poderia atuar sobre a dispersão larval e escolha do sítio de pupação é o efeito da vizinhança sobre as pupas. BOLDRINI *et al.* (1997) analisaram a dispersão larval pós-alimentar de moscas varejeiras por meio de modelos matemáticos e observaram que o efeito da vizinhança influencia a escolha do local de pupação, principalmente de *C. megacephala* e *C. putoria*. Desta forma, a escolha do sítio de pupação pode ser influenciada pela localização de pupas próximas. No entanto, as presenças de substâncias químicas em contato com as larvas poderiam influenciar a percepção da vizinhança e assim modificar a distância entre pupas vizinhas.

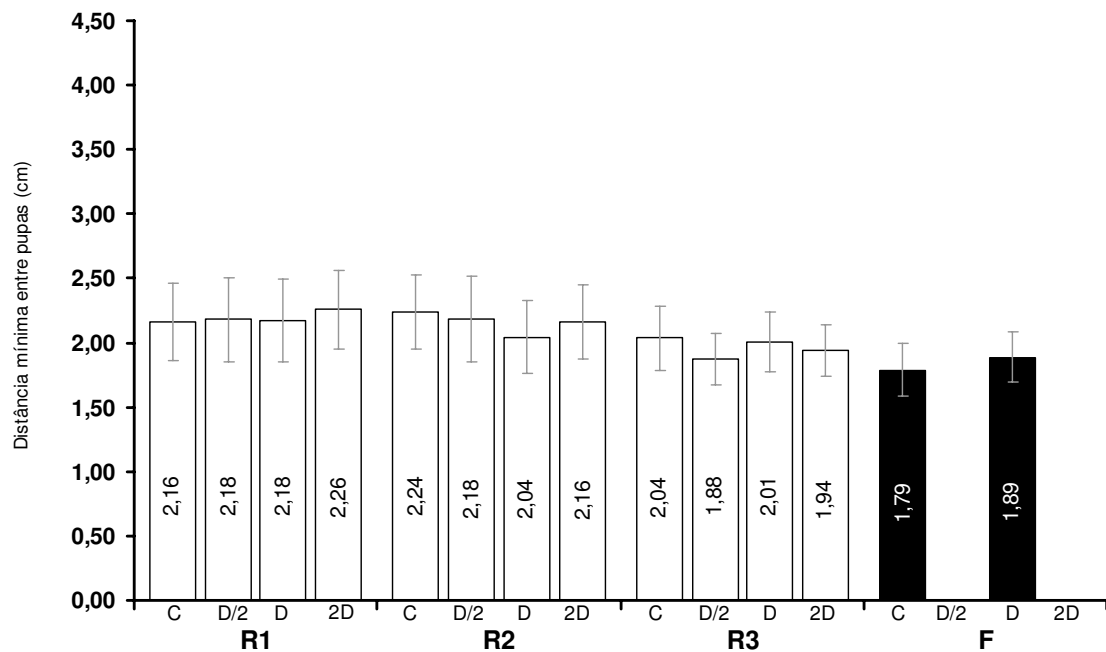
Foram também obtidos valores para cada arena de dispersão, da média da distância entre as pupas e da média da distância mínima entre pupas para avaliação de prováveis mudanças na escolha do sítio de pupação e do efeito da vizinhança pelas interações não locais.

A Figura 12 mostra a distribuição da distância mínima entre pupas mais próximas nos diferentes tratamentos e a Tabela 8, a média da distância entre pupas e a média da distância mínima entre pupas e a respectivos valores de variância. Os tratamentos não se diferenciaram entre si, observando-se a distância mínima entre as pupas em todas as réplicas e substratos alimentares (R1: $F = 0,1607$; $p = 0,9222$; R2: $F = 0,6874$; $p = 0,5638$; R3: $F = 0,4575$; $p = 0,7163$; Dieta: $F = 0,3861$; $p = 0,7665$; Fígado: $F = 1,0711$; $p = 0,3020$).

TABELA 8. Média e variância da distância entre pupas e da distância mínima entre pupas.

		Média da Distância entre pupas		Média das Distâncias mínimas entre as pupas	
			Variância		Variância
R1	C	10.03	22.45	1.89	0.24
	D/2	11.46	26.3	2.68	0.45
	D	8.77	20.59	1.8	0.23
	2D	9.38	27.43	2.2	0.53
R2	C	10.38	23.7	1.91	0.25
	D/2	10.64	24.16	2.38	0.37
	D	9.25	19.6	1.94	0.22
	2D	10.51	27.08	2.32	0.52
R3	C	9.945	25.03	2.335	0.505
	D/2	9.845	25.588	2.414	0.571
	D	9.745	26.146	2.493	0.637
	2D	9.645	26.704	2.572	0.703
F	C	12.89	32.61	1.79	0.21
	D	12.64	30.32	1.89	0.19

R1 – Réplica 1 (Dieta artificial), R2 – Réplica 2 (Dieta artificial), R3 – Réplica 3 (Dieta artificial) e F – Desenvolvimento em Fígado de coelho. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

**FIGURA 12.** Gráfico mostrando a média e a variância da mínima distância entre pupas nas arenas em diferentes tratamentos e substratos alimentares. R1, R2 e R3 - Réplicas com substrato alimentar meio artificial (Leal *et al*, 1994); F - réplicas com substrato alimentar fígado. C - controle, D/2 - metade da dose D, D - DL50 de Diazepam para coelho e 2D - dobro da dose D.

Assim, os tratamentos não se diferenciaram entre si quando analisamos a distância mínima, ou seja, apesar do volume de dispersão (densidade) ser menor nos tratamentos com Diazepam (Figuras 2 e 3) comparados ao controle, a distância mínima entre pupas não foi diferente. Portanto, as larvas que tiveram contato com o benzodiazepínico percorreram menor distância e profundidade na escolha do sítio de pupação em comparação ao controle, mas mesmo assim a distância mínima entre pupas não foi significativamente diferente nos diferentes tratamentos. Outro fator que pode influenciar a distância entre as pupas é o número de indivíduos encontrados nas arenas nos diferentes tratamentos. Entretanto não foi observada grande variação no número final de pupas encontradas em nenhuma das réplicas feitas.

Para que a distância mínima seja semelhante em todos os tratamentos, mesmo observando que as larvas em contato com Diazepam dispersaram-se menos que as do tratamento controle, é necessário que ocorra picos de densidade em diferentes porções das arenas, ou seja, assim como a presença de uma pupa pode interferir na escolha do sítio de pupação (BOLDRINI *et al.*,1997) a ausência também interfira. Desta forma, a presença destes picos de densidade de pupas permite que mesmo dispersando mais (maiores distâncias e profundidades), a distância mínima seja parecida à observada nos tratamentos com Diazepam onde a dispersão foi menor (2D). Assim o processo de escolha de um sítio de pupação parece ter relação com a localização de outras pupas no substrato atraindo e repelindo as larvas.

Nos tratamentos 2D, pode-se observar que a dispersão larval foi alterada comparada ao controle, diminuindo a distância e profundidade de escolha do sítio de pupação, mas pode se perceber também que a maior densidade de pupas nas arenas se concentra próxima ao centro. No entanto, as larvas mais distantes parecem isoladas das outras, o que acarreta em uma distância mínima maior devido à não aglomeração de pupas em determinados locais das arenas. Assim, as larvas que tiveram contato com Diazepam parecem ter sofrido influência na dinâmica de movimentação, diminuindo-a, e na percepção sensorial das larvas circunvizinhas, não sendo atraídas e nem repelidas. Esta possível forma de escolha do sítio de pupação e a localização das pupas pode explicar a não diferença nas distâncias mínimas, mesmo diminuindo o volume de dispersão larval pelo efeito da droga no comportamento das larvas.

Tal modificação no padrão de dispersão larval pode ter relação com uma diminuição na atividade dinâmica do agregado larval causada por mudanças fisiológicas nas larvas em função do benzodiazepínico presente no meio, tendo em vista sua provável atuação sobre o sistema GABAérgico *C. megacephala*. Os benzodiazepínicos agem interagindo com receptores de neurotransmissores inibitórios diretamente ativados pelo GABA (GOODMAN & GILMAN, 2003). Neste caso, podem potencializar a ação dos neurotransmissores GABA, atuando sobre os receptores GABA_A, ou seja, ocorre um maior influxo de íons cloro para o neurônio pós-sináptico, dificultando assim sua despolarização e conseqüentemente, causando uma diminuição da velocidade de transmissão do impulso neural, o que deprime o sistema nervoso central (GOODMAN & GILMAN, 2003; ROGAWSKI & LOSCHER, 2004).

Em humanos, os benzodiazepínicos, entre eles o Diazepam, têm efeito sobre o sistema nervoso central, podendo causar: sedação, hipnose, diminuição da ansiedade, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e atividade anticonvulsivante, além de vasodilatação coronária e bloqueio neuromuscular em doses muito altas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Este modo de ação dos benzodiazepínicos pode ter causado uma diminuição do metabolismo larval e conseqüentemente uma menor atividade dinâmica do agregado larval em ambos os substratos alimentares, acarretando uma alteração no comportamento de dispersão larval pós-alimentar, como é observado na distribuição das pupas nas arenas 2D, principalmente, as quais se diferenciaram significativamente do controle.

Conclusões

Os resultados do presente estudo mostraram que o Diazepam altera o padrão do comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala*, diminuindo a distância e a profundidade na escolha do sítio de pupação, quando comparado com o controle.

São necessários também mais estudos visando avaliar os efeitos deste ansiolítico no metabolismo do inseto e também a nível celular e molecular, para uma melhor compreensão dos efeitos gerados no comportamento de dispersão larval pós-alimentar. Cabe aqui salientar que mais estudos com outras espécies de insetos de importância

forense e também com diferentes substâncias e suas respectivas dosagens, fazem-se necessários, para uma melhor compreensão do efeito de substâncias químicas sobre insetos importantes médico-criminais.

Referências Bibliográficas

- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- BASSANEZI, R. C., LEITE, M. B. F., GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, C. J., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F.. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Mem. Inst. O. Cruz**, 92(2): 281-286, 1997.
- BERMAN, M. E.; JONES, G. D. & MCCLOSKEY, M. S. The effects of diazepam on human self-aggressive behavior. **Psychopharmacology**, 178: 100-106, 2005.
- BOND, A. J. Drug-induced behavioural disinhibition: incidence, mechanisms and therapeutic implications. **CNS Drugs**, 9:41-57, 1998.
- BOLDRINI J. L., BASSANEZI, R. C., MORETTI, A.C., VON ZUBEN, C. J. GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **J. Theor. Biol.**, 185: 523-531, 1997.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeasten Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.
- DE LETTER, E. A., CLAUWAERT, K. M., LAMBERT, W. E., VAN BOCXLAER, J. F., DE LEENHEER, A. P., PIETTE, M. H. Distribution study of 3,4-

- methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. **J. Anal. Toxicol.**, 26 (2): 113-118, 2002.
- DIETCH J.T.; JENNINGS, R.K. Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. **J. Clin. Psychiatry**, 49:184-188, 1988.
- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA , G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.
- GARDNER, D.L & COWDRY R.W. (1985) Alprazolam-induced dyscontrol in borderline personality disorder. **Am. J. Psychiatry**, 142: 98-100, 1985.
- GODOY, W. A. C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L. & RIBEIRO, O. B. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **J. Appl. Entomol.**, v. 119, p.263-266, 1995.
- GODOY, W. A.C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L., RIBEIRO, O. B. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **J. Appl. Entomol.**, 119: 263-266, 1995.
- GODOY, W. A.C., REIS S. F., VON ZUBEN, C. J. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. **J. Appl. Entomol.**, 120(4): 423-426, 1996.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, L.; SANCHES, M. R. & VON ZUBEN, C. J. Dispersal and Burial Behavior in Larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). **J. Insect Behavior**, 18(2): 281-292, 2005.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & GOVONE, J. S. Comportamento de dispersão larval radial pós alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera:

- Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. **Entomol. Vect.**, 9: 115-132, 2002.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GOMES, L; GODOY, W. A. C. & VON ZUBEN, C. J. A review of postfeeding larval dispersal in blowflies: implication for forensic entomology, **Naturwissenschaften**, 93: 207-215, 2006.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **Goodman e Gilman; as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed., Rio de Janeiro:Mc-Graw-Hill, p. 1647, 2003.
- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am**: 83: 1210-1214, 1990.
- GRENN, A. A. The controlo f blowflies infesting slaughter-houses. I. Field observations of habits of blowflies. **Ann. Appl. Biol.**, 38: 475, 1951.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., BURALLI, G.M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 23 (4): 245-255, 1979.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.
- HALL R.C.W., ZISOOK S.. Paradoxical reactions to benzodiazepines. **Br. J. Clin. Pharmacol**, 11: 45–49, 1981.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol**, 12: 257-266, 1987.
- LAURENCE, B. R. Geographical expansion of the range of *Chrysomya* blowflies. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 75: 130-131, 1981.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LESTER, D. Case consultation: diffusion of responsibility in the care of a difficult patient. **Suicide Life Threat Behav.**, 25: 415–421, 1995.

- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- LOMNICKI, A.. **Population ecology of individuals**. Princeton: Princeton Press, 233 p., 1988.
- LOPES DE CARVALHO, L. M. & LINHARES, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in southeastern Brazil, **J. Forensic Sci.**, 46 (3): 604-608, 2001.
- NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Volume 2: Physical Trauma. Tedeschi, C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.
- O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.
- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. In: **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.
- PESCHKE, K.; KRAPP, D. & FULDNER, D. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. **Zool. Jb. Syst.**, 114: 241-265, 1987.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- REIS, S.F.; G. STANGENHAUS, W.A.C. GODOY, C.J. VON ZUBEN & O.B. RIBEIRO. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.**, 38: 33-34, 1994.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.

- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481–485, 1997.
- SHIOTA, H., NAKASHIMA, M., TERAZONO, H., SASAKI, H., NISHIDA, K., NAKAMURA, J. & TANIYAMA, K. Postmortem changes in tissue concentrations of triazolam and diazepam in rats. **Legal Medicine**, 6(4): 224-232, 2004.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- SZARA, S. I. & LUDFORD, J. P. **Benzodiazepines: A Review of Research Results**. NIDA Research Monograph, p.101, 1980.
- TEWS, J., MOLONEY, K. & JELTSCH, F. Modeling seed dispersal in a variable environment: a case study of the fleshy-fruited savanna shrub *Grewia flava*. **Ecol. Model.**, 175: 65–76, 2004.
- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 234 B: 77-174, 1950.
- VON ZUBEN, C. J. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 4: 525-533. 1998.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WOODS, J. H., Katz, J. L. & Winger, G. Benzodiazepines: Use, Abuse, and Consequences. **Pharmacol. Rev.**, 44(2): 151-347, 1992.
- WORTON, B.J. Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies, **Ecology**, 70(1):164-168, 1989.
- ZIV, Y. The effect of habitat heterogeneity on species diversity patterns: a community-level approach using an object-oriented landscape simulation model (SHALOM). **Ecological Modelling**, 111: 135–170, 1998.
- ZUMPT, F.. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 267 p, 1965.

CAPÍTULO 5

Efeito do Diazepam na dispersão larval pós-alimentar de
Musca domestica (L.) (Diptera: Muscidae)

Resumo

As larvas de *Musca domestica*, após a exaustão dos recursos alimentares, abandonam o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação, processo chamado de dispersão larval pós-alimentar. No entanto, em ambiente natural, tanto a fonte alimentar larval como o substrato de pupação podem estar contaminados com substâncias químicas. Assim, foi utilizado Diazepam no substrato alimentar das larvas (antidepressivo – Diazepam NQ 10mg - injetável) para avaliar o efeito no comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *Musca doemstica*, pois esta substância pode interferir nos processos neurológicos, inibindo ou hiperativando os neuro-transmissores, podendo causar mudanças fisiológicas (no desenvolvimento e no comportamento), as quais têm importância na estimativa do IPM (intervalo pós-morte - entomologia forense). A dispersão pós-alimentar larval foi realizada em quatro arenas circulares (Controle, Dose referência (DL50 coelho = 9mg/kg), metade da dose referência e o dobro da dose referência - com réplicas) preenchidas com areia, com diâmetro de 30 cm e profundidade 10 cm. As larvas, ao atingirem o 3º instar, foram soltas no centro das arenas (100 larvas liberadas em cada tratamento), e posteriormente, após a formação das pupas, os dados referentes à profundidade e ao posicionamento de cada pupa na arena foram analisados. Foi observado nos tratamentos com Diazepam, que a profundidade de enterramento e a distância das pupas do centro de irradiação foram alteradas, de forma diferente nos diferentes tratamentos, quando comparadas ao tratamento controle. Tais variações na dispersão foram provavelmente causadas por mudanças sensoriais e motoras em virtude da droga utilizada.

Introdução

A referência que é feita ao nome mosca doméstica refere-se à espécie conhecida cientificamente como *Musca domestica* (Linnaeus), um díptero da família Muscidae que pode ser considerado uma mosca de distribuição cosmopolita, não ocorrendo apenas nas regiões árticas e antárticas e em grande altitudes (MARICONI *et al.*, 1999).

Musca domestica é uma espécie altamente sinantrópica e onívora, o que favorece a sua dispersão e distribuição pelos continentes (MARICONI *et al.*, 1999). Conseqüentemente, tem uma grande relação com o ambiente humano (GREENBERG, 1971), sendo uma espécie bastante estudada e de importância em várias áreas de pesquisa. Tem importância médico/sanitária, veterinária (MARCONDES, 2001) e na ciência forense (BYRD & CASTNER, 2001; SMITH, 1986; SUKONTASON *et al.*, 2004). Em estudo realizado na Espanha por ARNALDOS *et al.* (2001), *M. domestica* teve uma grande importância entre os insetos necrófagos, sendo uma das primeiras espécies que chegaram à carcaça nas primeiras horas do dia no verão.

Na entomologia forense, o uso dos insetos pode ajudar os peritos a estimar o intervalo pós-morte (IPM), por meio do estudo do desenvolvimento larval de espécies ou sucessão faunística presente no cadáver (SMITH, 1986). O IPM é uma estimativa de extrema importância nas investigações criminais, podendo refutar ou aceitar um alibi de um suspeito, e o uso dos insetos tem sido uma das melhores metodologias para esta estimativa (CATTS & GOFF, 1992; SMITH, 1986). No entanto, alguns fatores podem prejudicar a estimativa do IPM, dentre eles a presença de substâncias químicas no cadáver, como drogas lícitas ou não (CATTS, 1992).

Os diferentes modos de ação de drogas na decomposição do corpo e no ritmo de desenvolvimento de larvas de insetos necrófagos, dentre eles moscas varejeiras, têm dificultado a investigação por parte dos peritos na estimativa do IPM (BOUREL *et al.*, 2001; CATTS, 1992; GOFF & LORD, 1994; GOFF *et al.*, 1997; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1997). Casos de mortes de pessoas por utilização de drogas, lícitas ou não, direta ou indiretamente são comumente relatados (ALUNNI-PERRET *et al.*, 2003; CONACHER & WORKMAN, 1989; DE CHATEAU, 1990; POPE & KATZ, 1994; WOODS, *et al.*, 1992).

Dentre estas drogas, mortes ou mudanças de comportamento em usuários de benzodiazepínicos (entre eles Diazepam), têm sido observados em vários estudos (BERMAN *et al.* 2005; BOND, 1998; LESTER, 1995; DIETCH & JENNINGS, 1988; GARDNER & COWDRY, 1985; HALL & ZISOOK, 1981; SZARA & LUDFORD, 1980; WOODS, *et al.*, 1992).

O efeito destas substâncias sobre os insetos, atuando no seu metabolismo, vem sendo estudado e tem se mostrado alterações na morfologia de larvas e pupas e na taxas de desenvolvimento larval de diferentes espécies sob influência de diferentes drogas (BOUREL *et al.*, 2001; CATTS, 1992; CARVALHO *et al.*, 2001; GOFF *et al.*, 1997; GOFF & LORD, 1994; O' BRIEN & TURNER, 2004; PIEN *et al.*, 2004; SADLER *et al.*, 1995; Estes estudos envolvem a entomotoxicologia (GOFF & LORD, 1994; INTRONA *et al.*, 2001), ciência que procura quantificar e analisar o efeito de diferentes drogas sobre os insetos e também na sua taxa de desenvolvimento larval, que é de grande importância numa estimativa mais precisa do intervalo pós-morte (IPM).

A presença de alguma substância química (drogas clínicas ou inseticidas) no substrato de alimentação larval deste *M. domestica* pode atuar sobre os indivíduos interferindo nos processos de transmissão neural, inibindo ou ativando os mensageiros químicos, causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento do organismo em contato com a mesma (BECKEL *et al.*, 2004; HAYNES, 1988; OMOTO, 2000). Mudanças estas que podem levar a uma sub - ou super - estimativa do IPM (CATTS, 1992).

Este muscídeo, após alimentação larval, procura um sítio de pupação no habitat, ou por mais fonte de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, e esse processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG, 1990), a qual deve ser considerada na estimativa do IPM, que constitui-se em um dos aspectos mais importantes em estudos de medicina legal (SMITH, 1986), sendo que a não consideração da dispersão pós-alimentar pode prejudicar seriamente esta estimativa (GOMES *et al.*, 2003; VON ZUBEN *et al.*, 1998).

Assim, caso as larvas, durante o desenvolvimento, tenham contato com alguma substância química, poderão sofrer alterações no desenvolvimento e no comportamento de dispersão larval, o que pode ter implicações na estimativa do IPM.

Estudos que observem a dispersão larval de *M. domestica*, não são relatados. A grande maioria de estudos de dispersão larval com dípteros foi feita com Calliphoridae (GRENN, 1951; NUORTEVA, 1977; GREENBERG, 1990; BOLDRINI *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2005, 2006). No entanto, ainda não existem trabalhos que observem o comportamento de dispersão larval e conseqüente padrão de distribuição espacial nos sítios de pupação, de indivíduos em contato com fontes alimentares e/ou substratos de pupação com substâncias químicas (inseticidas ou drogas lícitas ou não), as quais podem influenciar neste e em outros comportamentos.

Assim, há a necessidade de estudos que avaliem a presença de diferentes substâncias químicas no substrato alimentar e seus efeitos sobre as diferentes espécies, para que se possam observar variações no comportamento de dispersão larval e permitir uma melhor estimativa do IPM em investigações médico-criminais. Este trabalho visa analisar o efeito do Diazepam no comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica*.

Material e Métodos

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *M. domestica* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizado como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs.

Foram oferecidos aos adultos açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para postura pelas fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F1, e somente a geração F2 foi empregada nos experimentos.

Como substrato alimentar para desenvolvimento larval da espécie estudada, foi utilizado: meio artificial, à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982).

Os ovos foram depositados pelas fêmeas (F₁) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os ovos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h) até a eclosão das larvas, para a formação

das densidades larvais. Foram formadas densidades de 400 larvas por tratamento, sendo feitos dois experimentos (duas réplicas), sendo que cada réplica era composto por quatro frascos: três frascos com doses diferentes de Diazepam e um tratamento controle. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em frascos contendo meio artificial (LEAL *et al.*, 1982) (400 larvas em 125 gramas de dieta – 0,31g/larva).

Após o desenvolvimento larval que durou aproximadamente 84h, foram separadas em torno de 100 larvas junto com o substrato alimentar, que foram depositadas no centro de uma arena circular de 30 cm de diâmetro e de 10 cm de profundidade forradas com areia [aproximadamente 7 dm³] (Figura 12), na qual as larvas irradiaram para buscar seu sítio de pupação. As arenas montadas foram colocadas em salas com temperatura variando entre 25°C e 27°C, com fotoperíodo de 24 h, ou seja, luz total.

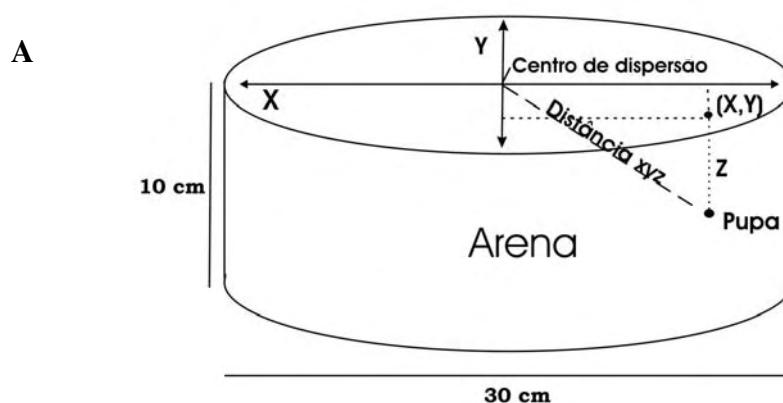


FIGURA 1. Esquema e foto das arenas utilizadas para estudo da dispersão larval pós-alimentar.

A areia utilizada no experimento foi previamente lavada em água corrente, para retirada de qualquer substância química presente na mesma e peneirada, para que ficasse mais homogênea no tamanho de seus grãos (diâmetro dos grãos era menor que 1 mm), e posteriormente armazenada para ser utilizada na montagem das arenas. Foram montadas quatro arenas para análise, sendo uma controle, uma com a DL50 do organismo-teste (coelho) (**D**), uma com dosagem o dobro da “normal” (**2D**) e outra com metade da dosagem “normal” (**D/2**).

O volume de areia colocado nas arenas recebia 800 mL de água antes de se montar as arenas e iniciar a dispersão, pois este substrato, se totalmente seco, impossibilitava que as larvas conseguissem se enterrar, causando a morte das mesmas. Assim, através

de experimento piloto, ficou definido este valor em volume de água necessário para umedecer o substrato. A Tabela 1 a seguir mostra a metodologia empregada nos substratos alimentares para desenvolvimento larval e nas arenas de dispersão, após as larvas estarem prontas para dispersão.

TABELA 1. Metodologia utilizada nos substratos colocados nas arenas de dispersão.

Denominação do tratamento	Substrato alimentar larval	
	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento
Controle	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (112,5µL) na dieta (125g)
D/2	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (225µL) na dieta (125g)
D	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (450µL) na dieta (125g)
2D	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Adição de diazepam (450µL) na dieta (125g)
Fígado Controle	Fígado de coelho (58,58 ± 4,99 g)	Aplicação de 3,02 mL* de solução veículo
Fígado Diazepam	Fígado de coelho (58,58 ± 4,99 g)	Aplicação de 3,02 mL* de Diazepam NQ 10mg

* volume “exemplo” calculado de acordo com a massa média dos animais utilizados.

Dados que foram obtidos na análise das arenas.

Após as larvas empuparem, elas foram individualmente localizadas e retiradas da areia, sendo medidas para cada uma as coordenadas no eixo x,y e a profundidade (z) do local de pupação em relação ao centro, com o auxílio de régua. Através dos dados de coordenada, foram obtidas a distância de cada pupa do centro de irradiação e a distância xyz, como pode ser observado na Figura 1. A contagem começou da periferia para o centro.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989), com ajuda do programa MATLAB 6.5.

Cada pupa foi individualizada em frascos de plástico e pesada em balança analítica da marca Ohaus, antes que ocorresse a emergência dos adultos. Os dados de peso foram anotados na mesma planilha dos outros dados, para futura análise.

Após a pesagem, cada pupa foi devolvida ao seu respectivo frasco, para após a emergência ser feita a sexagem dos adultos. Também foi observado o número de indivíduos mortos nas diferentes dosagens, espécies e drogas analisadas, já que substâncias neurotóxicas e neurolépticas foram utilizadas. Neste caso, foi observado o número de larvas mortas no substrato de pupação ou mortalidade no estágio de pupa, no qual, passados vários dias, não houve a emergência do adulto.

Drogas utilizadas, suas disposições e dosagens.

Foi utilizado o Diazepam (grupo químico: Benzodiazepínico) (ansiolítico - Diazepam NQ 10mg - solução injetável - LABORATÓRIO NOVAQUÍMICA - ampolas de 2 mL), por causa de sua importância forense, já que está presente em casos de morte de pessoas com necessidade de administração médica desta droga (BERMAN *et al.*, 2005; BOND, 1998; LESTER, 1995; DIETCH & JENNINGS, 1988; GARDNER & COWDRY, 1985; HALL & ZISOOK, 1981; SZARA & LUDFORD, 1980).

O Diazepam atua no sistema nervoso e apesar de ser muito estudado nos seres humanos, ainda necessita de mais investigações para melhor compreensão de sua atuação neural (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004). Cabe aqui salientar que estudos sobre o efeito desta substância em insetos são escassos.

Os indivíduos utilizados nos diferentes tratamentos tiveram como fonte alimentar a dieta artificial proposta por LEAL *et al.* (1982), a qual possui fontes de proteínas e carboidratos que são necessárias para o desenvolvimento destas larvas de dípteros; ou fígado de coelho, animal modelo em muitos estudos científicos e forenses (DE LETTER *et al.*, 2002).

Assim, o benzodiazepínico foi colocado na dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982), substância que pode estar presente no corpo da vítima (cadáver) em investigações médico-criminais. As doses do ansiolítico (Diazepam) utilizadas nos tratamentos foram a DL50 (intravenosa) do animal-teste (coelho), ou seja, 9 mg/Kg (NIOSH, 2004). Foram utilizadas três dosagens no meio artificial: DL50 – coelho = 9mg/Kg, doses com metade da utilizada DL50 (D/2) e doses de duas vezes a DL50 utilizada (2D), sendo que o controle não foi adicionado nada a mais do que o presente na dieta de Leal *et al.* (1982).

Análise estatística e utilização de ferramentas computacionais.

Análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Bonferroni foram utilizados comparando as médias de profundidade, de distância e massa dos tratamentos realizados, utilizando nível de significância de 5%.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989); e calculada a média da distância mínima entre as pupas e

a média da mínima distância entre as pupas, nos diferentes tratamentos (doses) e substratos alimentares. Estas ferramentas utilizadas na melhor interpretação dos dados obtidos foram feitas com ajuda do programa MATLAB® 6.5, tal análise era imediata e foram obtidos gráficos e valores necessários para interpretação dos resultados.

Resultados e Discussão

Após a análise do efeito de Diazepam na dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica*, foi observado que as pupas encontradas nos diferentes tratamentos revelaram mudanças no padrão de dispersão larval pós-alimentar (profundidade e distância) e diferenças nas médias de algumas variáveis analisadas, como o massa.

A Tabela 2 mostra a média das variáveis obtidas (coordenadas xy, profundidade, distância e distância xyz) da distribuição das pupas encontradas nos diferentes tratamentos.

TABELA 2. Média de cada dado obtido da dispersão de *M. domestica* nas arenas. R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2.

	Media	x	y	profundidade (cm)	distância (cm)	distância xyz (cm)	Massa indivíduo (mg)
R1	Controle	0,18	1,65	6,01	6,69	9,53	23,9
	D/2	0,59	-0,27	6,21	7,63	10,31	20,3
	D	0,71	-0,06	6,58	5,48	9,13	20,2
	2D	0,09	0,38	5,28	5,76	8,10	21,6
R2	Controle	-0,91	1,47	6,18	7,12	9,84	23,1
	D/2	-0,40	0,99	6,12	7,23	9,90	20,0
	D	0,16	0,47	6,02	5,96	9,01	20,2
	2D	-0,36	1,05	4,79	6,33	8,30	20,0

A análise estatística utilizando a variável dependente profundidade mostrou haver diferenças somente entre os tratamentos ($F = 6,8972$; $p = 0,00014$), sendo que as réplicas ($F = 1,4527$; $p = 0,2285$) e a interação réplica x tratamento ($F = 0,8325$; $p = 0,4762$) não se diferenciaram. Assim, a presença do Diazepam no desenvolvimento larval de *M. domestica* alterou a profundidade de escolha do sítio de pupação, sendo que, por meio de testes de comparação múltipla, o tratamento 2D é significativamente diferente dos demais, mas os demais não podem ser considerados diferentes entre si. Este tratamento 2D apresentou menor média de profundidade comparando-se aos outros tratamentos nas duas réplicas realizadas. Assim, a presença do ansiolítico durante o desenvolvimento larval, nesta dose maior, parece ter causado uma alteração no padrão

de dispersão larval deste muscídeo, diminuindo a profundidade percorrida para escolha do sítio de pupação.

Já quando se analisa a variável distância, foram obtidas as mesmas diferenças observadas na análise da profundidade, ou seja, só houve diferença entre os tratamentos ($F = 6,2036$; $p = 0,00037$), sendo que as réplicas ($F = 1,8707$; $p = 0,1719$) e a interação réplica x tratamento ($F = 0,9029$ $p = 0,4393$) não apresentaram diferenças. Diferente do observado na análise da profundidade, o Diazepam alterou o padrão de dispersão larval de forma significativa no tratamento D, o qual teve média significativamente menor que os outros tratamentos. Além disso, o tratamento D/2 apresentou média de distância percorrida maior do que os demais.

Assim, a presença de Diazepam provocou alterações no padrão de dispersão e escolha do sítio de pupação pelas larvas de *M. domestica*, provavelmente atuando na fisiologia larval, ou seja, no metabolismo e no comportamento, alterando de alguma forma a percepção sensorial do meio. Um outro fator que pode alterar o padrão de dispersão deste muscídeo é a massa, como observado e discutido na revisão feita por GOMES *et al.* (2006), em que foram relatadas correlações entre massa, distância e profundidade atingidas por larvas de moscas em diferentes condições experimentais.

A análise da massa das pupas mostrou, assim como observado nas variáveis distância e profundidade, que só houve diferença entre os tratamentos ($F = 42,0077$; $p = 1,26 \cdot 10^{-24}$), sendo que as réplicas ($F = 0,0025$; $p = 0,9697$) e a interação réplica x tratamento ($F = 1,5501$ $p = 0,2004$) não apresentaram diferenças. A média de massa das pupas foi maior no controle (C) e menor no tratamento 2D; assim, as pupas encontradas nos diferentes tratamentos, que se desenvolveram na presença de doses maiores de Diazepam, apresentaram menor média de massa comparando-se ao controle. A presença do ansiolítico diminuiu a massa das pupas encontradas, e alterou a profundidade e distância em alguns tratamentos, devido à sensibilidade das larvas à dose utilizada nas réplicas.

Desta forma, pôde-se observar que o comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica* foi alterado em virtude da presença de Diazepam durante o desenvolvimento larval, variação esta que pode ser melhor visualizada na Figura 2, a qual mostra a variação na distribuição e número de indivíduos nos diferentes

tratamentos e réplicas, por meio de curvas de níveis, as quais representam a densidade de indivíduos dispersos e encontrados nas arenas.

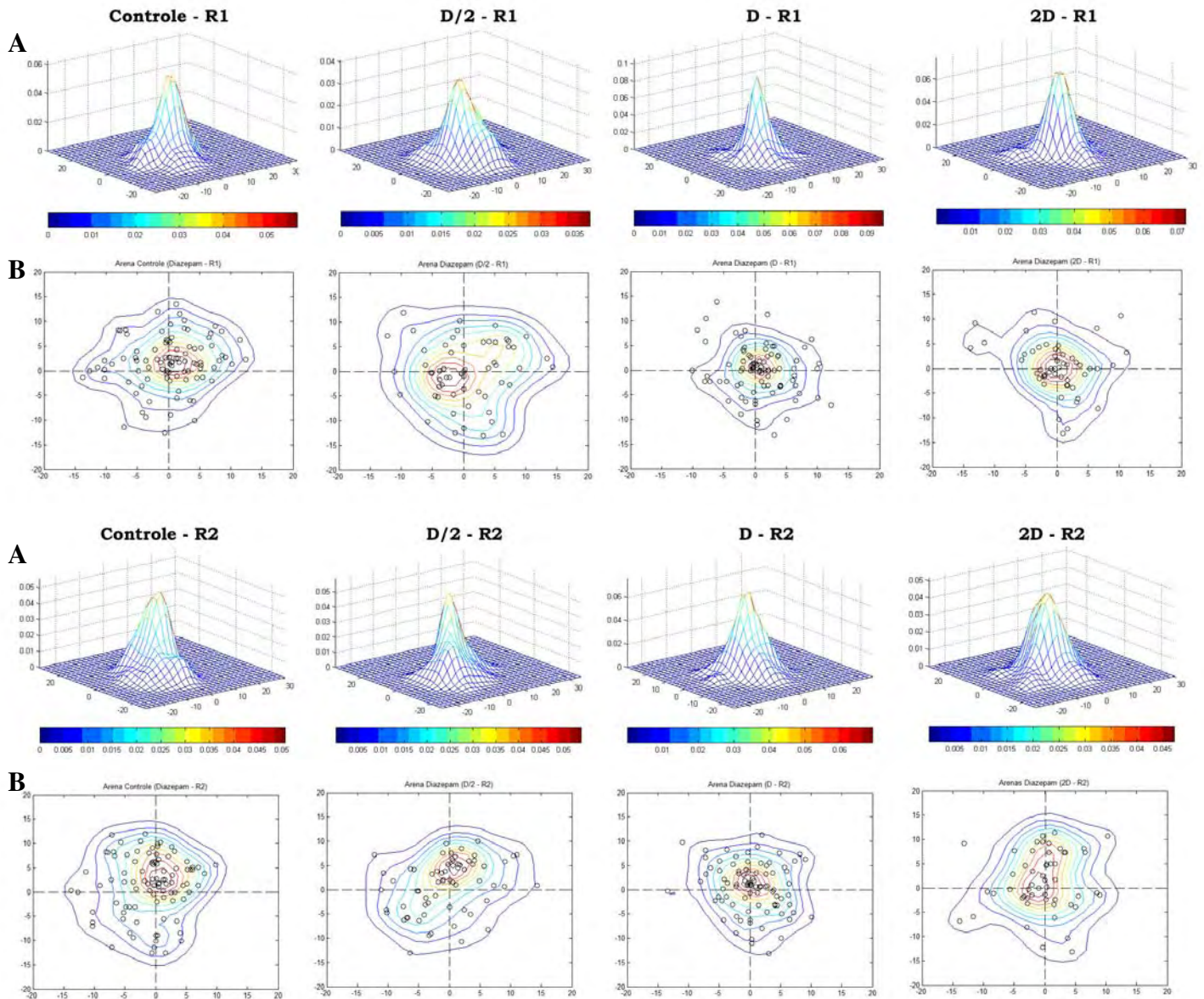


FIGURA 2. Gráficos de Distribuição/densidade e Dispersão x,y das pupas nas arenas nos diferentes tratamentos de Diazepam em dieta artificial. A - Análise em 3 dimensões da distribuição, B - Análise da base. R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. D/2 – metade de D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro de D.

O padrão de dispersão dos indivíduos pode ser melhor visualizado na Figura 2, onde a distribuição e a densidade dos tratamentos controle nas réplicas apresentaram maior área de distribuição (bases mais largas) e uma menor variação na densidade por

área (picos menos pronunciados), comparados aos tratamentos com presença do Diazepam. Esta figura nos permite visualizar a variável distância e a preferência da distribuição das pupas nos tratamentos. Pode-se constatar que o tratamento D foi o que mais alterou a distribuição das pupas em relação à distância, pois apresenta bases menores e picos mais pronunciados (Figura 2). Dado este confirmado anteriormente pelas médias e estatística. Assim, as diferentes doses de Diazepam causaram mudanças em todas as variáveis obtidas e atuando na distribuição das pupas presentes nos diferentes tratamentos.

No entanto, o número de pupas encontradas (Tabela 3) é visivelmente diferente comparando-se alguns tratamentos e a densidade na região central, local inicial da dispersão, quando se compara o controle com os tratamentos com Diazepam, os quais apresentam picos mais pontiagudos (Figura 2).

TABELA 3. Porcentagem de adultos emergentes (machos e fêmeas) em relação as 100 larvas inicialmente em dispersão larval pós-alimentar.

Porcentagem de pupas encontradas, emergência de adultos e sexo.					
	Tratamento	Adultos emergentes	Machos	Fêmeas	Pupas encontradas
R1	Controle	46.32	50.00	50.00	95.00
	D/2	51.67	45.16	54.84	60.00
	D	55.95	36.17	63.83	84.00
	2D	54.72	58.62	41.38	53.00
R2	Controle	53.68	52.94	47.06	95.00
	D/2	59.70	45.00	55.00	67.00
	D	56.25	48.89	51.11	80.00
	2D	54.24	59.38	40.63	59.00

Analisando a Tabela 3, pode-se observar que o aumento da dose de Diazepam alterou o número de pupas encontradas, uma vez que muitas larvas não conseguiram empupar, provavelmente devido ao efeito do Diazepam na massa destes indivíduos, uma vez que existe um valor de massa mínimo para que larva se transforme em pupa. Foi observado que houve efeito significativo do tratamento na massa, ou seja, quanto maior a dose de Diazepam, menor a massa da pupa encontrada, havendo uma relação assim com o número de pupas encontradas em cada tratamento (Tabela 3).

Pode-se observar uma emergência de adultos de *M. domestica* em torno de 50%, em todos os tratamentos, ou seja, apesar de muitas larvas não terem se transformado em pupas nos tratamentos com Diazepam, as que empuparam tiveram uma porcentagem de sobrevivência parecida à observada no controle. Desta forma, o ansiolítico parece não ter causado efeito a longo prazo nas larvas que tiveram contato com ele, uma vez que estas larvas estavam em contato com a droga apenas durante a alimentação larval e não durante o processo de dispersão. Esta mortalidade pode ter sido causada por efeitos da droga sobre a massa, como também manipulação das pupas e acondicionamento das mesmas para emergência do adulto e sexagem.

No entanto, mudanças comportamentais nestas larvas em contato com a droga foram observadas, pois houve diferenças na distribuição das pupas nas arenas, anteriormente discutido. Assim, para uma melhor interpretação dos dados obtidos, compreensão do comportamento de dispersão larval, escolha do sítio de pupação e efeito do Diazepam no padrão de dispersão larval pós alimentar de *M. domestica*, procurou-se analisar os diferentes tratamentos separando os indivíduos mortos dos sobreviventes nas diferentes doses do ansiolítico, tentando relacionar com a escolha do sítio de pupação e emergência ou não de adultos das pupas.

Observando as Figuras 3, 4, 5 e 6 e as Tabelas 4 e 5, pode-se avaliar a preferência na distribuição das pupas encontradas e a porcentagem de sobrevivência (emergência dos adultos) nas diferentes porções da arena nos diferentes tratamentos, avaliadas por meio de dados de profundidade e distância.

Observando a Figura 3, a qual mostra a distribuição das pupas, onde foi observado a emergência de adultos, em relação à profundidade do centro de dispersão, pode-se perceber um aumento na porcentagem de sobrevivência nos tratamentos com Diazepam, provavelmente ocasionado pelo número de pupas encontradas, nas arenas, ou seja, as que não morreram durante o estágio larval de dispersão foram mais resistentes e sobreviveram até se tornar adultas. No entanto, a viabilidade e fertilidade destes adultos não foram analisadas.

TABELA 4. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que houve emergência do adulto de *C. megacephala*, no diferentes tratamentos e substratos alimentares.

	Tratamento	Média das pupas em que houve emergência de adultos		
		Desvio padrão entre parênteses.		
Dieta artificial	C	Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)
	D/2	6.28 (2.51)	6.44 (3.41)	23.36 (3.09)
	D	6.51 (2.34)	7.71 (3.82)	19.42 (2.29)
	2D	6.10 (2.23)	5.46 (3.53)	20.27 (4.47)
		5.03 (2.58)	6.01 (4.08)	19.39 (3.26)

C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

TABELA 5. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que não houve emergência do adulto de *C. megacephala*, no diferentes tratamentos e substratos alimentares.

	Tratamento	Média das pupas em que não houve emergência de adultos		
		Desvio padrão entre parênteses.		
Dieta artificial	C	Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)
	D/2	5.93 (2.12)	7.29 (3.73)	23.63 (3.34)
	D	5.82 (2.52)	7.13 (3.17)	20.77 (4.31)
	2D	6.52 (2.45)	6.01 (3.51)	20.10 (3.65)
		5.10 (2.51)	6.24 (4.07)	19.00 (2.41)

C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

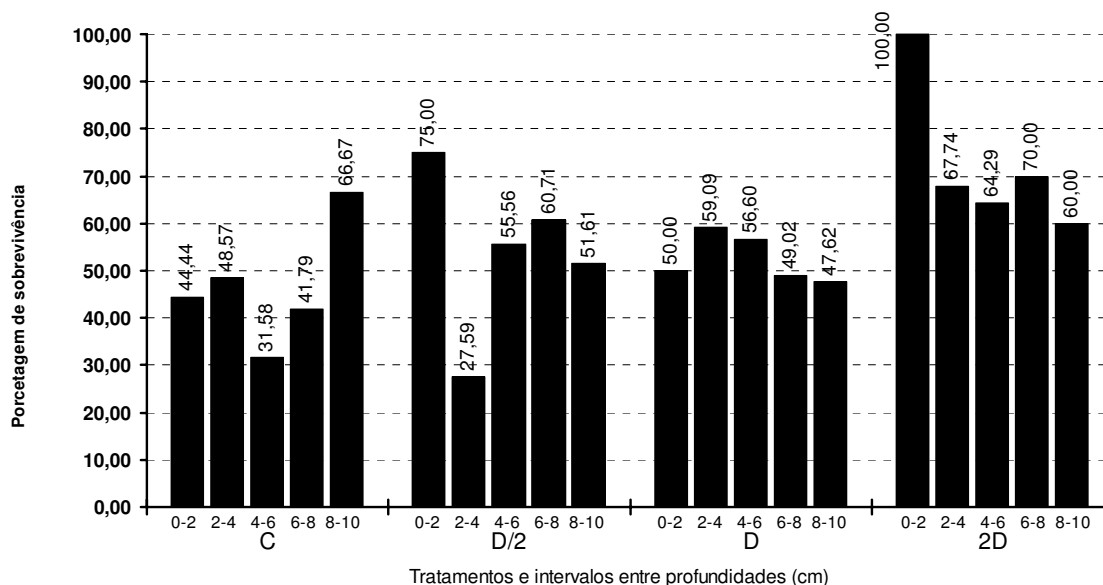


FIGURA 3. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de profundidades (cm). C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

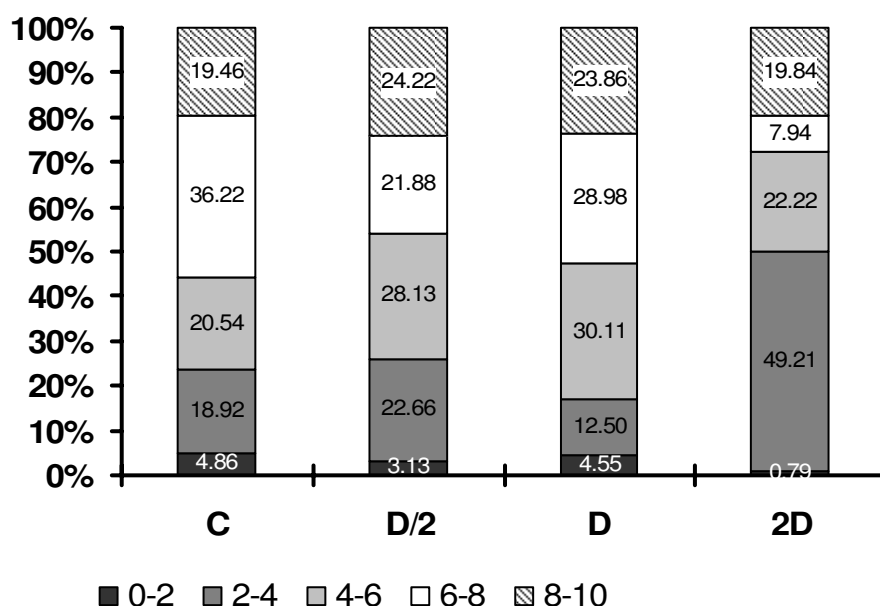


FIGURA 4. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de profundidade (cm) nos diferentes tratamentos. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

Analisando a Figura 4, observa-se no tratamento C uma preferência de escolha de sítio de pupação, entre 4 a 8 cm de profundidade, mas em maior número entre 6-8cm, já a maior porcentagem de sobrevivência no tratamento C foi na maior profundidade, de 8-10 cm (Figura 3). Poucas larvas foram encontradas nas porções mais superficiais das arenas em todos os tratamentos, provavelmente por efeitos de fatores presentes no substrato de pupação (umidade, temperatura, etc) e alta intensidade luminosa nesta região. Assim, a umidade e outros fatores poderiam influenciar de certa forma a escolha do sítio de pupação pelas larvas e a também na sobrevivência das pupas.

Os Tratamentos com Diazepam alteraram de certa forma a escolha do sítio de pupação, principalmente quando se observa o tratamento 2D, sendo que a maior quantidade de pupas (49,21%) foram encontradas entre 2 e 4 cm de profundidade, refletindo assim uma menor média de profundidade (Tabela 2) como observado e discutido anteriormente. Já nos outros tratamentos com o benzodiazepínico (D/2 e D), não foi observada tamanha variação em relação ao controle, da distribuição e preferência na profundidade, sendo observado um ligeiro aumento na região de 8-10 cm e uma preferência no intervalo de 4-6 cm de profundidade.

A sobrevivência das pupas e a preferência na escolha do sítio de pupação pelas larvas em diferentes intervalos de distância do centro da arena (paralela a superfície) podem ser observadas nas Figuras 5 e 6.

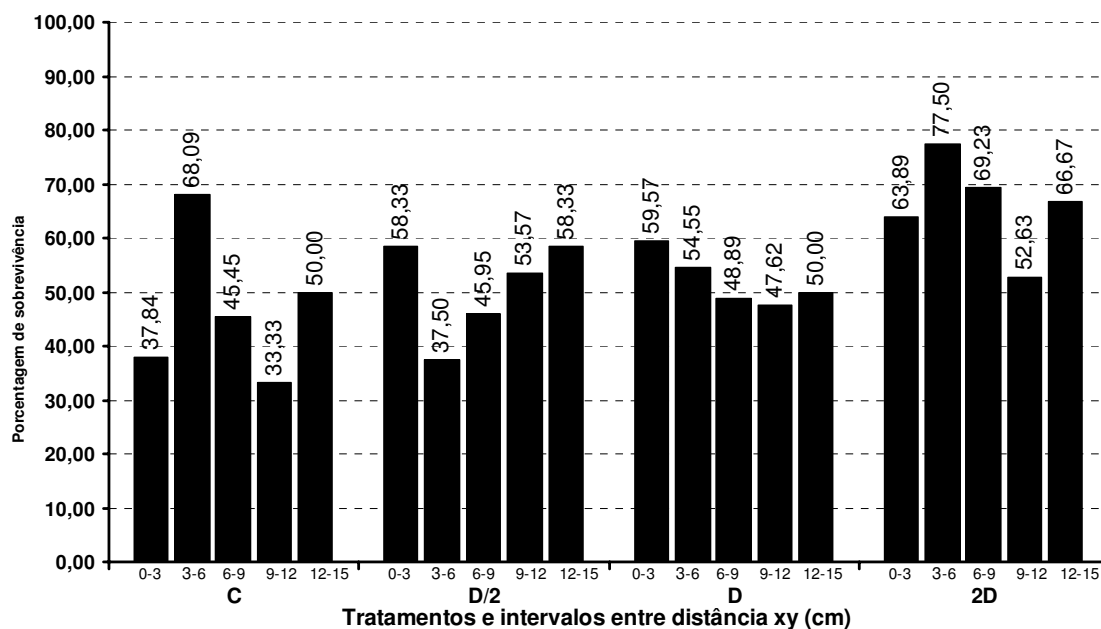


FIGURA 5. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de distância xy (cm). C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

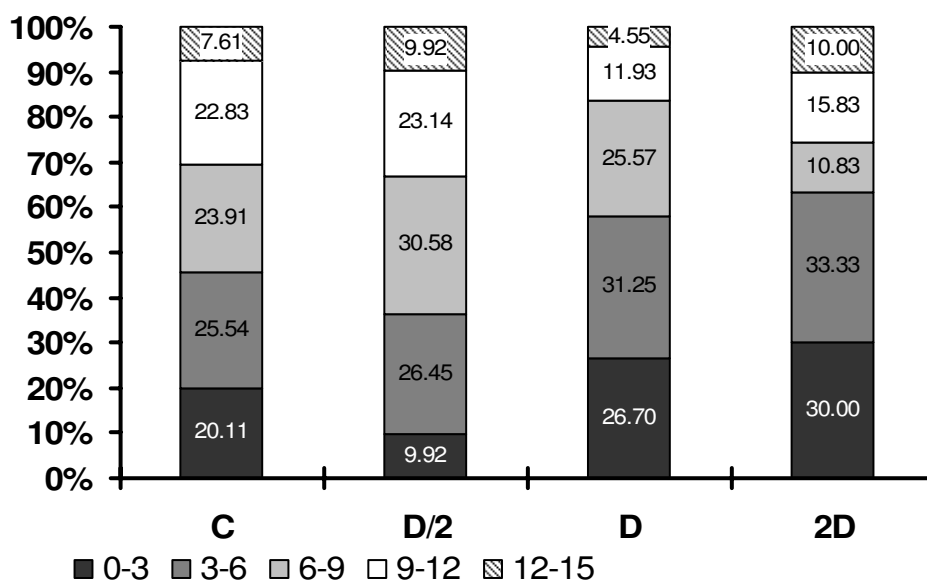


FIGURA 6. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de distância xy (cm) nos diferentes tratamentos. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

A preferência de escolha do sítio de pupação no tratamento C em relação à distância apresentou intervalos próximos de porcentagem, sendo que a menor quantidade de pupas foi encontrado no maior intervalo de distância (12-15cm) (Figura 6). Já a porcentagem de sobrevivência foi maior entre 3-6 cm de distância, região mais central da arena (Figura 5), lembrando que poucos indivíduos foram encontrados próximos a superfície. Já os tratamentos com Diazepam se diferenciaram do controle, sendo que em D/2, a distância foi maior na preferência pela escolha do sítio de pupação (diminuiu a porcentagem de pupas na distância de 0 a 3 cm em relação ao controle), e em D e 2D uma tendência de menor distância percorrida (aumentando a porcentagem nas menores distâncias), comparando-se ao controle (C) (Figura 6). Fato este também observado no tratamento 2D em relação a profundidade (Figura 4). Dados estes também confirmados pela análise estatística anteriormente discutida.

Já a sobrevivência das pupas e emergência de adultos variou diferentemente entre os tratamentos, sendo observado apenas que, nas maiores doses de Diazepam a sobrevivência era maior e houve uma maior homogeneidade da porcentagem de sobrevivência nos diferentes intervalos de distância. Tais variações na sobrevivência das pupas e emergência de adultos podem ter influência de algumas variáveis dentre elas: a umidade do solo, perda de água, influência da droga, manipulação das pupas e acondicionamento delas. Já as variações obtidas na escolha do sítio de pupação, na dispersão larval podem sofrer influência da substância utilizada (Diazepam), efeito do agregado e número de indivíduos ou pupas encontrados.

Foi observado que o ansiolítico presente no substrato de alimentação causou uma mudança do padrão de dispersão larval, consequência de prováveis mudanças fisiológicas (metabólicas e sensoriais) nas larvas presentes nestes tratamentos. Esta modificação fisiológica é provavelmente causada pelo modo de atuação dos benzodiazepínicos no sistema nervoso (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004), acarretando provavelmente uma diminuição da atividade metabólica e conseqüentemente na movimentação das larvas no substrato. Outro componente que o ansiolítico pode ter afetado é o sistema sensorial larval, pois se trata de uma substância que funciona como um neurotransmissor, a qual pode modificar o estado de equilíbrio do sistema nervoso, podendo assim, afetar e alterar o padrão de dispersão larval (diminuindo a distância percorrida).

Outro fator que pode alterar a escolha do sítio de pupação e assim, influenciar a dispersão larval é o efeito da vizinhança. BOLDRINI *et al.* (1997) analisaram a dispersão larval pós-alimentar de moscas varejeiras por meio de modelos matemáticos e observaram que o efeito da vizinhança influencia a escolha do local de pupação, principalmente de *C. megacephala* e *C. putoria* espécies introduzidas no Brasil.

Desta forma, a escolha do sítio de pupação tem influência da localização de pupas próximas. No entanto, as presenças de substâncias químicas em contato com as larvas poderiam influenciar a percepção da vizinhança e assim modificar a distância entre pupas vizinhas, devido principalmente ao efeito destas substâncias na fisiologia e comportamento destas larvas e na percepção sensorial do meio. Com isto, foram obtidos valores para cada arena de dispersão, da média da distância entre as pupas e da média da distância mínima entre pupas (Tabela 6) para avaliação de prováveis mudanças na escolha do sítio de pupação e do efeito da vizinhança pelas interações não locais. Na Figura 7, pode se visualizar a variação das médias da mínima distância entre as pupas.

TABELA 6. Média e variância da distância entre pupas e da distância mínima entre pupas.

		Média da Distância entre pupas	Variância	Média das Distância mínimas entre as pupas	Variância
R1	C	10.03	22.45	1.89	0.24
	D/2	11.46	26.30	2.68	0.45
	D	8.77	20.59	1.80	0.23
	2D	9.38	27.43	2.20	0.53
R2	C	10.38	23.70	1.91	0.25
	D/2	10.64	24.16	2.38	0.37
	D	9.25	19.60	1.94	0.22
	2D	10.51	27.08	2.32	0.52

C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

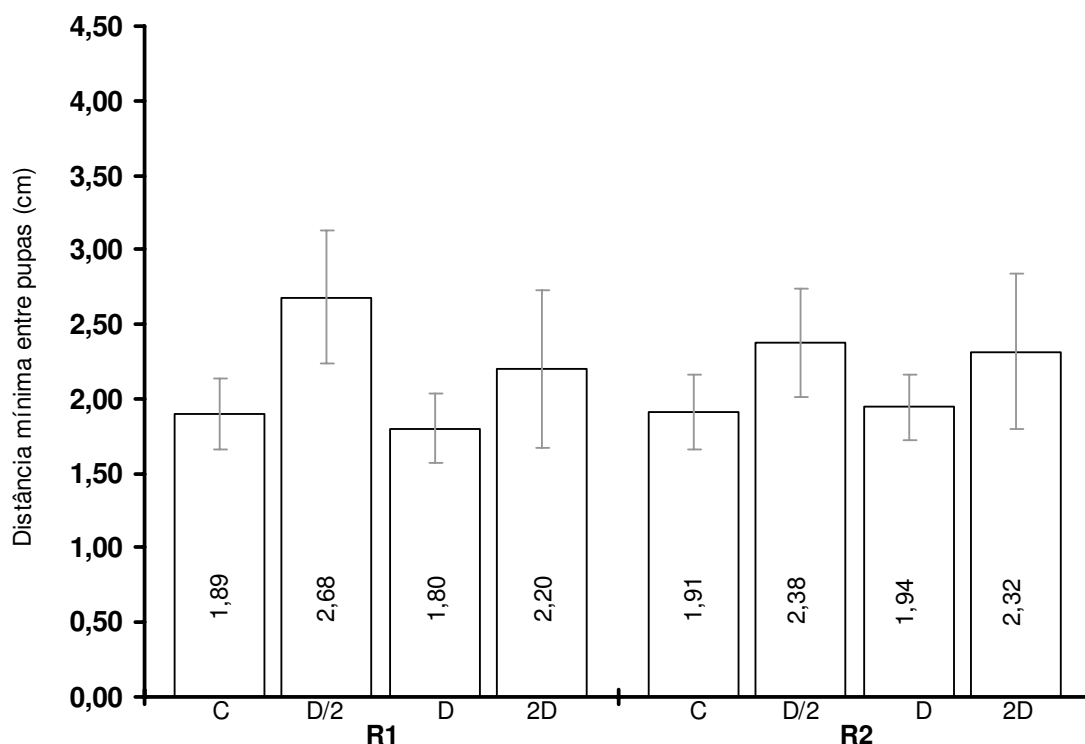


FIGURA 7. Gráfico mostrando a média e a variância da mínima distância entre pupas nas arenas em diferentes tratamentos (C, F/2, F e 2F). R1 e R2 – Réplicas. C – controle, D/2 – metade da dose D, D – DL50 de Diazepam para coelho e 2D – dobro da dose D.

A análise destes dados de distância mínima sofre influência do número de pupas, da distância e da profundidade em que as mesmas foram encontradas, tendo em vista que os tratamentos causaram diferenças em todos estes dados observados (Tabela 2 e 3). Podem-se observar diferenças significativas na média da distância mínima entre os tratamentos nas réplicas (R1: $F = 5,8510$; $p = 0,0010$; R2: $F = 3,2286$; $p = 0,0224$). Por meio de comparação múltipla entre os tratamentos, em R1 o tratamento D/2 é diferente de todos os demais e D é diferente de 2D, já em R2 o tratamento C foi semelhante ao D e, o D/2 semelhante a 2D. Os tratamentos foram diferentes entre si dependendo da réplica analisada.

Analisando estes dados de distância pode-se perceber que apesar das diferenças entre as réplicas em relação à estatística, os tratamentos D/2 se diferenciaram do controle apresentando maiores médias de mínima distância entre as pupas. Foi observado também neste tratamento que o número de pupas encontradas foi menor, nas duas réplicas, que o obtido no controle. Sendo assim, um menor número de pupas na

arena diminuiria a densidade de pupas por área, possibilitando assim, uma distância mínima entre as pupas maior, o que foi observado na média deste tratamento. Fato este também observado no tratamento 2D o qual apresentou valores de média de mínima distância maiores ao controle e número de pupas encontradas menores ao controle. Diferentemente do observado no tratamento D, o qual não se diferenciou do controle nas duas réplicas, apesar de apresentar o número de pupas encontradas ligeiramente menor ao controle (Tabela 3), sendo que nos tratamentos D/2 e 2D a diferença era maior.

Esta mínima distância entre as pupas é influenciada pela profundidade e distância percorrida pelas larvas; assim, quanto maior a distância xyz maior seria a possibilidade de apresentarem uma mínima distância entre pupas maior, no entanto sabe-se que a influência da vizinhança atua no comportamento de dispersão de califórídeos como observado por BOLDRINI *et al.* (1997), fazendo com que a distância percorrida pelas larvas seja alterada com presença de pupas e indivíduos na vizinhança.

Foi observado que 2D apresentou a menor profundidade percorrida pelas larvas diferenciando significativamente dos outros tratamentos, e também a menor distância xyz (Tabela 2) e menor número de pupas encontradas (semelhante a D/2 – Tabela 3), tal padrão de dispersão, no entanto, apresentou valores de distância mínima maiores que C e D. Assim pode-se observar que apesar de ter percorrido pouca distância na escolha do sítio de pupação, o número de pupas encontradas foi menor.

Já o tratamento D apresentou a menor distância, diferenciando significativamente dos outros tratamentos, assim como D/2 apresentou a maior distância. No entanto, avaliando a distância xyz pode-se perceber comparando os tratamentos, uma ordem decrescente no valor da distância xyz ($D/2 > C > D > 2D$), sendo que o tratamento D/2 apresentou maiores médias de distâncias mínimas, ou seja, apesar de possuir menor número de pupas encontradas (Tabela 3), em relação ao controle, a dispersão foi maior neste tratamento em relação a todos os outros. Tal diferença pode ter sido causada pela influência do Diazepam na locomoção e percepção sensorial do meio.

Já o tratamento 2D foi o que apresentou menores valores de distância xyz, no entanto, a média da mínima distância entre pupas foi maior que o controle e que D, provavelmente esta diferença foi causada pela quantidade de pupas encontradas que foi

a menor entre os tratamentos. Já no tratamento D, o número de pupas encontradas foi bem maior que o observado em 2D (Tabela 3) e a média da mínima distância foi semelhante ao controle.

Desta forma, o ansiolítico presente no substrato de alimentação causou uma mudança no padrão de dispersão larval, consequência de prováveis mudanças fisiológicas (metabólicas e sensoriais) nas larvas presentes nestes tratamentos. Tal mudança metabólica pôde ser observada no comportamento dinâmico do agregado larval dentro dos frascos, onde foi observada uma menor atividade dinâmica do aglomerado larval nos tratamentos em que o ansiolítico (Diazepam) estava presente, que pode ter tido reflexos no comportamento das larvas fora dos frascos, no substrato de pupação.

Esta modificação da atividade dinâmica é provavelmente causada pelo modo de atuação dos benzodiazepínicos no sistema nervoso (ROGAWSKI & LOSCHER, 2004), acarretando provavelmente uma diminuição da atividade metabólica e conseqüentemente na movimentação das larvas no substrato. Outro componente que o ansiolítico pode ter afetado é o sistema sensorial larval, pois se trata de uma substância que funciona como um neurotransmissor, a qual pode modificar o estado de equilíbrio do sistema nervoso, podendo assim, afetar e alterar o padrão de dispersão larval (diminuindo a distância percorrida nas maiores doses 2D ou aumentando nas menores doses D/2).

Conclusões

Os resultados do presente estudo mostraram que o Diazepam altera o padrão do comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica*, alterando a distância e a profundidade na escolha do sítio de pupação, quando comparado com o controle. O tratamento D/2, com menor dose de Diazepam, causou aumento na distância percorrida pelas larvas para escolha do sítio de pupação; já nas doses maiores (D e 2D), a distância percorrida foi menor a obtida no controle; tal variação pode ter sofrido influência do efeito da vizinhança, da massa e alteração sensorial nas diferentes doses de ansiolítico.

São necessários também mais estudos visando avaliar os efeitos deste ansiolítico no metabolismo, nas células e a nível molecular para uma melhor compreensão dos efeitos gerados no comportamento de dispersão larval pós-alimentar neste muscídeo.

Além de mais estudos com outras espécies de insetos de importância forense com diferentes drogas e doses, para uma melhor compreensão do efeito de substâncias químicas sobre os insetos.

Referências Bibliográficas

- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- ARNALDOS, I; ROMERA E.; GARCÍA, M. D. & LUNA, A. An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the southeastern Iberian peninsula. **Int. J. Legal Med.** 114: 156–162, 2001.
- BECKEL, H., LORINI, I. & LAZZARI, S. M. N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revta. Bras. Entomol.**, 48(1): 115-118, 2004.
- BERMAN, M. E.; JONES, G. D. & MCCLOSKEY, M. S. The effects of diazepam on human self-aggressive behavior. **Psychopharmacology**, 178: 100-106, 2005.
- BOLDRINI J. L., BASSANEZI, R. C., MORETTI, A.C., VON ZUBEN, C. J. GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **J. Theor. Biol.**, 185: 523-531, 1997.
- BOND, A.J. Drug-induced behavioural disinhibition: incidence, mechanisms and therapeutic implications. **CNS Drugs**, 9:41–57, 1998.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BYRD, J.H., CASTNER J.L. **Insects of forensic importance**. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Florida, p.43– 79, 2001.
- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeasten Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.

- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.
- DE CHATEAU P. 1990. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476.
- DE LETTER, E. A., CLAUWAERT, K. M., LAMBERT, W. E., VAN BOCXLAER, J. F., DE LEENHEER, A. P., PIETTE, M. H. Distribution study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.26, n.2, Mar, p.113-8, 2002.
- DIETCH J.T.; JENNINGS, R.K. Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. **J. Clin. Psychiatry**, 49:184–188, 1988.
- GARDNER, D.L & COWDRY R.W. (1985) Alprazolam-induced dyscontrol in borderline personality disorder. **Am. J. Psychiatry**, 142: 98–100, 1985.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.
- GOMES, L.; SANCHES, M. R. & VON ZUBEN, C. J. Dispersal and Burial Behavior in Larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). **J. Insect Behavior**, 18(2): 281-292, 2005.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & GOVONE, J. S. Comportamento de dispersão larval radial pós alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. **Entomol. Vect.**, 9: 115-132, 2002.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.

- GOMES, L.; GODOY, W. A. C. & VON ZUBEN, C. J. A review of postfeeding larval dispersal in blowflies: implication for forensic entomology, **Naturwissenschaften**, 93: 207-215, 2006.
- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.**: 83: 1210-1214, 1990.
- GREENBERG, B. **Flies and Disease. Classification and Biotic Associations**, Princeton University, New Jersey, p. 856, 1971.
- GRENN, A. A. The control of blowflies infesting slaughter-houses. I. Field observations of habits of blowflies. **Ann. Appl. Biol.**, 38: 475, 1951.
- HALL R.C.W., ZISOOK S.. Paradoxical reactions to benzodiazepines. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, 11: 45–49, 1981.
- HAYNES, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol.**, 33: 149-168, 1988.
- INTRONA, F., C.P. CAMPOBASSO & M.L. GOFF. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.** 120: 42-47, 2001.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LESTER, D. Case consultation: diffusion of responsibility in the care of a difficult patient. **Suicide Life Threat Behav.**, 25: 415–421, 1995.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MARICONI, F. A. M., GUIMARÃES, J. H. & BERTI-FILHO, E. A mosca doméstica e algumas outras moscas nocivas. FEALQ, Piracicaba, p. 135, 1999.
- NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances**. Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.
- NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Volume 2: Physical

- Trauma. Tedeschi, C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.
- O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.
- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. **In: Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J Forensic Sci**: 42:481–485, 1997.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- SUKONTASON, K., SUKONTASON, K. L., PIANGJAI, S., BOONCHU, N., KURAHASHI, H., HOPE, M. & OLSON, J. K. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. **Micron** 35: p.391–395, 2004.
- SZARA, S. I. & LUDFORD, J. P. **Benzodiazepines: A Review of Research Results**. NIDA Research Monograph, p.101, 1980.
- VON ZUBEN, C. J. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 4: 525-533. 1998.
- WOODS, J. H., Katz, J. L. & Winger, G. Benzodiazepines: Use, Abuse, and Consequences. **Pharmacol. Rev.**, 44(2): 151-347, 1992.
- WORTON, B.J. Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies, **Ecology**, 70(1):164-168, 1989.

CAPÍTULO 6

Efeito do Fipronil na dispersão pós-alimentar larval de
Chrysomya megacephala (F) (Diptera: Calliphoridae).

Resumo

Chrysomya megacephala tem grande importância médico-sanitária e na entomologia forense por ser uma das espécies que primeiro chega a cadáveres. Diversas formas de controle desta espécie têm sido utilizadas, principalmente com o uso de inseticidas. As larvas de *C. megacephala*, após a exaustão dos recursos alimentares, abandonam o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação, processo chamado de dispersão larval pós-alimentar. No entanto, este substrato de pupação pode estar contaminado com substância química, a qual pode alterar o comportamento de dispersão larval. Assim, foi utilizado Fipronil no substrato de pupação (inseticida - Regent 800 WG) para avaliar o efeito no comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala*, pois esta substância pode interferir nos processos neurológicos, inibindo ou hiperativando os neuro-transmissores, podendo causar mudanças fisiológicas (no desenvolvimento e no comportamento), as quais têm importância na estimativa do IPM (intervalo pós-morte - ciência forense). A dispersão pós-alimentar larval foi realizada em 4 arenas circulares (Controle, Dose de referência, metade da dose de referência e o dobro da dose de referência - com réplicas) preenchidas com areia, com diâmetro de 30 cm e profundidade 10 cm. O Fipronil foi aplicado (spray) no substrato de dispersão (areia), na superfície da arena na dose de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^2$. As larvas ao atingirem o 3º instar, foram soltas no centro das arenas (100 larvas liberadas em cada tratamento), e posteriormente, após a formação das pupas, os dados referentes à profundidade e ao posicionamento de cada pupa na arena foram analisados. Foi observado nos tratamentos com Fipronil, que a profundidade de enterramento e a distância das pupas do centro de irradiação foram alteradas, de forma diferente nos diferentes tratamentos e réplicas, quando comparadas ao tratamento controle. As maiores doses de Fipronil causaram

maiores mortalidades de larvas e pupas. A presença do inseticida causou redução na massa das pupas coletadas de forma que quanto maior a dose, maior a redução na massa destas pupas encontradas. Tais variações na dispersão foram provavelmente causadas por mudanças sensoriais e motoras nas larvas em virtude da droga utilizada.

Introdução

As moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Família: Calliphoridae) têm grande importância médico-sanitária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (FURLANETTO *et al.*, 1984), podendo causar miíases nos animais e homem (GUIMARÃES *et al.*, 1983; ZUMPT 1965). Várias formas de controle destas moscas têm sido propostas, principalmente utilizando-se inseticidas, os quais agem das mais diferentes formas. MATSUMURA (1985) classificou os inseticidas baseado no seu modo de ação em: (a) físicos, (b) protoplasmáticos, (c) inibidores metabólicos, (d) agonistas de hormônios, (e) estomacais e (f) neurotóxicos. Entretanto, o principal alvo de ação dos inseticidas tem sido o sistema nervoso, devido à alta eficácia e rápida resposta que proporcionam no controle de pragas (CASIDA & QUISTAD, 1998; LUND, 1985; MATSUMURA, 1985; WARE, 1989).

Dentre estas moscas-varejeiras *Chrysomya megacephala* possui também fundamental importância na entomologia forense por ser uma das espécies que primeiro chega aos corpos em decomposição (GUIMARÃES *et al.*, 1978), e também por se alimentar dos mesmos durante seu estágio larval, podendo assim indicar o intervalo pós-morte (IPM), que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo (CATTS & GOFF, 1992), dado de extrema importância nas investigações criminais.

Esta mosca utiliza-se de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos pelas fêmeas e para alimentação das larvas (KAMAL, 1958; HANSKI, 1987; PESCHKE *et al.*, 1987; PUTMAN, 1977). O estágio larval é o principal período em que ocorre limitação de recursos alimentares em moscas-varejeiras (LOMINICKI, 1988), e a competição por esses recursos é geralmente do tipo exploratória (REIS *et al.*, 1994), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (ULLYETT, 1950). Após essa competição, as larvas começam a

procurar por um sítio de pupação no habitat, ou por mais fonte de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, e esse processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG, 1990), a qual apresenta deve ser considerada na estimativa do IPM (GOMES *et al.*, 2003; VON ZUBEN *et al.*, 1998).

Alguns estudos de dispersão larval em califorídeos vêm sendo realizados desde os trabalhos de GRENN (1951), de GREENBERG (1990), como o de NUORTEVA (1977), e outros envolvendo modelos, como os de dispersão larval pós-alimentar em ambiente restrito à uma única direção que se basearam em equações de difusão (BASSANEZI *et al.*, 1997), análises estatísticas (GODOY *et al.*, 1995, 1996; VON ZUBEN *et al.*, 1996), sob o enfoque de interações não-locais (BOLDRINI *et al.*, 1997), e através da análise de dispersão em arenas circulares para pupação (GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2005). Além disso, estudos de dispersão e outros que observem tipos de comportamentos espaço-temporais, muito comuns em ecologia populacional, vêm utilizando modelagens físico/matemáticas e simulações de fenômenos em sistemas complexos, para melhor compreensão e interpretação dos dados observados (TEWS *et al.*, 2004; ZIV, 1998), tendo em vista a grande quantidade de variáveis envolvidas e a interação existente entre as mesmas.

No entanto, ainda não existem trabalhos que observem o comportamento de dispersão larval e conseqüente padrão de distribuição espacial nos sítios de pupação, de indivíduos em contato com substratos de pupação com substâncias químicas (inseticidas), as quais podem influenciar neste e em outros comportamentos. Estas substâncias químicas podem interferir nos processos neurais, inibindo ou hiperativando os mensageiros químicos (neurotransmissores), causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento do organismo em contato com a mesma (HAYNES, 1988; OMOTO, 2000).

Os efeitos destas substâncias tóxicas ao sistema nervoso sobre o comportamento dos insetos têm sido pouco estudados, sendo que alguns trabalhos existentes com este enfoque são com larvas de *Sarcophaga bullata* (ZDÁREK *et al.*, 2004), em que se observam mudanças no comportamento de pupação destes dípteros; efeitos comportamentais e de mortalidade em vespas parasitas *Aphidius ervi* (DESNEUX *et al.*, 2004), efeitos no comportamento de culicídeos (CHAREONVIRIYAPHAP *et al.*, 2001;

MATHENGE *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 2000; SUNGVORNYOTHIN *et al.*, 2001) e efeitos de *deltamethrin* no comportamento de coleópteros adultos (BECKEL *et al.*, 2004).

No entanto, muitos insetos apresentam certa resistência a alguns inseticidas utilizados, e um inseticida que vem sendo bastante utilizado ultimamente e com grande eficiência no controle de cupins e gafanhotos, pragas estas de grande importância agrícola, e em qualquer estágio do desenvolvimento (ninfal, larval ou adulto), é o Fipronil (grupo químico: Fenil Pirazol) (BOBE *et al.*, 1997; KIDDS & JAMES, 1991; UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2006). O Fipronil atua sobre o sistema receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA) do tipo A dos insetos (KIDD & JAMES, 1991), bloqueando os canais de cloro nos neurônios. Assim, o efeito é a remoção da inibição neural pelo GABA, resultando em uma atividade neuronal excessiva (KIDD & JAMES, 1991). Em uma dose suficiente, o Fipronil causa excessiva excitação neural, paralisia severa e morte do inseto (BOBE *et al.*, 1998).

Assim, estudos que procurem observar a atuação de inseticidas e drogas no sistema nervoso têm sido de fundamental importância (VON KEYSERLINGK, 1985) para que se possa obter um melhor conhecimento do modo de ação, conseqüências comportamentais e mudanças fisiológicas nos seres vivos, além de, no caso de insetos pragas, auxiliarem na elaboração de programas de manejo da resistência destes a inseticidas (GEORGHIOU, 1983). Assim o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do Fipronil (Inseticida: Fenil Pirazol) no padrão de comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* em arenas circulares.

Material e Métodos

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizado como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como

substrato para postura pelas fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção de geração F_1 . Somente a geração F_2 foi empregada nos experimentos.

Como substrato alimentar para desenvolvimento larval da espécie estudada, foi utilizado: meio artificial, à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982).

Os ovos destas espécies foram depositados pelas fêmeas (F_1) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os ovos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais. Foram formadas densidades de 400 larvas por frasco, sendo feitos dois experimentos (duas réplicas) em dieta artificial. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em frascos contendo dieta artificial (LEAL *et al.*, 1982) (400 larvas em 125 gramas de dieta – 0,31g/larva) como substrato alimentar, para desenvolvimento das larvas.

Após o desenvolvimento larval que durou aproximadamente 72h, foram separadas em torno de 100 larvas junto com o substrato alimentar, que foram depositadas no centro de uma arena circular de 30 cm de diâmetro e de 10 cm de profundidade forradas com areia [aproximadamente 7 dm^3] (Figura 12), na qual as larvas irradiaram para buscar seu sítio de pupação. Estas arenas foram colocadas em salas com temperatura variando entre 25°C e 27°C , com fotoperíodo de 24 h, ou seja, luz total.

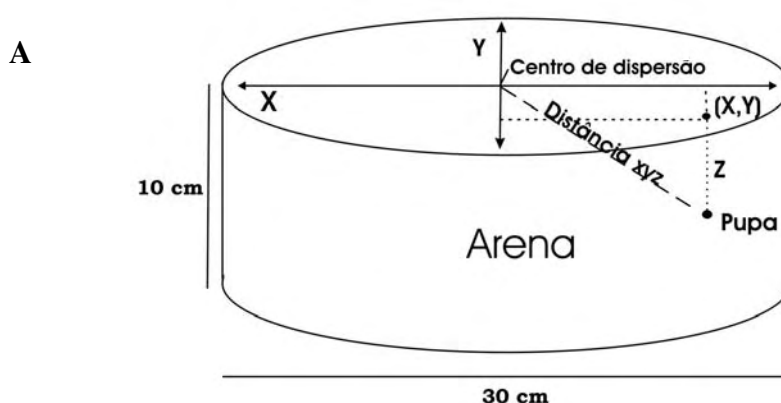


FIGURA 1. Esquema e foto das arenas utilizadas para estudo da dispersão larval pós-alimentar.

A areia utilizada no experimento foi previamente lavada em água corrente, para retirada de qualquer substância química presente na mesma e peneirada, para que

ficasse mais homogênea no tamanho de seus grãos (diâmetro dos grãos era menor que 1 mm), e posteriormente armazenada para ser utilizada na montagem das arenas. Foram feitos duas réplicas e cada réplica composta por quatro tratamentos (4 arenas), sendo um controle, um com a dose de Fipronil utilizada no controle de pragas (F) (**D**), um com o dobro da dose F (**2F**) e outra com metade da dose F(**F/2**).

O volume de areia colocado nas arenas recebia 800 mL de água antes de se montar as arenas e iniciar a dispersão, pois este substrato, se totalmente seco, impossibilitava que as larvas conseguissem se enterrar, causando a morte das mesmas. Após a montagem de todas as arenas, 50 mL de água eram dispersos pela superfície destas por meio de “spray”, com a presença de Fipronil (tratamentos com dose) ou sem a presença do inseticida (controle). A Tabela 1 abaixo mostra a metodologia empregada nos substratos alimentares e nas arenas de dispersão.

TABELA 1. Metodologia utilizada nos substratos alimentares e nas arenas de dispersão.

* volume “exemplo” calculado de acordo com a massa média dos animais utilizados.

Metodologia utilizada nas arenas de dispersão larval pós-alimentar				
Denominação do tratamento	Tratamento realizado no substrato			
	Substrato alimentar larval	Substrato de pupação		
Controle	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 50 mL de água	areia
F/2	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 0,88 mg de Fipronil (50 mL)	areia
F	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 1,76 mg de Fipronil (50 mL)	areia
2F	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão “spray” de 3,52 mg de Fipronil (50 mL)	areia

Dados que foram obtidos na análise das arenas.

Após as larvas empuparem, elas foram individualmente localizadas e retiradas da areia, sendo medidas para cada uma as coordenadas no eixo x,y e a profundidade (z) do local de pupação em relação ao centro, com o auxílio de régua. Através dos dados de coordenada, foram obtidas a distância de cada pupa do centro de irradiação e a distância xyz, como pode ser observado na Figura 1. A contagem começou da periferia para o centro.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989), com ajuda do programa MATLAB[®] 6.5, visando uma

melhor interpretação e visualização dos padrões de dispersão larval e localização das pupas nos diferentes tratamentos.

Cada pupa foi individualizada em frascos de plástico e pesada em balança analítica da marca Ohaus, antes que ocorresse a emergência dos adultos. Os dados de peso foram anotados na mesma planilha dos outros dados, para futura análise.

Após a pesagem, cada pupa foi devolvida ao seu respectivo frasco, para após a emergência ser feita a sexagem dos adultos. Também foi observado o número de indivíduos mortos nos diferentes tratamentos, procurando ver a influencia da dose do inseticida na mortalidade e no comportamento de dispersão. Neste caso, foi observado o número de larvas mortas no substrato de pupação ou mortalidade no estágio de pupa, no qual, passados vários dias, não houve a emergência do adulto.

Drogas utilizadas, suas disposições e dosagens.

Foi utilizado o Fipronil (ingrediente ativo - grupo químico: Fenil Pirazol) (inseticida (Produto comercial) - Regent[®] 800 WG), sendo amplamente estudados seus efeitos no sistema nervoso dos insetos (DUHAN *et al.*, 2001) e administrado em diversas culturas agrícolas para controle de pragas (AGROFIT, 2006).

O inseticida foi colocado no substrato de pupação (areia) nas arenas, devido a seu modo de aplicação na agricultura. A dose utilizada para observação do efeito desta substância no padrão de dispersão larval foi igual a uma dose média utilizada na agricultura para o controle de diversas pragas (AGROFIT, 2006), (250g de p.c./ha (hectare) que corresponde a $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg/cm², ou seja, 1,76 mg de Fipronil / arena, dose utilizada pra controle de cupins [*Cornitermes cumulans* e *Heterotermes tenuis*] e broca da cana [*Diatraea saccharalis*] [AGROFIT, 2006]), sendo disperso por meio de “spray” um volume total de 50 mL (água e/ou substância dissolvida) sobre toda a superfície da arena.

Foram feitos quatro tratamentos, o tratamento controle (C), o qual recebia 50 mL de água dispersa na superfície antes de se colocarem as larvas; e três tratamentos com doses diferentes de Fipronil: F/2 (metade da dose utilizada na agricultura), F (dose utilizada na agricultura) e 2F (o dobro de F) .

Análise estatística e utilização de ferramentas computacionais.

Análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Bonferroni foram utilizados comparando as médias de profundidade, de distância e massa dos tratamentos realizados, utilizando nível de significância de 5%.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989); e calculada a média da distância mínima entre as pupas e a média da mínima distância entre as pupas, nos diferentes tratamentos (doses) e substratos alimentares. Estas ferramentas utilizadas na melhor interpretação dos dados obtidos foram feitas com ajuda do programa MATLAB 6.5, sendo que foram obtidos gráficos para interpretação dos resultados.

Resultados e discussão

Na análise do efeito de Fipronil na dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* foi observado que as pupas encontradas nos diferentes tratamentos revelaram mudanças no padrão de dispersão larval pós-alimentar (profundidade e distância) e diferenças nas médias de algumas variáveis analisadas, como o massa.

A Tabela 2 mostra a média das variáveis obtidas (coordenadas xy, profundidade, distância e distância xyz) da distribuição das pupas encontradas nos diferentes tratamentos.

TABELA 2. Média de cada dado obtido da dispersão de *C. megacephala* nas arenas tratadas com Fipronil.

	média	x	y	profundidade (cm)	distância (cm)	distância xyz (cm)	Massa indivíduo (mg)
R1	Controle	-0,51	0,87	6,18	8,11	10,4	67,4
	F/2	1,02	0,97	5,94	7,62	10,14	62,9
	F	-0,27	1,41	6,11	7,75	10,16	50,7
	2F	2,01	2,72	6,4	8,45	10,97	47
R2	Controle	-0,55	1,75	5,67	8,81	10,80	51,7
	F/2	-0,59	1,73	5,09	7,73	9,55	59,1
	F	-2,13	1,84	4,12	6,97	8,64	35,1
	2F	1,82	2,69	4,02	7,53	8,89	34,1

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

A análise estatística utilizando a variável dependente profundidade mostrou haver diferenças nas réplicas ($F = 41,02$; $p = 3,456.10^{-10}$), nos tratamentos ($F = 5,52$; $p = 0,015$) e na interação réplica x tratamento ($F = 4,16$; $p = 0,0063$), ou seja, o efeito da

réplica sobre a profundidade depende do tratamento utilizado e vice-versa. Pode-se verificar tal diferença na Tabela 2, onde na réplica 1, o tratamento com maior média de profundidade é o 2F. Já para a réplica 2, o tratamento com maior média de profundidade é o controle. Ou seja, dependendo da réplica observada, a variação na média de profundidade nos diferentes tratamentos é distinta.

As réplicas apresentaram diferenças na distribuição das pupas nos diferentes tratamentos, mas deve se levar em conta o número de pupas encontradas, pois a substância presente na arena é um inseticida, o qual é utilizado no controle de diversas pragas agrícolas (AGROFIT, 2006). Assim, pode-se observar na Tabela 3 uma proporção entre número de pupas encontradas em relação à dose de Fipronil, ou seja, quanto maior a dose do inseticida, menor o número de pupas encontradas, e conseqüentemente, maior o número de larvas mortas. Desta forma, menor é a amostragem para cálculo da média de profundidade, o que pode levar a valores mais variáveis da média calculada devido à baixa amostragem. Desta forma, este número de pupas encontradas atua no cálculo da média de profundidade, podendo causar diferenças no padrão de dispersão nas réplicas nos diferentes tratamentos.

TABELA 3. Porcentagem de larvas mortas, adultos emergentes (machos e fêmeas) em relação a 100 larvas inicialmente em dispersão larval pós-alimentar.

		Porcentagem das 100 larvas colocadas nas arenas para dispersão				
	Tratamento	Larvas mortas	Adultos emergentes	Machos	Fêmeas	Pupas encontradas
R1	Controle	1,00	81,72	34,41	47,31	93,00
	F/2	20,00	31,51	21,92	9,59	73,00
	F	25,00	20,29	14,49	5,80	69,00
	2F	56,00	11,41	5,71	5,71	35,00
R2	Controle	0,00	83,51	44,33	39,18	97,00
	F/2	16,00	32,89	18,42	14,47	76,00
	F	39,00	33,33	20,83	12,50	48,00
	2F	67,00	25,00	15,63	9,38	24,00

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Já quando se analisa a variável distância as réplicas não apresentaram diferenças ($F = 0,5270$; $p = 0,4681$) e nem interação réplica x tratamento ($F = 1,8075$; $p = 0,1448$), mas houve diferença nos tratamentos ($F = 3,3750$; $p = 0,0182$), utilizando intervalo de confiança de 5%. Ou seja, a presença de Fipronil modificou a distância do centro de dispersão percorrida pelas larvas (horizontalmente), no entanto, de uma forma bastante

variável dependendo do tratamento observado. Entretanto apenas ocorreu diferença entre o controle e o tratamento F, não possuindo evidências para diferenciar os outros tratamentos. Interessante também salientar que a réplica não tem influência na distância, diferentemente do observado em relação à profundidade.

A análise de correlação entre distância e profundidade nos diferentes tratamentos mostrou haver apenas correlação no tratamento F ($r = 0,1836$; $p = 0,0475$; $r^2 = 0,037$), sendo que todos os demais não apresentaram correlação, ou seja, em F, quanto maior a profundidade, maior a distância. Assim as larvas, em contato com dose F, que se aprofundaram mais se distanciaram mais do centro de dispersão.

Da mesma forma, como discutido para profundidade, o número de indivíduos obtidos em cada arena tem influência no cálculo da média desta variável; desta forma, o cálculo da média destas variáveis sofre influência do tamanho da amostra de pupas obtida. Uma variável que pode influenciar a distribuição e padrão de dispersão larval é a massa destes indivíduos, como observado e discutido na revisão feita por GOMES *et al.* (2006), em que foram relatadas correlações entre massa, distância e profundidade em *C. megacephala* e *C. albiceps* em diferentes condições experimentais.

A análise da massa das pupas mostrou que todas as interações são diferentes: réplicas ($F = 253,30$; $p = 1,6734 \cdot 10^{-46}$), tratamentos ($F = 76,8268$; $p = 6,1581 \cdot 10^{-41}$) e a interação réplica x tratamento ($F = 18,09$; $p = 3,6150 \cdot 10^{-11}$), ou seja, o efeito da réplica na massa depende do tratamento observado. Pode-se observar na tabela 2 que o efeito da réplica é mais evidente que o efeito da interação, pois a réplica R1 tem maiores massas que a réplica R2 nos diferentes tratamentos, no entanto em ambas a média de massa diminui quanto maior a dose de Fipronil. Sendo que a R2 apresentou menores massas no decorrer das doses (Tabela 2), assim como o número de larvas mortas encontradas em R2 foi maior que em R1 (Tabela 3), quando se analisa os tratamentos F e 2F, assim R2 pareceu ser mais sensível que R1 ao inseticida utilizado.

A massa das pupas assim como a dispersão das mesmas (profundidade e distância) podem terem sido afetadas pela alteração na atividade dinâmica e metabólica que o Fipronil pode causar nos insetos. Sabe-se que o mesmo hiperexcita o sistema nervoso destes animais, por meio da interrupção dos canais de sódio do sistema GABAérgico, responsável este pela inibição de impulsos neurais (KIDD & JAMES, 1991). Assim, o impulso neural acaba sendo hiperativado o que causa a morte do inseto.

No entanto, poderia anteriormente causar um aumento na movimentação das larvas tolerantes a certa dosagem deste inseticida presente no substrato (com uma profundidade maior alcançada ou distância maior percorrida), o que causaria uma redução da massa pela alta atividade metabólica destes indivíduos, dados estes que podem ser observado na Tabela 2. Observando as réplicas, em R2 o aumento da distância em relação à dose não foi observado; no entanto, o número de pupas encontradas foi menor que o obtido na réplica 1 (Tabela 3). Provavelmente, a população de indivíduos utilizados em R2 foi mais sensível à ação do inseticida *a priori*, que quando comparado a R1 a qual foi mais sensível *a posteriori*, pois apresentou um menor número de adultos emergentes que o obtido em R2 (Tabela 3).

Pode-se observar que as diferentes doses de Fipronil causaram mudanças em todas as variáveis obtidas e atuando na totalidade de sobrevivência das pupas e larvas presentes nos diferentes tratamentos. A profundidade e a massa foram as variáveis que tiveram maior influência dos tratamentos; já a distância não apresentou diferença nos tratamentos apenas entre o controle e F. A presença do inseticida diminuiu a massa das pupas encontradas, alterou a profundidade e distância em alguns tratamentos aumentando-as ou diminuindo-as, devido à sensibilidade das larvas à dose utilizada nas réplicas e o efeito imediato ou posterior da substância sobre o indivíduo.

Na Figura 2, pode-se visualizar a variação na distribuição e número de indivíduos nos diferentes tratamentos e réplicas, por meio de curvas de níveis, as quais representam a densidade de indivíduos dispersos e encontrados nas arenas.

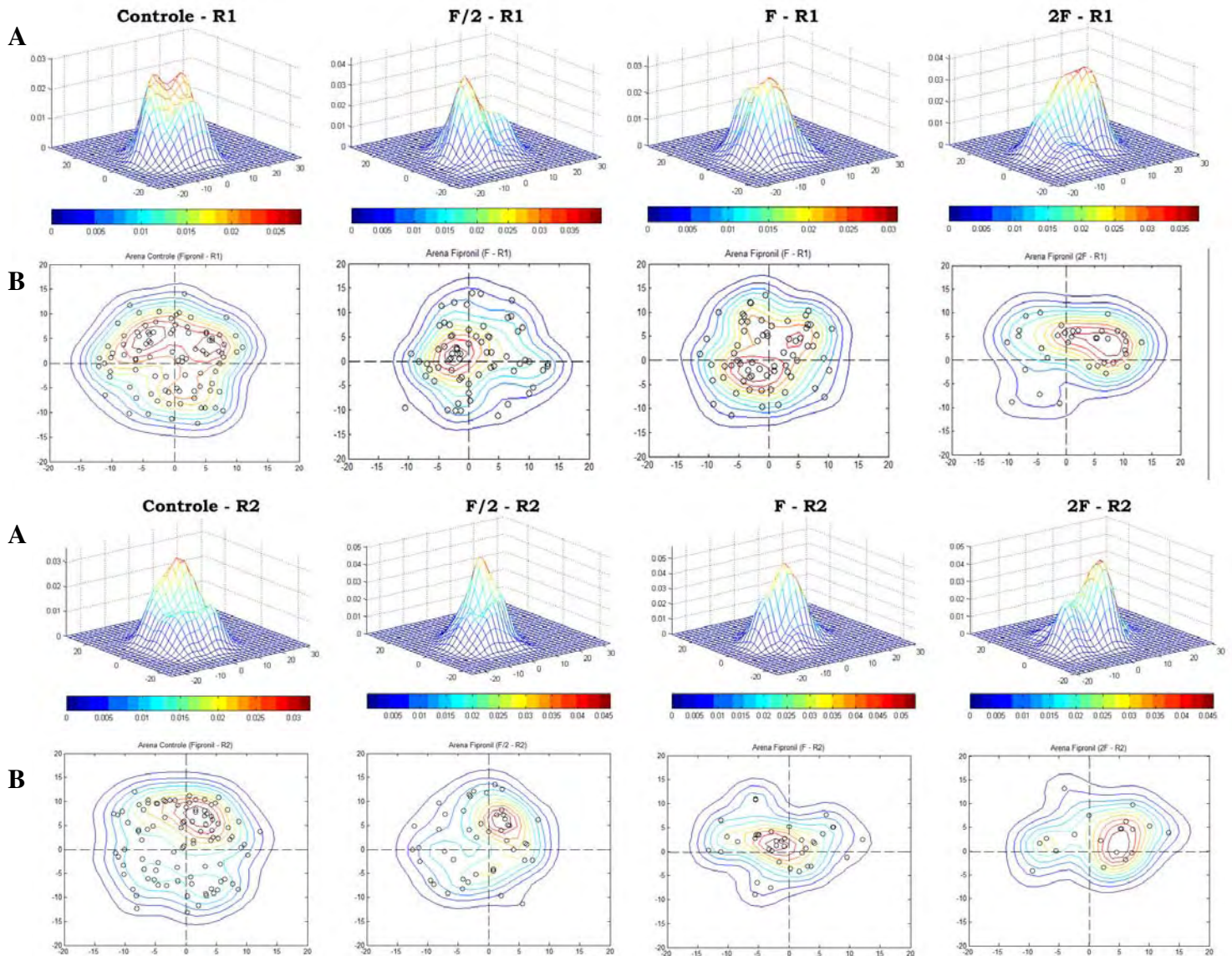


FIGURA 2. Gráficos de Distribuição/densidade (curvas de níveis e tonalidades de cor representando a densidade de indivíduos encontrados em diferentes porções da arena) e Dispersão x,y das pupas nas arenas tratadas com Fipronil. A - Análise em 3 dimensões da distribuição, B - Análise da base. R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

O padrão de dispersão dos indivíduos pode ser mais bem visualizado na Figura 2, onde a distribuição e a densidade dos tratamentos controle nas réplicas apresentaram maior área de distribuição (bases mais largas) e uma menor variação na densidade por área (picos menos pronunciados), comparados aos tratamentos com presença do inseticida. No entanto, o número de pupas encontradas é visivelmente diferente entre os tratamentos, diminuindo na medida em que se aumentam as doses de Fipronil, desta

forma causando diferenças na densidade de indivíduos distribuídos nas arenas, como pode ser observado na Figura 2.

Assim, para uma melhor interpretação dos dados obtidos, compreensão do comportamento de dispersão larval, escolha do sítio de pupação e efeito do Fipronil no padrão de dispersão larval pós alimentar de *C. megacephala*, procurou-se analisar os diferentes tratamentos separando os indivíduos mortos dos sobreviventes nas diferentes doses do inseticida (larvas e pupas), procurando relacionar os diferentes setores da arena com a escolha do sítio de pupação e emergência ou não de adultos das pupas.

Observando as Figuras 4, 5, 6 e 7 e as Tabelas 6 e 7, pode-se avaliar a preferência na distribuição das pupas encontradas e a porcentagem de sobrevivência (emergência dos adultos) nas diferentes porções das arenas, avaliadas por meio de dados de profundidade e distância.

Pode-se observar que poucas pupas foram encontradas em pequenas profundidades e distâncias, sendo que o intervalo de maior preferência para pupação no tratamento controle foi entre 4 e 8 cm de profundidade e principalmente entre 6-8 cm e de distância de 6-12 cm, principalmente de 6-9 cm (Figuras 5 e 7). Já nos tratamentos com o inseticida, pode-se observar uma variação neste padrão de escolha do sítio de pupação. Dependendo o tratamento (Figuras 5 e 7), há uma maior quantidade de pupas nas porções mais superficiais, mas também se pode observar uma maior quantidade nas porções mais profundas e distantes em relação ao controle, tal variação sendo talvez causada efeito desta substância na fisiologia - comportamento e metabolismo desta espécie.

Na análise da sobrevivência, fica bem claro o efeito do inseticida em todas as porções da arena, causando a morte de pupas quanto maior a dose utilizada (Tabela 3 e Figuras 4 e 6).

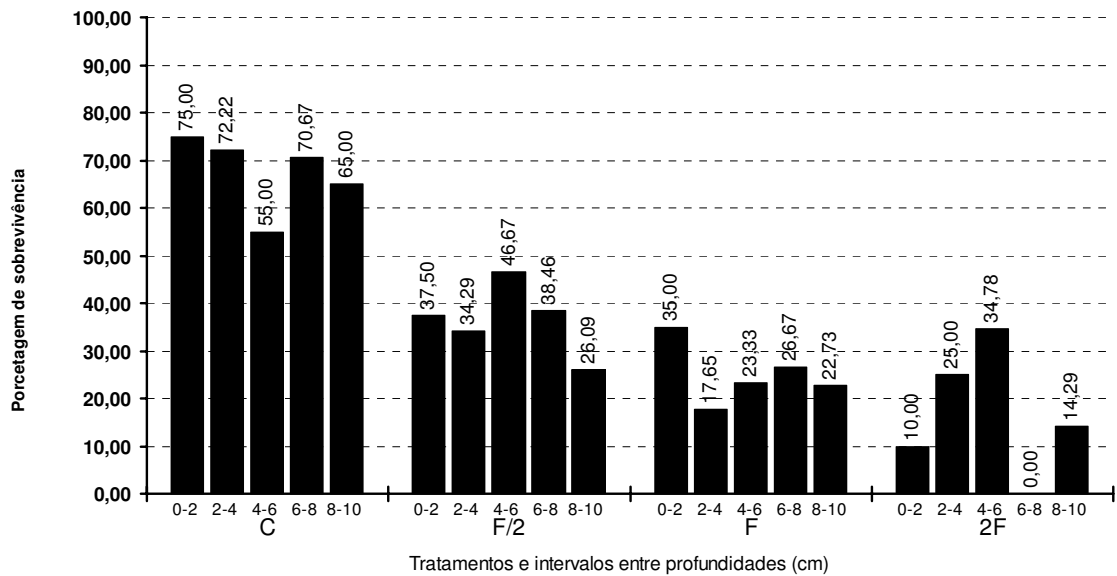


FIGURA 4. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de profundidades (cm). C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

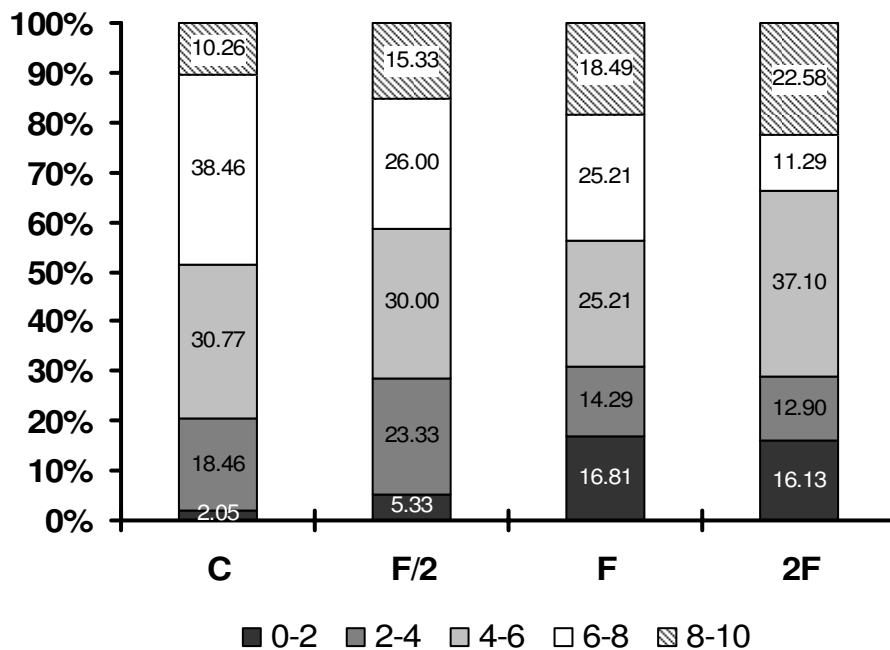


FIGURA 5. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de profundidade (cm) nos diferentes tratamentos. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

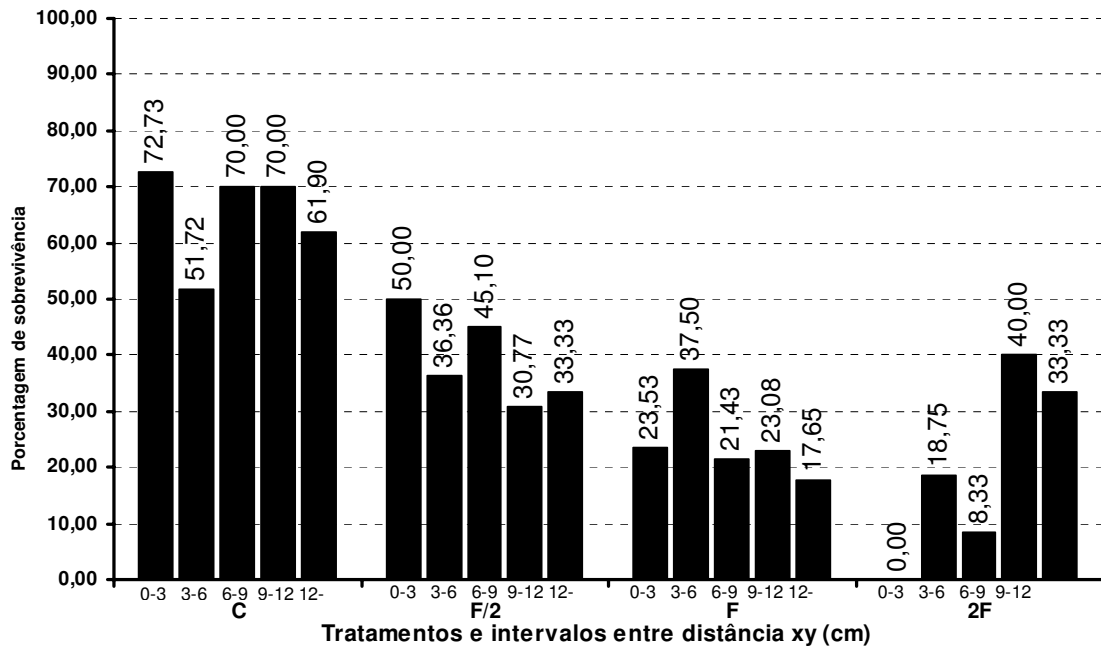


FIGURA 6. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de distância xy (cm). C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

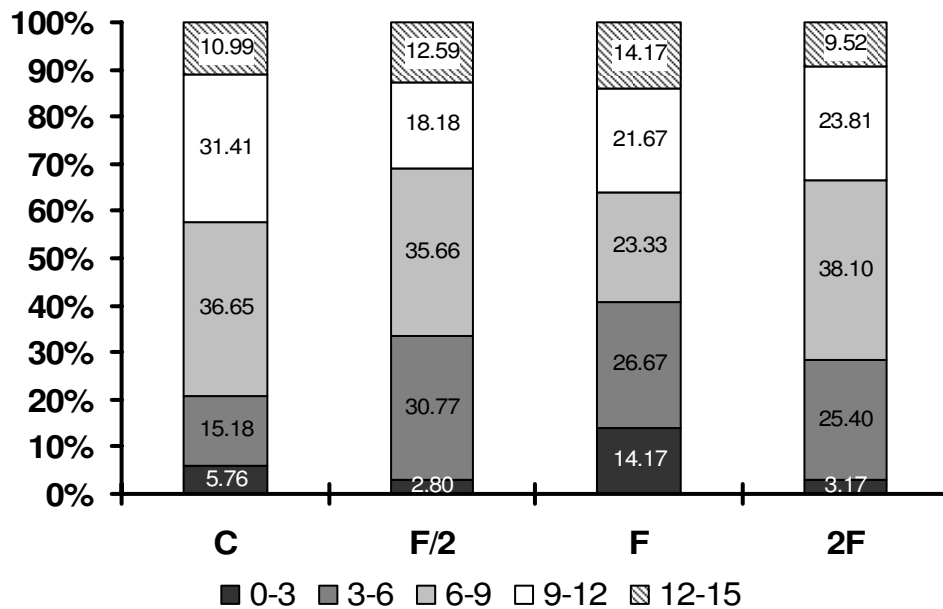


FIGURA 7. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de distância xy (cm) nos diferentes tratamentos. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Pode-se observar na análise da profundidade, que no tratamento controle, a menor porcentagem de sobrevivência é encontrada no intervalo de 4 – 6 cm, onde em aproximadamente 55% das pupas encontradas não houve emergência do adulto. Diferentemente do observado nas arenas tratadas com Fipronil, em que a maior porcentagem de sobrevivência em F/2 e 2F foi neste intervalo de profundidade 4 – 6 cm. Já na arena F, a maior porcentagem foi no intervalo de 0 – 2 cm, sendo que em 4 – 6 cm ocorreu a segunda porção da arena com maior sobrevivência. A preferência pela escolha do sítio de pupação pode ser influenciada por diversos fatores como: o substrato de pupação, da massa dos indivíduos, até mesmo influência de fatores presentes no meio de dispersão, como umidade, temperatura, as quais poderiam atuar sobre a escolha das larvas por meio do preferência sensorial.

Pode se observar também, analisando as Figuras 5 e 6, que a maior porcentagem de sobrevivência foi obtida no controle, o qual estava sem a presença do inseticida, no intervalo de profundidade de 0-2 (75%); no entanto, a porcentagem de preferência por este setor, ou seja, de pupas encontradas foi de 2,05% do total de pupas encontradas na arena C (Figura 6). A porcentagem de pupas encontradas no setor 0-2cm nos tratamentos com Fipronil foi maior que a encontrada no tratamento controle, provavelmente pelos efeitos do inseticida presente na areia, que causou mudanças comportamentais e mortes de alguns indivíduos, os quais não conseguiram se aprofundar muito no substrato. Importante ressaltar também o número de pupas encontradas nos diferentes tratamentos (Tabela 3), a qual mostra uma relação inversamente proporcional entre dose de Fipronil e número de pupas nas arenas.

As Tabelas 4 e 5 mostram a média das variáveis observadas nos diferentes tratamentos em relação à emergência ou não de adultos. Pôde-se observar variações nas médias das variáveis entre os tratamentos (Tabelas 4 e 5), e entre o grupo de adultos emergentes (Tabela 4) e não emergentes (Tabela 5) em relação as variáveis observadas, dados estes já discutidos anteriormente.

TABELA 4. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que houve emergência do adulto de *C. megacephala*, no diferentes tratamentos e substratos alimentares.

Tratamento	Média (dp) das pupas em que houve emergência de adultos Desvio padrão entre parênteses.		
	Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)

Dieta artificial	C	5.88 ± 2.05	8.46 ± 2.92	54.05 ± 7.72
	F/2	5.16 ± 2.02	7.41 ± 3.20	46.46 ± 8.89
	F	5.31 ± 2.92	7.00 ± 3.34	40.38 ± 11.47
	2F	5.31 ± 2.64	9.77 ± 3.25	34.45 ± 8.60

C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

TABELA 5. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que não houve emergência do adulto de *C. megacephala*, no diferentes tratamentos e substratos alimentares.

	Tratamento	Média das pupas em que não houve emergência de adultos		
		Desvio padrão entre parênteses.		
Dieta artificial	C	Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)
	F/2	5.99 ± 1.97	8.48 ± 3.02	53.77 ± 6.97
	F	5.73 ± 2.36	7.83 ± 3.26	49.89 ± 9.99
	2F	5.29 ± 2.65	7.56 ± 3.47	45.64 ± 10.99
		5.46 ± 3.01	7.69 ± 2.68	41.58 ± 10.72

C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Assim, o comportamento de dispersão larval pós alimentar e, conseqüentemente, a preferência de escolha do sítio de pupação, variaram nos diferentes tratamentos, como já tinha sido observado na Figura 2.

À medida que se aumenta a concentração de Fipronil na arena, maior é a quantidade de pupas entre 8 e 10 cm de profundidade nas arenas com inseticida (Figura 5), muitas larvas provavelmente acabaram morrendo tão logo entraram em contato com o inseticida. Outras, na tentativa de procurar um sítio de pupação mais profundo, sem a presença do Fipronil se enterraram mais. No entanto, devido ao contato, anteriormente, das larvas com esta substância na superfície, a mesma pode ter causado a morte destes indivíduos ou mudanças metabólicas nos mesmos, tendo em vista, que o Fipronil hiperexcita o sistema nervoso destes animais, por meio da interrupção dos canais de sódio do sistema GABAérgico, responsável este pela inibição de impulsos neurais.

Assim, o impulso neural acaba sendo hiperativado o que pode causar a morte do inseto em diferentes estágios do desenvolvimento, dependendo da sensibilidade do mesmo ao inseticida. Assim, poderia inicialmente causar um aumento na movimentação das larvas presentes no substrato (com uma distância e profundidade maior percorridas), larvas estas tolerantes a certa dosagem deste inseticida, e conseqüentemente um aumento no metabolismo das mesmas, o que causaria uma redução da massa pela alta atividade metabólica destes indivíduos, dados confirmados nas Tabelas 2, 6 e 7.

No entanto, a sobrevivência destes indivíduos é inversamente proporcional à concentração do inseticida nesta profundidade (8-10 cm), ou seja, apesar deles permanecerem mais distantes da superfície, a porcentagem de mortos foi maior. Talvez, tal resultado possa ser explicado pelo efeito do inseticida não ter sido imediato nestas doses, não causando a morte das mesmas na superfície, assim, as larvas percebendo a presença desta substância na superfície da arena, procuraram maiores profundidades para pupação, sendo que as mais sensíveis morreriam neste trajeto como observado na Tabela 5, quanto maior a dosagem maior a profundidade média das larvas mortas encontradas. No entanto as que não eram tão sensíveis a droga acabaram morrendo na forma de pupa nas maiores profundidades, devido provavelmente a dispersão tardia da droga em regiões mais profundas da arena. Assim o indivíduo sofria o efeito da droga quando já havia se transformado em pupa.

TABELA 5. Média da distribuição das larvas encontradas mortas nas arenas com Fipronil

	média	x	y	profundidade (cm)	distância (cm)	distância xyz (cm)
R1	F/2	-2,99	-0,91	0,50	7,25	7,28
	F	-0,38	0,49	1,68	4,08	4,36
	2F	0,07	-0,18	2,86	7,17	7,77
R2	F/2	-2,42	2,10	0,73	7,38	7,44
	F	0,85	0,14	1,86	3,82	4,25
	2F	0,57	0,42	2,95	6,68	7,33

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Já quando se analisa a distância em relação à sobrevivência e distribuição nas arenas, parece não haver um padrão tão diferenciado em relação aos tratamentos, como observado na análise da profundidade. Tal diferença observada na profundidade deve ter relação ao modo como foi aplicado o inseticida, ou seja, na superfície; assim, a variável profundidade sofreria maiores diversidades e prováveis gradientes de disposição do Fipronil de acordo com a profundidade, atuando assim no padrão de escolha e mortalidade da espécie nos diferentes tratamentos. Já a variável distância não seria tão influenciada como a profundidade, em relação à disposição do inseticida, uma vez que a superfície da arena recebeu de forma homogênea a concentração de Fipronil. Assim, a profundidade parece ter sido a melhor variável para observação dos efeitos do inseticida.

A dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* nas arenas com Fipronil nos diferentes tratamentos sofreu alteração comparando-se ao controle, as larvas escolheram seu sítio de pupação mais profundamente, devido provavelmente à disposição do inseticida e sua forma de aplicação na superfície.

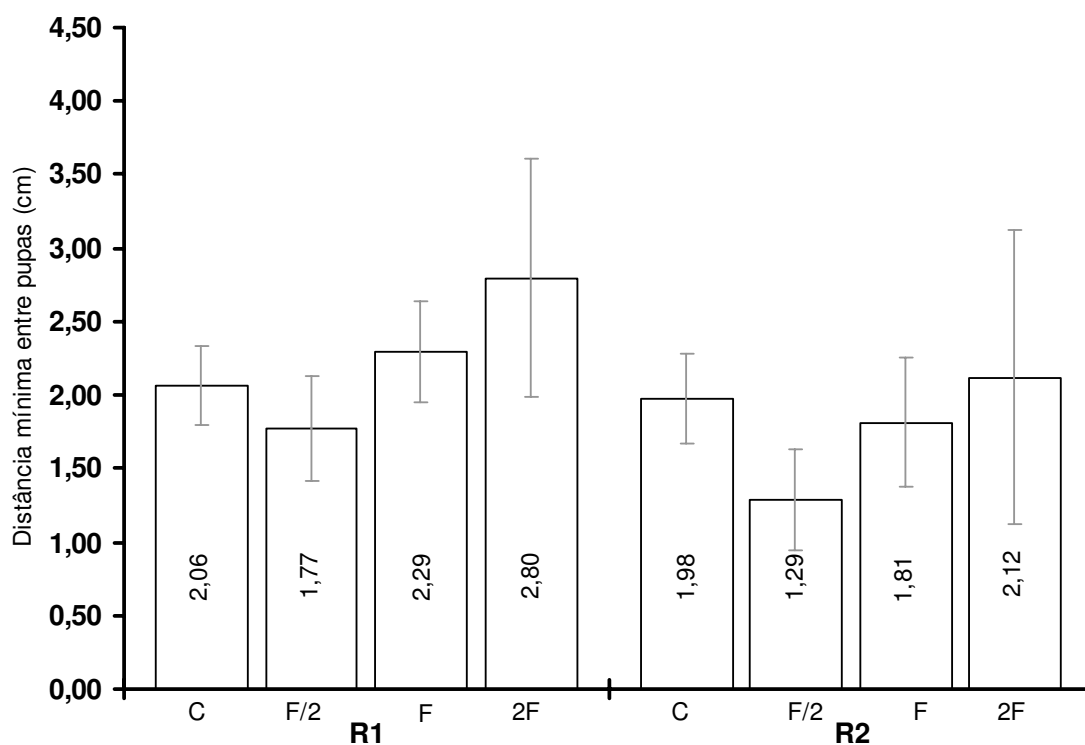
BOLDRINI *et al.* (1997) analisaram a dispersão larval pós-alimentar de moscas varejeiras por meio de modelos matemáticos e observaram que o efeito da vizinhança influencia a escolha do local de pupação, principalmente de *C. megacephala* e *C. putoria*. Desta forma, a escolha do sítio de pupação tem influência da localização de pupas próximas; no entanto, as presenças de substâncias químicas em contato com as larvas poderiam influenciar a percepção da vizinhança e assim modificar a distância entre pupas vizinhas, devido principalmente ao efeito destas substâncias na fisiologia e comportamento destas larvas e na percepção sensorial do meio. Com isto, foram obtidos valores para cada arena de dispersão, da média da distância entre as pupas e da média da distância mínima entre pupas para avaliação de prováveis mudanças na escolha do sítio de pupação e do efeito da vizinhança pelas interações não locais entre as larvas.

A Figura 8 mostra a média e variância entre a mínima distância nos diferentes tratamentos e a Tabela 6 a média da distância entre pupas e a média da distância mínima entre pupas e a respectivos valores de variância. No entanto, tal dado pode ser erroneamente analisado, pois os tratamentos se diferenciaram em relação a número de pupas encontradas, assim quanto menos dados de distribuição são obtidos, maior poderia ser a distância e distância mínima entre pupas. Observando a Tabela 3, pode-se constatar que quanto maior a dose de Fipronil, menor o número de pupas encontradas. Entretanto, o tratamento F/2 nas duas réplicas feitas mostrou uma distância mínima entre pupas menor que a obtida no controle, mesmo a mortalidade tendo sido maior em F/2 comparado ao controle. As larvas em contato com a dose F/2 atingiram menores profundidades e distâncias em comparação ao controle, o que possibilitou apresentar menor média de distância mínima. Esta variação no padrão de dispersão provavelmente foi causada pelo efeito do inseticida na percepção sensorial dos indivíduos e no comportamento e movimentação larval durante a dispersão, tendo em vista que apesar do inseticida estar presente no substrato sua concentração permitia a dispersão larval, não sendo observada grande quantidade de larvas mortas neste tratamento (F/2).

TABELA 6. Média e variância da distância entre pupas e da distância mínima entre pupas.

		Média da Distância entre pupas	Variância	Média das Distância mínimas entre as pupas	Variância
R1	C	11.44	24.49	2.06	0.27
	F/2	11.16	25.88	1.77	0.36
	F	11.11	23.41	2.29	0.34
	2F	11.08	27.62	2.80	0.81
R2	C	12.11	29.36	1.98	0.31
	F/3	10.72	24.58	1.29	0.34
	F	10.45	20.73	1.81	0.44
	2F	10.52	23.13	2.12	1.01

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

**FIGURA 8.** Gráfico mostrando a média e a variância da mínima distância entre pupas nas arenas em diferentes tratamentos (C, F/2, F e 2F). R1 e R2 – Réplicas. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Os tratamentos se diferenciaram entre si nas réplicas, quando se compara a distância mínima entre as pupas (R1: $F = 6,1385$; $p = 0,0008$ – diferenças entre 2F e todos os tratamentos e entre F/2 e F) (R2: $F = 3,6396$; $p = 0,0134$ – diferenças entre F/2 e todos os outros tratamentos).

Pela análise dos dados de distância mínima (Tabela 6) e de número de pupas encontradas em cada tratamento (Tabela 3), era de se esperar que nos tratamentos com menor número de pupas encontradas, as mesmas apresentassem uma distância mínima entre elas maior, já que a arena apresentaria menor densidade por área total. Desta forma as médias crescentes de distâncias mínimas calculadas deveriam ser as seguintes: tratamento C, F/2, F e 2F (Tabela 3), no entanto observando a Figura 8, e a Tabela 6, pode-se perceber que os dados de F/2 foram menores que o controle nas duas réplicas realizadas. No entanto, em R1 o tratamento F/2 não se diferenciou do controle, apenas 2F se diferenciou de todos os tratamentos, inclusive o controle, em R1. A explicação para este fato pode ser atribuída ao efeito do Fipronil na metabolismo e efeito da vizinhança na escolha do sítio de pupação pelas larvas (BOLDRINI *et al.*; 1997), ou seja, quanto menos pupas ou larvas presentes nas arenas, menor o efeito da vizinhança na escolha do sítio, menor assim a distância (profundidade e distância) percorrida pelas larvas o que pode ser confirmado pela Tabela 2, onde o tratamento F/2 se diferencia do controle nas duas réplicas realizadas.

Mas foi observado nos tratamentos em que o Fipronil estava presente, pupas encontradas juntas, em grupos, de 2 a 6 indivíduos, principalmente no tratamento F/2, sendo que tal dado não foi observado no tratamento controle. O tratamento F/2 não apresentou grande mortalidade comparado aos tratamentos F e 2F, podendo, desta forma com o efeito do inseticida, as larvas terem sido mais afetadas no comportamento e percepção sensorial do meio. Assim, o efeito do Fipronil pode acarretar padrões de distribuição e dispersão diferentes aos observados no controle.

O cálculo da média da distância mínima entre pupas nestes tratamentos com Fipronil foi alterado, e assim menor ao observado no controle, por causa deste agrupamento de pupas, o que gera distâncias nulas entre elas, diminuindo assim o valor da média. No entanto, em F e 2F, devido à grande mortalidade de indivíduos e menor quantidade de grupos de pupas encontrados, a distância acabou sendo maior que o controle principalmente, quando se observa a R1.

Conclusões

Pode-se constatar que todas as variáveis observadas nos tratamentos com Fipronil sofreram alteração, diferindo do padrão de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* no tratamento controle. As larvas em contato com o inseticida apresentaram uma grande mortalidade, na medida em que se aumentava a dose do Fipronil nos diferentes tratamentos. O Tratamento F/2 pareceu ser o que melhor mostrou os efeitos do Fipronil no comportamento larval, devido à sobrevivência de maior número de indivíduos comparado aos tratamentos F e 2F. De acordo com os resultados observados nas variáveis profundidade, distância e massa, o inseticida provavelmente causou mudanças fisiológicas e consequentemente comportamentais nas larvas em contato com o Fipronil, atuando assim no metabolismo (aumento metabólico – redução na massa e alteração da distância percorrida nos tratamentos) e percepção sensorial do meio na escolha de um sítio de pupação (efeito da vizinhança e distância mínima entre pupas).

Referências Bibliográficas

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitosanitários, **Consulta de Produtos Formulados**, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/!ap_produto_form_detalle_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5197&p_tipo_janela=NEW>.
Acesso em: 03 jul 2006.
- BASSANEZI, R. C., LEITE, M. B. F., GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, C. J., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F.. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Mem. Inst. O. Cruz**, 92(2): 281-286, 1997.
- BECKEL, H., LORINI, I. & LAZZARI, S. M. N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revta. Bras. Entomol.**, 48(1): 115-118, 2004.
- BOBE, A., COOPER, J., COSTE, C.M., & MARIE-ANNE MULLER. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. **Pestic. Sci.** 52, 275-281, 1998.
- BOBE, A., COSTE, C.M., & J. COOPER. Factors Influencing the Adsorption of Fipronil on Soils. **J. Agric. Food Chem.** 45, 4861-4865, 1997.

- BOLDRINI J. L., BASSANEZI, R. C., MORETTI, A.C., VON ZUBEN, C. J. GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **J. Theor. Biol.**, 185: 523-531, 1997.
- CASIDA, J. E. & QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present and future? **Ann. Rev. Entomol.**, 43: 1-16, 1998.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T; SUNGVORNYOTHIN, S; RATANATHAM, S; PRABARIPAI A Insecticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. **J. Am. Mosquito Control**: 17 (1): 13-22, 2001.
- DESNEUX, N., RAFALIMANANA, H. & KAISER, L. Dose–response relationship in lethal and behavioural effects of different insecticides on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. **Chemosphere**, 54: 619–627, 2004.
- DUHAM, E. W., SCHARF, M. E. & SIEGFRIED, B. D.. Toxicity and Neurophysiological Effects of Fipronil and Its Oxidative Sulfone Metabolite on European Corn Borer Larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Pest. Biochem. Physiol.**, 71: 97–106, 2001.
- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA , G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.
- GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G. P., SAITO, T. (eds), **Pest resistance to pesticides**. Plenum, New York, p. 769-792, 1983.
- GODOY, W. A.C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L., RIBEIRO, O. B. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **J. Appl. Entomol.**, 119: 263-266, 1995.
- GODOY, W. A.C., REIS S. F., VON ZUBEN, C. J. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. **J. Appl. Entomol.**, 120(4): 423-426, 1996.

- GOMES, L.; SANCHES, M. R. & VON ZUBEN, C. J. Dispersal and Burial Behavior in Larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). **J. Insect Behavior**, 18(2): 281-292, 2005.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & GOVONE, J. S. Comportamento de dispersão larval radial pós alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. **Entomol. Vect.**, 9: 115-132, 2002.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.** 83: 1210-1214, 1990.
- GRENN, A. A. The controlo f blowflies infesting slaughter-houses. I. Field observations of habits of blowflies. **Ann. Appl. Biol.**, 38: 475, 1951.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., BURALLI, G.M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 23 (4): 245-255, 1979.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol**, 12: 257-266, 1987.
- HAYNES, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol**, 33: 149-168, 1988.
- KAMAL, A. S., Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) I. Bionomics. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 51: 261-271, 1958.
- KIDD, H., & D. JAMES, **The Agrochemicals Handbook**, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.

- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- LOMINICKI, A. **Population ecology of individuals**. Princeton: Princeton Press, 233 p., 1988.
- LUND, A. E. Insecticides: effects on the nervous system. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**, Pergamon Press, New York, vol. 12, p. 9-56, 1985.
- MATHENGE, EM; GIMNIG, JE; KOLCZAK, M; OMBOK M, IRUNGU LW, HAWLEY WA. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **J. Med. Entomol.**, 38 (4): 531-536, 2001.
- MATSUMURA, F.. **Toxicology of insecticides**. Plenum Press, New York, 598p., 1985.
- NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Volume 2: Physical Trauma. Tedeschi, C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.
- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. In: **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.
- PESCHKE, K.; KRAPF, D. & FULDNER, D. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. **Zool. Jb. Syst.**, 114: 241-265, 1987.
- PUTMAN, R. J. Dynamics of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, within carrion. **J. Anim. Ecol.**, 46: 853-866, 1977.
- REIS, S.F.; G. STANGENHAUS, W.A.C. GODOY, C.J. VON ZUBEN & O.B. RIBEIRO. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.**, 38: 33-34, 1994.
- ROBERTS, DR; ALECRIM, WD; HSHIEH, P; GRIECO JP, BANGS M, ANDRE RG, CHAREONVIRIPHAP T A probability model of vector behavior: Effects of DDT repellency, irritancy, and toxicity in malaria control. **J. Vector. Ecol.**, 25 (1): 48-61, 2000.

- SUNGVORNYOTHIN, S; CHAREONVIRIYAPHAP, T; PRABARIPAI, A; THIRAKHUPT V, RATANATHAM S, BANGS MJ. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambda-cyhalothrin. **J. Vector Ecol.**, 26 (2): 202-215, 2001.
- TEWS, J., MOLONEY, K. & JELTSCH, F. Modeling seed dispersal in a variable environment: a case study of the fleshy-fruited savanna shrub *Grewia flava*. **Ecol. Model.**, 175: 65–76, 2004.
- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 234 B: 77-174, 1950.
- UNIVERSITY OF MINNESOTA, Radcliffe.s Integrated Pest, Management. <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>, Acesso em: 10 jan 2006.
- VON KEYSERLINGK, H. C.. The significance of behaviour studies in insecticide research. **Pestic. Sci.** 16: 558-559, 1985.
- VON ZUBEN, C. J. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 4: 525-533. 1998.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WARE, G. W. **The pesticide book**. Thompson Publication, Fresno, 340p, 1989.
- WORTON, B.J. Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies, **Ecology**, 70(1):164-168, 1989.
- ZDÁREK, J. VERLEYEN, P. MARES, M. DELECKOVÁ, L. & NACHMAN R.. Comparison of effects of pyrokinins and related peptides indentified from arthropods on pupariation behaviour in flesh fly (*Sarcophaga bullata*) larvae (Diptera: Sarcophagidae). **J. Ins. Physiol.**, 50: 233-239, 2004.
- ZIV, Y. The effect of habitat heterogeneity on species diversity patterns: a community-level approach using an object-oriented landscape simulation model (SHALOM). **Ecological Modelling**, 111: 135–170, 1998.
- ZUMPT, F.. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, p. 267, 1965.

CAPÍTULO 7

Efeito do Fipronil na dispersão pós-alimentar larval de *Musca domestica* (L.) (Diptera: Muscidae)

Resumo

Musca domestica é uma espécie altamente sinantrópica e onívora, existindo uma preocupação crescente de populações urbanas com a proliferação desta espécie nos últimos anos, principalmente próximo a locais com substratos adequados para a procriação e proliferação das mesmas. Diversas formas de controle têm sido utilizadas para esta espécie, principalmente com o uso de inseticidas. Este muscídeo tem importância médica, veterinária e forense. As larvas de *M. domestica*, após a exaustão dos recursos alimentares, abandonam o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação, processo chamado de dispersão larval pós-alimentar. No entanto, este substrato de pupação pode estar contaminado com substância química, a qual pode alterar o comportamento de dispersão larval. Assim, foi utilizado Fipronil (inseticida - Regent 800 WG) no substrato de pupação, para avaliar o efeito no comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica*, pois esta substância pode interferir nos processos neurológicos, inibindo ou hiperativando os neuro-transmissores, podendo causar mudanças fisiológicas (no desenvolvimento e no comportamento), as quais têm importância na estimativa do IPM (intervalo pós-morte - ciência forense). A dispersão pós-alimentar larval foi realizada em quatro arenas circulares (Controle, dose utilizada para controle de diversas pragas agrícolas - $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^2$, metade da dose de controle e o dobro da dose de controle - com réplicas) preenchidas com areia, com diâmetro de 30 cm e profundidade 10 cm. O Fipronil foi aplicado (spray) no substrato de dispersão (areia), na superfície da arena na dose de $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mg/cm}^2$. As larvas ao atingirem o 3º instar, foram soltas no centro das arenas (100 larvas liberadas em cada tratamento), e posteriormente, após a formação das pupas, os dados referentes à profundidade e ao posicionamento de cada pupa na arena foram analisados. Foi observado nos tratamentos

com Fipronil, que a profundidade de enterramento e a distância das pupas do centro de irradiação foram alteradas, de forma diferente nos diferentes tratamentos, quando comparadas ao tratamento controle, sendo que dependendo da réplica e do tratamento, a dispersão larval foi maior ou menor. As maiores dose de Fipronil causaram maiores mortalidades de larvas e pupas. O tratamento F/2 foi o que mais se diferenciou dos outros tratamentos, juntamente com o controle. Tais variações na dispersão foram provavelmente causadas por mudanças sensoriais e motoras em virtude da droga utilizada.

Introdução

Musca domestica é uma espécie pertencente a família Muscidae (Diptera), sendo altamente sinantrópica e onívora, o que favorece a sua dispersão e distribuição pelos continentes (CARVALHO, 2002; MARICONI *et al.*, 1999), assim estando bastante presente no ambiente humano (GREENBERG, 1971). Várias espécies pertencentes à família Muscidae são de grande importância agrícola, pois são consideradas pragas de plantações, atacando produtos agrícolas de importância econômica (CARVALHO, 2002).

Em relação à *M. domestica*, existe uma preocupação crescente de populações urbanas nos últimos anos, principalmente próximas a locais que propiciem a proliferação destas moscas, como culturas de cana de açúcar, devido à utilização de práticas agrícolas, as quais criam um ambiente propício à criação de moscas, como é o caso da vinhaça (BURALLI & GUIMARÃES, 1985), e devido também ao manejo inadequado de esterco, especialmente em aviários, e de lixo (MARCONDES, 2001).

Desta forma, tentativas de controle destas moscas vêm sendo propostas, principalmente utilizando-se inseticidas, tendo como principal alvo de ação, o sistema nervoso, devido à alta eficácia e rápida resposta que proporcionam no controle de pragas (CASIDA & QUISTAD, 1998; LUND, 1985; MATSUMURA, 1985; WARE, 1989).

Moscas utilizam-se de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos pelas fêmeas e para alimentação das larvas (HANSKI, 1987). As larvas das espécies de Muscidae podem ser coprófagas, saprófagas ou carnívoras (SKIDMORE, 1985) e após a alimentação, procuram por um sítio de pupação no habitat, ou por mais fonte de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, e esse processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG,

1990), a qual deve ser considerada na estimativa do IPM (GOMES *et al.*, 2003; VON ZUBEN *et al.*, 1998) e pode ser de importância em novas formas de controle destas moscas, uma vez que o estágio larval é o momento do desenvolvimento do inseto em que ele está mais susceptível à predação e menor capacidade de deslocamento comparando-se aos adultos.

Nenhum estudo de dispersão larval em *M. domestica* havia sido feito, sendo encontrados apenas alguns estudos de dispersão larval em califórídeos como o trabalho de GRENN (1951), de GREENBERG (1990), e de NUORTEVA (1977), e outros envolvendo modelos, como os de dispersão larval pós-alimentar em ambiente restrito à uma única direção que se basearam em equações de difusão (BASSANEZI *et al.*, 1997), análises estatísticas (GODOY *et al.*, 1995, 1996; VON ZUBEN *et al.*, 1996), sob o enfoque de interações não-locais (BOLDRINI *et al.*, 1997), e através da análise de dispersão em arenas circulares para pupação (GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2005). Além disso, estudos de dispersão e outros que observem tipos de comportamentos espaço-temporais, muito comuns em ecologia populacional, vêm utilizando modelagens físico/matemáticas e simulações de fenômenos em sistemas complexos, para melhor compreensão e interpretação dos dados observados (TEWS *et al.*, 2004; ZIV, 1998), tendo em vista a grande quantidade de variáveis envolvidas e a interação existente entre as mesmas.

No entanto, ainda não existem trabalhos que observem o comportamento de dispersão larval e conseqüente padrão de distribuição espacial nos sítios de pupação, de indivíduos em contato com substratos de pupação com substâncias químicas (inseticidas), as quais podem influenciar neste e em outros comportamentos.

No entanto, muitos insetos apresentam certa resistência a alguns inseticidas utilizados, e um inseticida que vem sendo bastante utilizado ultimamente e com grande eficiência no controle de cupins e gafanhotos, pragas estas de grande importância agrícola, e em qualquer estágio do desenvolvimento (ninfal, larval ou adulto), é o Fipronil (grupo químico: Fenil Pirazol) (KIDDS & JAMES, 1991; UNIVERSITY OF MINNESOTA, 2006; BOBE *et al.*, 1997). O Fipronil causa excessiva excitação neural, paralisia severa e morte do inseto (BOBE *et al.*, 1998), e tem sido relatado como um potencial inseticida no controle de moscas, como foi observado por SMITH *et al.* (2000) em larvas de *Lucilia sericata*.

Assim, estudos que procurem observar a atuação de inseticidas e drogas no sistema nervoso têm sido de fundamental importância (VON KEYSERLINGK, 1985) para que se possa obter um melhor conhecimento do seu modo de ação, conseqüências comportamentais e mudanças fisiológicas nos seres vivos, além de, no caso de insetos pragas, auxiliarem na elaboração de programas de manejo da resistência destes aos inseticidas (GEORGHIOU, 1983). Assim o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do Fipronil (Inseticida: Fenil Pirazol) no padrão de comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica* em arenas circulares.

Material e Métodos

Coleta e manutenção dos espécimes sob condições experimentais

Exemplares adultos de *M. domestica* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizado como isca, matéria orgânica de origem animal em decomposição, e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala climatizada a $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12hs.

A alimentação oferecida aos adultos foi de açúcar, água e fígado bovino, sendo este último destinado para o fornecimento protéico necessário para o desenvolvimento ovariano das fêmeas adultas (LINHARES, 1988). Carne bovina moída foi usada como substrato para postura pelas fêmeas grávidas (parentais); estes ovos foram utilizados para produção da geração F_1 , e assim, somente a geração F_2 foi empregada nos experimentos.

Como substrato alimentar para desenvolvimento larval da espécie estudada, foi utilizado: meio artificial, à base de leite em pó, ágar, levedura de cerveja, nipagin e caseína, preparado de acordo com LEAL *et al.* (1982).

Os ovos destas espécies foram depositados pelas fêmeas (F_1) em macerado de carne moída, sendo que imediatamente após a oviposição, os ovos foram separados e mantidos em BOD (temperatura de $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h) até a eclosão das larvas, para a formação das densidades larvais. Foram formadas densidades de 400 larvas por tratamento, sendo feitos dois experimentos (2 testes), sendo que cada teste era composto por quatro frascos: três frascos com doses diferentes de Fipronil e um tratamento controle. Após a eclosão, as larvas foram colocadas em frascos contendo meio artificial (LEAL *et al.*, 1982) (400 larvas em 125 gramas de dieta – 0,31g/larva).

Após o desenvolvimento larval que durou aproximadamente 84h, foram separadas em torno de 100 larvas junto com o substrato alimentar, que foram depositadas no centro de uma arena circular de 30 cm de diâmetro e de 10 cm de profundidade forradas com areia [aproximadamente 7 dm³] (Figura 1), na qual as larvas irradiaram para buscar seu sítio de pupação. Estas arenas foram colocadas em salas com temperatura variando entre 25°C e 27°C, com fotoperíodo de 24 h, ou seja, luz total.

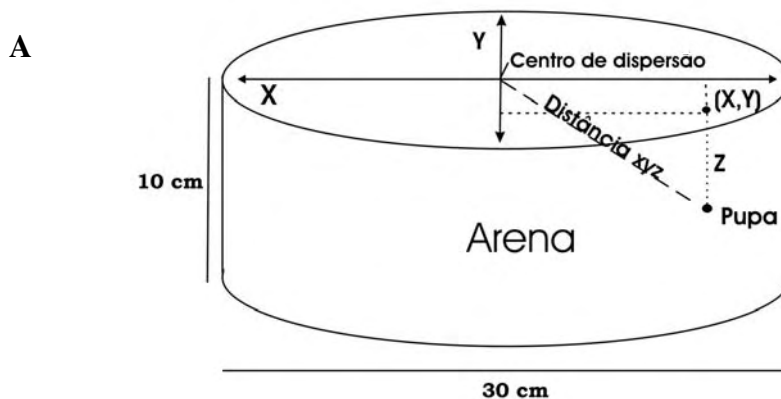


FIGURA 1. Esquema e foto das arenas utilizadas para estudo da dispersão larval pós-alimentar.

A areia utilizada no experimento foi previamente lavada em água corrente, para retirada de qualquer substância química presente na mesma e peneirada, para que ficasse mais homogênea no tamanho de seus grãos (diâmetro dos grãos era menor que 1 mm), e posteriormente armazenada para ser utilizada na montagem das arenas. Foram feitos duas réplicas e cada réplica composta por quatro tratamentos (quatro arenas), sendo um controle, um com a dose de Fipronil utilizada no controle de pragas (**F**), um com o dobro da dose **F** (**2F**) e outra com metade da dose **F**(**F/2**).

O volume de areia colocado nas arenas recebia 800 mL de água antes de se montar as arenas e iniciar a dispersão, pois este substrato, se totalmente seco, impossibilitava que as larvas conseguissem se enterrar, causando a morte das mesmas. Após a montagem de todas as arenas, 50 mL de água eram dispersos pela superfície destas por meio de “spray”, com a presença de Fipronil (tratamentos com dose) ou sem a presença do inseticida (controle). A Tabela 1 abaixo mostra a metodologia empregada nos substratos alimentares e nas arenas de dispersão.

TABELA 1. Metodologia utilizada nas arenas de dispersão.

* volume “exemplo” calculado de acordo com a massa média dos animais utilizados.

Denominação do tratamento	Metodologia utilizada nas arenas de dispersão larval pós-alimentar			
	Substrato alimentar larval		Treatment realizado no substrato	
			Substrato de pupação	
Controle	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão "spray" de 50 mL de água	areia
F/2	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão "spray" de 0,88 mg de Fipronil (50 mL)	areia
F	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão "spray" de 1,76 mg de Fipronil (50 mL)	areia
2F	125 g de Dieta (Leal <i>et al.</i> , 1982)	Sem tratamento	Dispersão "spray" de 3,52 mg de Fipronil (50 mL)	areia

Dados que foram obtidos na análise das arenas.

Após as larvas empuparem, elas foram individualmente localizadas e retiradas da areia, sendo medidas para cada uma as coordenadas no eixo x,y e a profundidade (z) do local de pupação em relação ao centro, com o auxílio de régua. Através dos dados de coordenada foram obtidas a distância de cada pupa do centro de irradiação e a distância xyz, como pode ser observado na Figura 1. A contagem começou da periferia para o centro.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989), com ajuda do programa MATLAB 6.5, visando uma melhor interpretação e visualização dos padrões de dispersão larval e localização das pupas nos diferentes tratamentos.

Cada pupa foi individualizada em frascos de plástico e pesada em balança analítica da marca Ohaus, antes que ocorresse a emergência dos adultos. Os dados de peso foram anotados na mesma planilha dos outros dados, para futura análise.

Após a pesagem, cada pupa foi devolvida ao seu respectivo frasco, para após a emergência ser feita a sexagem dos adultos. Também foi observado o número de indivíduos mortos nos diferentes tratamentos, procurando ver a influencia da dose do inseticida na mortalidade e no comportamento de dispersão. Neste caso, foi observado o número de larvas mortas no substrato de pupação ou mortalidade no estágio de pupa, no qual, passados vários dias, não houve a emergência do adulto.

Drogas utilizadas, suas disposições e dosagens.

Foi utilizado o Fipronil (grupo químico: Fenil Pirazol) (inseticida - Regent[®] 800 WG), sendo amplamente estudados seus efeitos no sistema nervoso dos insetos (DUHAN *et al.*, 2001) e administrado em diversas culturas agrícolas para controle de pragas (AGROFIT, 2006).

O inseticida foi colocado no substrato de pupação (areia) nas arenas, devido a seu modo de aplicação na agricultura. A dose utilizada para observação do efeito desta substância no padrão de dispersão larval foi igual à a uma dose média utilizada na agricultura para o controle de diversas pragas (AGROFIT, 2006), (250g de p.c./ha (hectare) que corresponde a $2,5 \cdot 10^{-3}$ mg/cm², ou seja, 1,76 mg de Fipronil / arena, dose utilizada pra controle de cupins [*Cornitermes cumulans* e *Heterotermes tenuis*] e broca da cana [*Diatraea saccharalis*] [AGROFIT, 2006]), sendo disperso por meio de “spray” um volume total de 50 mL (água e/ou substância dissolvida) sobre toda a superfície da arena.

Foram feitos quatro tratamentos, o tratamento controle (C), o qual recebia 50 mL de água dispersa na superfície antes de se colocarem as larvas; e três tratamentos com doses diferentes de Fipronil: F/2 (metade da dose utilizada na agricultura), F (dose utilizada na agricultura) e 2F (o dobro de F) .

Análise estatística e utilização de ferramentas computacionais.

Análise de variância (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Bonferroni foram utilizados comparando as médias de profundidade, de distância e massa dos tratamentos realizados, utilizando nível global de significância de 5%.

Por meio das coordenadas das pupas encontradas, foram feitos gráficos de densidade dos indivíduos de acordo com a distribuição dos indivíduos na arena, como proposto por WORTON (1989); e calculada a média da distância mínima entre as pupas e a média da mínima distância entre as pupas, nos diferentes tratamentos (doses) e substratos alimentares. Estas ferramentas utilizadas na melhor interpretação dos dados obtidos foram feitas com ajuda do programa MATLAB 6.5, tal análise era imediata e foram obtidos gráficos e valores necessários para interpretação dos resultados.

Resultados e Discussão

Foi observado que as pupas encontradas nos diferentes tratamentos revelaram mudanças no padrão de dispersão larval pós-alimentar (profundidade e distância) e diferenças nas médias de algumas variáveis analisadas, como a massa.

A Tabela 2 mostra a média das variáveis obtidas (coordenadas xy, profundidade, distância e distância xyz) da distribuição das pupas encontradas nos diferentes tratamentos.

TABELA 2. Média de cada dado obtido da dispersão de *M. domestica* nas arenas tratadas com Fipronil. R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2.

	média	x	y	profundidade (cm)	distância (cm)	distância xyz (cm)	Massa indivíduo (mg)
R1	Controle	0,18	1,65	6,01	6,69	9,53	23,9
	F/2	-0,79	1,01	6,16	8,12	10,73	21,5
	F	1,58	-0,56	4,41	6,68	8,38	11,6
	2F	0,30	-0,95	4,03	7,57	9,19	14,5
R2	Controle	1,17	1,21	5,75	6,45	9,22	22,3
	F/2	0,87	0,37	5,90	7,15	9,75	20,4
	F	0,13	1,18	3,59	5,59	7,11	12,1
	2F	-0,02	0,04	3,69	5,48	7,09	12,8

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

A análise estatística utilizando a variável dependente profundidade mostrou haver diferenças apenas nos tratamentos ($F = 18,3787$; $p = 3,1643 \cdot 10^{-11}$), sendo que as réplicas ($F=1,6669$, $p=0,1973$) e a interação réplica x tratamento ($F=0,0463$, $p=0,9867$) não apresentaram diferenças. Na análise de comparação múltipla, foi possível observar que F e 2F não se diferenciam entre si, mas se diferenciam de C e F/2. Pôde-se observar que a média de profundidade nos tratamentos F e 2F foram bem menores comparadas ao Controle e F/2. Assim, as maiores doses deste inseticida causaram uma redução na profundidade percorrida pelas larvas de *M. domestica*. Já no tratamento F/2, a distância foi a maior observada, mas não diferiu significativamente da média obtida no controle.

Já quando se analisa a variável distância, pode-se observar apenas diferença entre as réplicas ($F=6,1798$; $p=0,0133$); já entre os tratamentos ($F=2,4926$; $p=0,0596$) e a interação réplica x tratamento ($F=1,0874$; $p=0,3541$) não foram observadas diferenças. Tal diferença observada entre as réplicas pode ser vista por meio dos dados da Tabela 2, em que as médias obtidas em R1 são maiores que as observadas em R2; no entanto, a variação nos tratamentos é semelhante. Não foi observada variação na distância entre os

tratamentos, provavelmente por duas razões o número de pupas encontradas na amostra, foi pequeno nos tratamentos com maiores doses de Fipronil (Tabela 3), e a segunda opção, de que a distância não sofre realmente tanta influência do tratamento, talvez por causa da forma com que foi aplicado o inseticida nas arenas, superficialmente, o que poderia causar gradientes de disposição do Fipronil nas diferentes profundidades (maior disposição na superfície e menor nas porções mais profundas). Assim, as larvas poderiam perceber a presença e caminhar mais ou menos, dependendo do efeito da substância na fisiologia larval (metabolismo e comportamento).

TABELA 3. Porcentagem de larvas mortas, adultos emergentes (machos e fêmeas) em relação a 100 larvas inicialmente em dispersão larval pós-alimentar.

Porcentagem das 100 larvas colocadas nas arenas para dispersão						
	Tratamento	Larvas mortas	Adultos emergentes	Machos	Fêmeas	Pupas encontradas
R1	Controle	0.00	70,53	50,75	49,25	95,00
	F/2	21.00	28,07	43,75	56,25	57,00
	F	34.00	25,93	57,14	42,86	27,00
	2F	48.00	16,67	60,00	40,00	30,00
R2	Controle	0.00	74,23	48,61	51,39	97,00
	F/2	31.00	42,00	61,90	38,10	50,00
	F	48.00	30,00	58,33	41,67	40,00
	2F	51.00	21,62	62,50	37,50	37,00

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Pode-se observar também uma grande variação na massa dos indivíduos nos diferentes tratamentos (Tabela 2), sendo que a presença de inseticida no substrato de dispersão larval (areia) nas diferentes doses causou uma redução na massa das pupas encontradas. Pode-se observar diferenças significativas analisando esta variável (massa) entre réplica ($F=5,0404$; $p=0,0252$) e tratamento ($F=180,5053$; $p=2,4035 \cdot 10^{-75}$), mas a interação réplica x tratamento ($F=1,1155$; $p=0,3424$) não apresentou diferença, ou seja, o efeito do tratamento nas réplicas foi semelhante, e vice versa. Esta variação na massa pode causar mudanças no padrão de dispersão larval, como observado e discutido na revisão feita por GOMES *et al.* (2006), em que foram relatadas correlações entre massa, distância e profundidade em *C. megacephala* e *C. albiceps* em diferentes condições experimentais.

As réplicas se diferenciaram, já que a média de massa na réplica 1 foi maior que a média de massa na réplica 2 em todos os tratamentos (Tabela 2). Os tratamentos C e

F/2 tiveram médias de massa muito maiores que os tratamentos F e 2F, tratamentos estes que a sobrevivência das larvas e as pupas encontradas foi muito menor (Tabela 2 e 3). As maiores doses de Fipronil causaram grande mortalidade de indivíduos e menor emergência de adultos, além de terem modificado a dispersão das larvas diminuindo a profundidade percorrida. Assim, mesmo o inseticida sendo aplicado superficialmente nas arenas, o que de certa forma geraria gradientes de disposição da substância no substrato (areia), as larvas em contato com doses maiores sofreram maior influência na massa e profundidade, diminuindo as duas variáveis. Tal mudança provavelmente foi causada pelo efeito do inseticida na fisiologia larval, sendo que as larvas em contato com doses F e 2F, sofreram maior influência logo que tiveram contato com a substância. Assim, foi observada grande quantidade de larvas mortas e, estas foram encontradas a pequenas distâncias do centro de dispersão (Tabela 4). Já as larvas em contato com a dose F/2, as pupas foram encontradas nas maiores profundidades e distâncias xyz (Tabela 2), ou seja, provavelmente o efeito do inseticida não tenha sido imediato, mas a posteriori, pois as mesmas conseguiram se dispersar, e as larvas encontradas apresentaram profundidades e distâncias maiores que as obtidas em F e 2F (Tabela 4).

TABELA 4. Média da distribuição das larvas encontradas mortas nas arenas com Fipronil.

	média	x	y	profundidade (cm)	distância (cm)	distância xyz (cm)
R1	F/2	1,46	1,44	0,86	5,90	6,09
	F	0,46	0,30	0,08	0,84	0,85
	2F	-0,11	0,28	0,17	0,30	0,40
R2	F/2	0,74	4,34	1,99	5,22	6,30
	F	0,66	0,66	0,56	1,21	1,48
	2F	-0,22	0,67	0,78	0,89	1,35

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

A explicação para estas modificações na dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica*, provavelmente tem relação com a alteração na atividade dinâmica e metabólica que o Fipronil pode causar nos insetos. Sabe-se que o mesmo hiperexcita o sistema nervoso destes animais, por meio da interrupção dos canais de sódio do sistema GABAérgico, responsável este pela inibição de impulsos neurais (KIDD & JAMES, 1991). Assim, o impulso neural acaba sendo hiperativado o que causa a morte do inseto. No entanto, poderia inicialmente causar um aumento na movimentação das larvas

presentes no substrato (com uma profundidade maior alcançada ou distância maior percorrida), larvas estas tolerantes a certa dosagem deste inseticida, e conseqüentemente um aumento no metabolismo das mesmas, o que causaria uma redução da massa pela alta atividade metabólica destes indivíduos, dados este que podem ser observados na Tabela 2.

Na Figura 2, pode-se visualizar a variação na distribuição e número de indivíduos nos diferentes tratamentos e réplicas, por meio de curvas de níveis as quais representam a densidade de indivíduos dispersos e encontrados nas arenas.

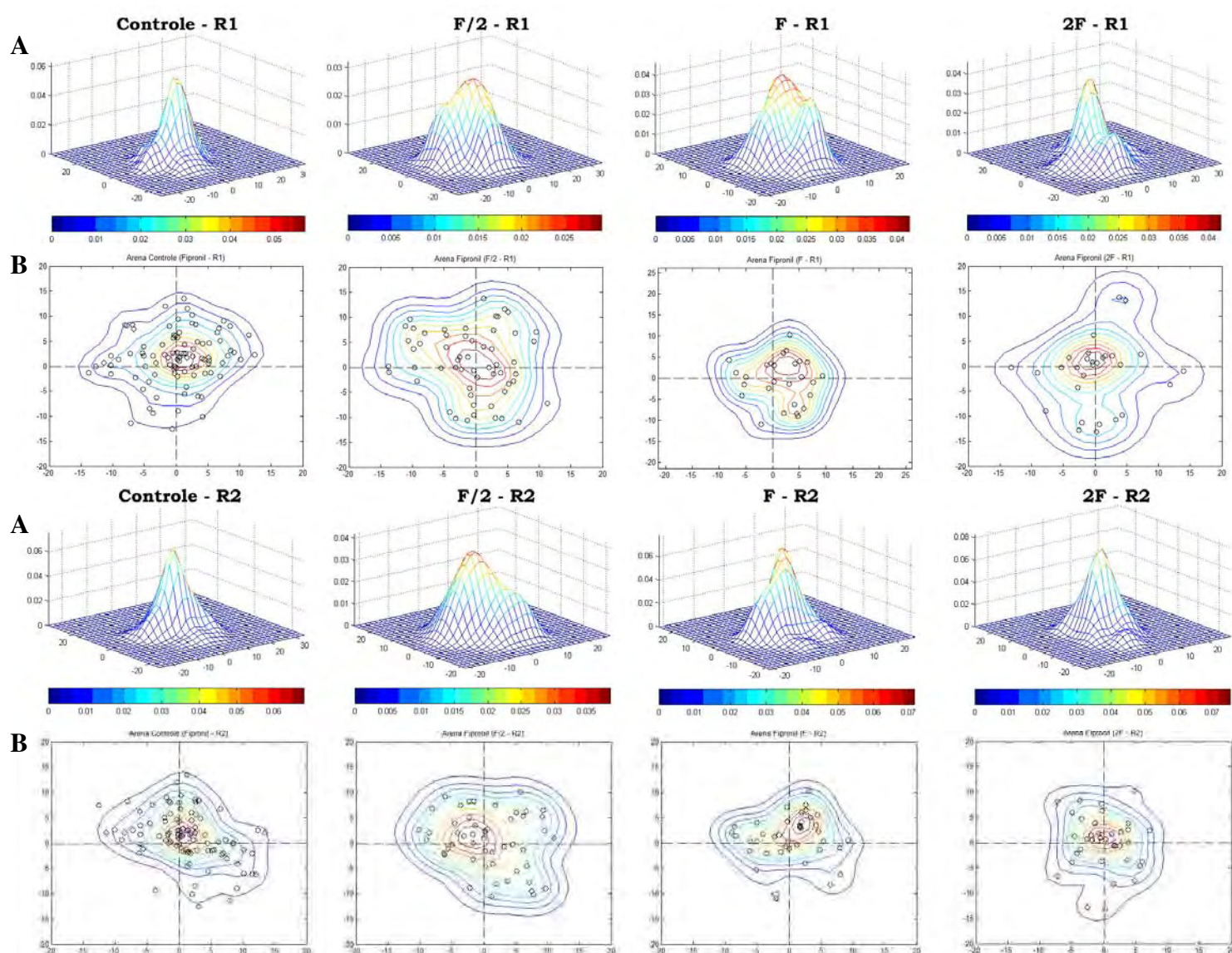


FIGURA 2. Gráficos de Distribuição/densidade e Dispersão x,y das pupas nas arenas tratadas com Fipronil. A – Réplica 1 e B – Réplica 2. A - Análise em 3 dimensões da distribuição, B - Análise da base. R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

A análise da Figura 2 nos permite afirmar que a diferença na dose do inseticida nos diferentes tratamentos causou alterações no comportamento de dispersão larval pós-alimentar deste muscídeo. As larvas em contato com a dose F/2 dispersaram (maiores distâncias) mais que qualquer outro tratamento, até mesmo o controle. Isto pode ser observado por meio da base dos gráficos de densidade / distribuição (Figura 2), sendo que estas bases em F/2 são as maiores obtidas.

Pôde-se observar também que os tratamentos F apresentam as menores bases e uma menor quantidade de indivíduos encontrados. Já no tratamento 2F, as bases não são tão pequenas quando se compara ao controle, principalmente, na réplica 1. Tal diferença pode ser explicada pelo efeito da substância sobre os indivíduos mais resistentes, os quais percebendo a presença ou sob efeito da mesma, via aumento metabólico, caminhariam mais e assim apresentariam maiores bases nos gráficos de densidade / distribuição.

A variação de densidade nos gráficos F/2 é menor que nos outros tratamentos, ou seja, os indivíduos não se concentraram em uma região da arena. Tal resultado poderia ser explicado pela presença da droga em uma dose tolerável para a maioria dos indivíduos, os quais procurariam se dispersar mais na tentativa de procurar por um sítio de pupação mais adequado.

No entanto, o número de pupas encontradas é visivelmente diferente entre os tratamentos, diminuindo na medida em que se aumentam as doses de Fipronil, desta forma causando diferenças na densidade de indivíduos distribuídos nas arenas, como pode ser observado na Figura 2.

Assim, para uma melhor interpretação dos dados obtidos, compreensão do comportamento de dispersão larval, escolha do sítio de pupação e efeito do Fipronil no padrão de dispersão larval pós alimentar de *M. domestica*, procurou-se analisar os diferentes tratamentos separando os indivíduos mortos dos sobreviventes, as diferentes doses do inseticida (larvas e pupas), procurando relacionar os diferentes setores da arena com a escolha do sítio de pupação e emergência ou não de adultos das pupas.

Observando as Figura 3, 4, 5 e 6 e as Tabelas 6 e 7, pode-se avaliar a preferência na distribuição das pupas encontradas e a porcentagem de sobrevivência (emergência dos adultos) nas diferentes porções das arenas, avaliadas por meio de dados de profundidade e distância.

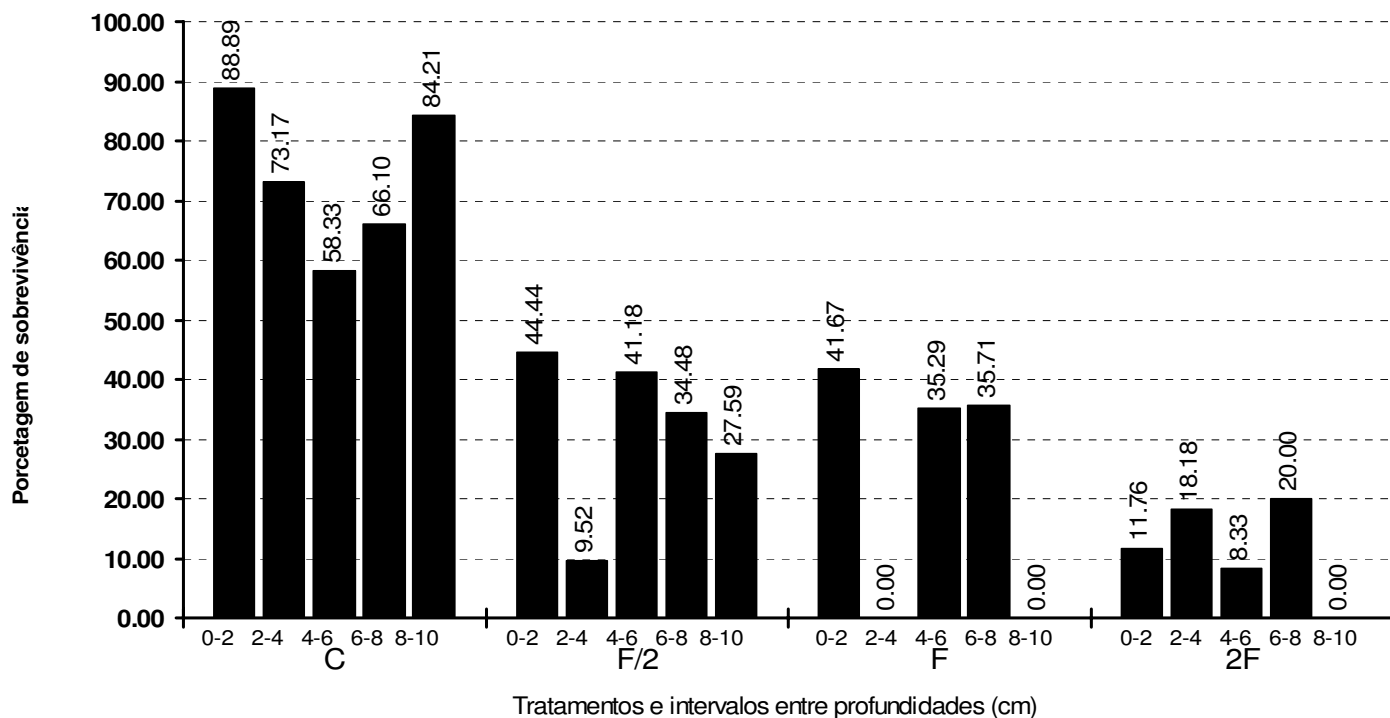


FIGURA 3. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de profundidades (cm). C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

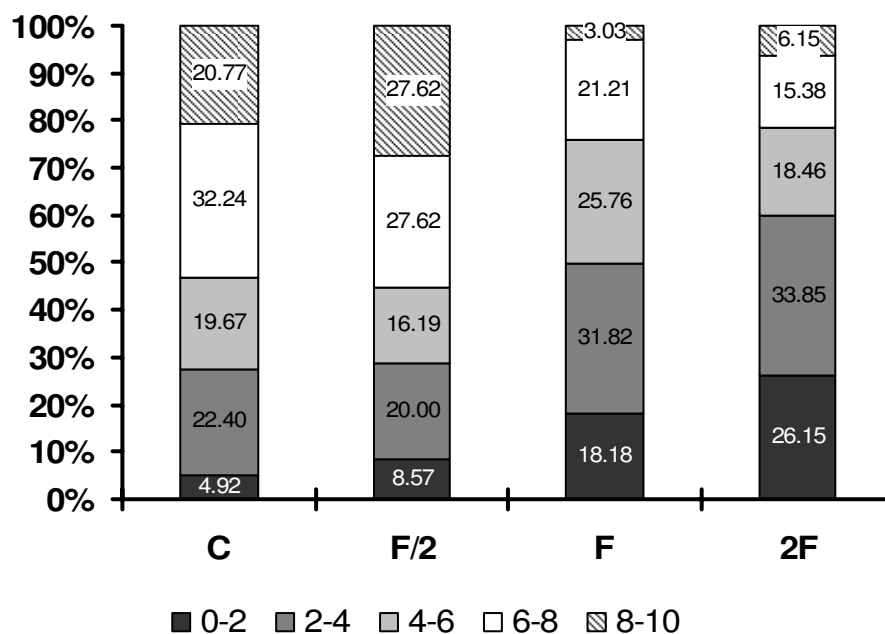


FIGURA 4. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de profundidade (cm) nos diferentes tratamentos. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Analisando da Figura 3, pode-se observar que houve uma maior sobrevivência das pupas no tratamento controle, próximas à superfície e nas maiores profundidades. No entanto, poucas pupas foram encontradas próximas à superfície em C, entre 0-2 cm de profundidade (Figura 4), sendo que a maior preferência na escolha do sítio de pupação foi no intervalo de profundidade de 6-8cm.

Já os tratamentos em que o Fipronil estava presente, o padrão de preferência observado no Figura 4, foi completamente modificado. Pode-se perceber uma maior quantidade de pupas encontradas nas regiões com profundidade de 0-2 cm e de 2-4 cm, quanto maior a dose. A preferência de escolha do sítio de pupação nos diferentes intervalos de profundidades, mostra certa semelhança entre C e F/2, e entre F e 2F.

A baixa amostragem de pupas encontradas nos tratamentos com dose maior não permite concluir, interpretar ou visualizar um padrão nos dados de porcentagem de sobrevivência nas diferentes profundidades. Devido ao modo de aplicação do inseticida nas arenas, poderia se esperar que as larvas buscassem regiões mais profundas, diminuindo assim a chance de mortalidade naquela porção mais profunda. No entanto, apenas em F/2 tal procura por maior profundidade foi observada; entretanto, a sobrevivência parece ter diminuído na medida em que aprofundavam nas arenas. Tal fato observado em F/2 pode ter relação ao efeito do inseticida, alterando o comportamento larval e metabólico da larva, ou seja, o inseticida poderia alterar a dinâmica de movimentação das larvas. Assim que as larvas entrassem em contato com o inseticida nesta dose, procurariam dispersar e se enterrar mais, sendo que as mais sensíveis procurariam maiores profundidades. No entanto, por serem mais sensíveis, sobreviveriam menos, como foi observado nas Figuras 3 e 4.

Já nos tratamentos com doses F e 2F, as larvas, ao entrarem em contato com a droga, sofriam o efeito imediatamente e não conseguiam se aprofundar muito na arena, permanecendo em regiões mais superficiais, sendo que a sobrevivência seria menor quanto maior a dose do inseticida.

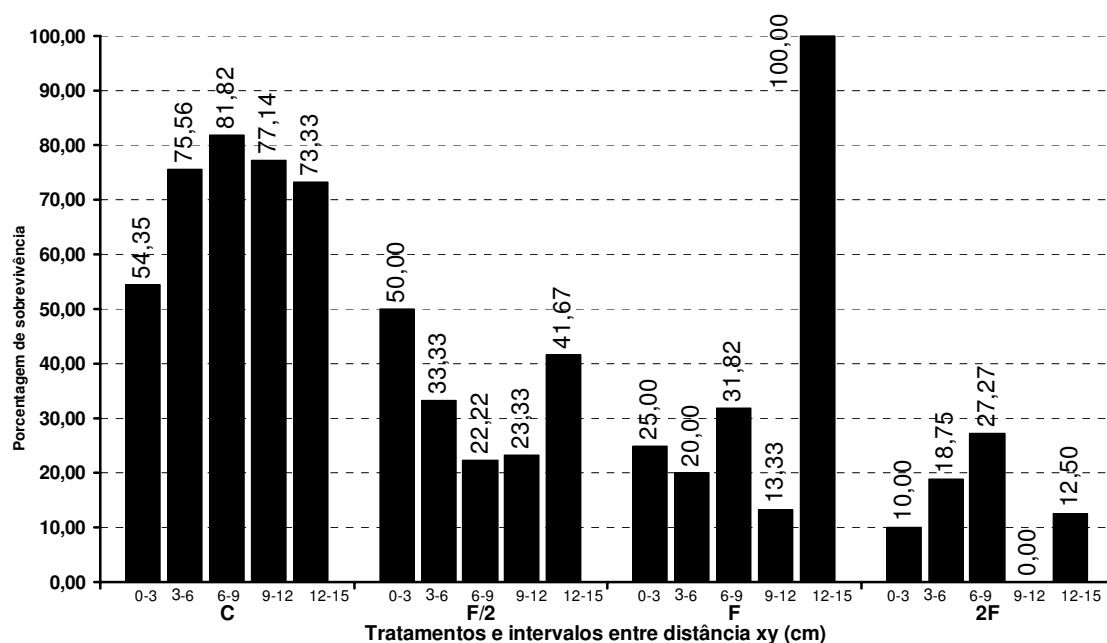


FIGURA 5. Porcentagem de emergência de adultos das pupas encontradas nos diferentes tratamentos e nos diferentes intervalos de distância xy (cm). C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

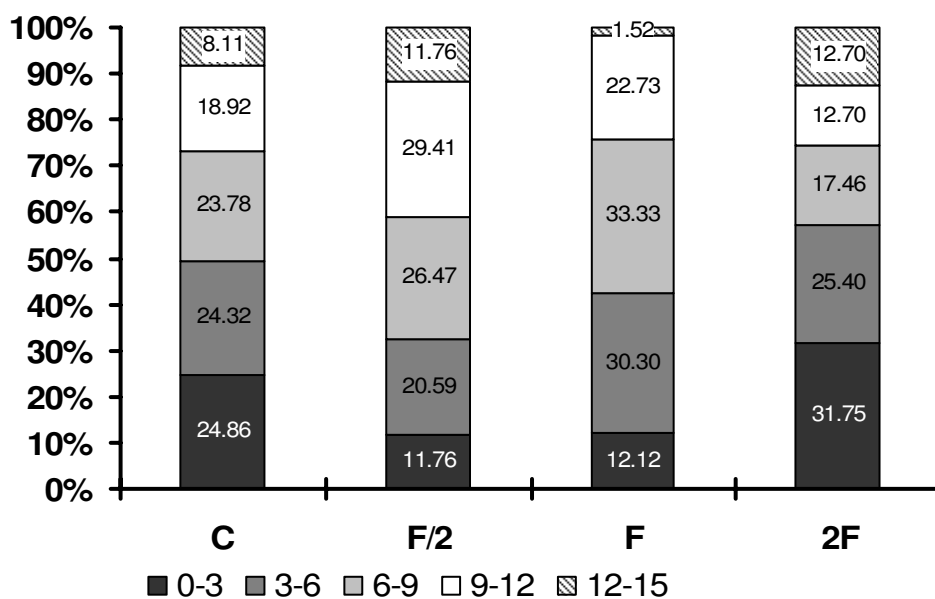


FIGURA 6. Porcentagem de distribuição das pupas em diferentes intervalos de distância xy (cm) nos diferentes tratamentos. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

A análise na preferência e sobrevivência em relação à distância pode ser observada nas Figuras 5 e 6. No controle, há uma maior concentração nas porções mais centrais da arena entre (0-9cm), sendo a maior quantidade de pupas encontradas entre 0

3 cm (Figura 6), já a sobrevivência é maior nas regiões intermediárias de distância, 6-9cm (Figura 5). A presença do Fipronil nos tratamentos alterou a preferência e diminuiu a sobrevivência das pupas de diferentes formas nos diferentes tratamentos.

Pode-se observar uma menor tendência de localização das pupas nas regiões mais centrais (distância de 0-6 cm) no tratamento F/2, sendo que o aumento da dose de Fipronil causou uma maior preferência por esta região pelas larvas. Tal efeito pode ser explicado da mesma forma que foi discutido anteriormente. As larvas presentes nas arenas com dose de F/2, sofreram inicialmente menos com a substância comparado com os tratamentos F e 2F; porém, tal variação pode ser explicada pelo efeito do inseticida, o qual age no sistema GABAérgico, causando um aumento na transmissão neural, que reflete num aumento metabólico e conseqüentemente num aumento do gasto energético, que poderia resultar em distâncias maiores percorridas, como observado em F/2. Este gasto energético resultaria em uma perda de massa em relação ao controle, a qual foi constatada (vide Tabela 2). No entanto, nas arenas F e 2F, a perda de massa é maior ainda e a distância percorrida é menor sendo que, tal fato pode ser explicado por dois motivos: amostragem baixa (poucos indivíduos chegaram até estágio de pupa) e efeitos desta substância quando em alta concentração, causando um grande aumento dos impulsos nervosos, o que resultaria em dificuldades locomotoras e sensoriais dos indivíduos, impedindo que os mesmos encontrassem um sítio de pupação.

A análise das Tabelas 5 e 6, nos permite observar que na presença de Fipronil, a média de profundidade percorrida pelas larvas para escolha do sítio de pupação foi reduzida principalmente nos tratamentos F e 2F, tanto entre as pupas sobreviventes (Tabela 5) quanto entre as que não houve emergência do adulto (Tabela 6). Já quanto à distância, observa-se que nas pupas que sobreviveram (Tabela 5), um aumento da distância na menor dose (F/2) e redução da distância nas maiores doses (F e 2F), já nas pupas em que não houve emergência (Tabela 6), a distância na presença do Fipronil foi maior que a observada no controle, talvez porque as pupas mais sensíveis (que morreram) procuraram caminhar mais na tentativa de “fuga” do inseticida, ou o mesmo alterou (aumentando) o metabolismo e dinâmica de deslocamento das mesmas em comparação ao grupo q sobreviveu.

TABELA 5. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que houve emergência do adulto de *M. domestica*, no diferentes tratamentos e substratos alimentares.

	Tratamento	Média (dp) das pupas em que houve emergência de adultos Desvio padrão entre parênteses.		
		Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)
Dieta artificial	C	6.01 ± 2.54	6.90 ± 3.66	23.02 ± 4.79
	F/2	6.04 ± 2.99	7.20 ± 3.95	21.43 ± 3.78
	F	4.15 ± 2.16	6.45 ± 2.91	11.96 ± 3.65
	2F	3.81 ± 2.05	5.52 ± 3.98	13.42 ± 3.69

C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

TABELA 6. Média e desvio padrão da distância, profundidade e massa das pupas em que não houve emergência do adulto de *M. domestica*, no diferentes tratamentos e substratos alimentares.

	Tratamento	Média (dp) das pupas em que não houve emergência de adultos Desvio padrão entre parênteses.		
		Profundidade (cm)	Distância xy (cm)	Massa (mg)
Dieta artificial	C	5.59 ± 2.13	5.71 ± 3.88	23.28 ± 3.57
	F/2	6.03 ± 2.69	7.84 ± 3.42	20.79 ± 4.59
	F	4.08 ± 6.25	7.87 ± 2.81	11.86 ± 2.80
	2F	3.86 ± 2.46	6.44 ± 4.29	13.65 ± 3.15

C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

Um outro fator que pode ter influenciado a dispersão larval pós-alimentar de *M. domestica* é o efeito do aglomerado larval na procura do sítio de pupação, BOLDRINI *et al.* (1997) analisaram a dispersão larval pós-alimentar de moscas-varejeiras por meio de modelos matemáticos e observaram que o efeito da vizinhança influencia a escolha do local de pupação, principalmente de *C. megacephala* e *C. putoria*. Desta forma, a escolha do sítio de pupação tem influência da localização de pupas próximas; no entanto, as presenças de substâncias químicas em contato com as larvas poderiam influenciar a percepção da vizinhança e assim modificar a distância entre pupas vizinhas, devido principalmente ao efeito destas substâncias na fisiologia e comportamento destas larvas e na percepção sensorial do meio. Com isto, foram obtidos valores para cada arena de dispersão, da média da distância entre as pupas e da média da distância mínima entre pupas, para avaliação de prováveis mudanças na escolha do sítio de pupação e do efeito da vizinhança pelas interações não locais.

A Figura 7 mostra a média e variância entre a mínima distância nos diferentes tratamentos e a Tabela 7, a média da distância entre pupas e a média da distância mínima entre pupas e a respectivos valores de variância.

TABELA 7. Média e variância da distância entre pupas e da distância mínima entre pupas.

		Média da Distância entre pupas		Variância	Média das Distância mínimas entre as pupas		Variância
R1	C		10.03	22.45		1.89	0.24
	F/2		12.11	27.70		3.02	0.49
	F		9.73	16.60		2.67	0.64
	2F		12.00	34.80		2.89	1.20
R2	C		9.81	23.64		1.96	0.25
	F/2		10.89	20.86		2.95	0.43
	F		8.64	15.54		2.31	0.40
	2F		8.80	18.30		2.67	0.51

R1 – réplica 1 e R2 – réplica 2. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

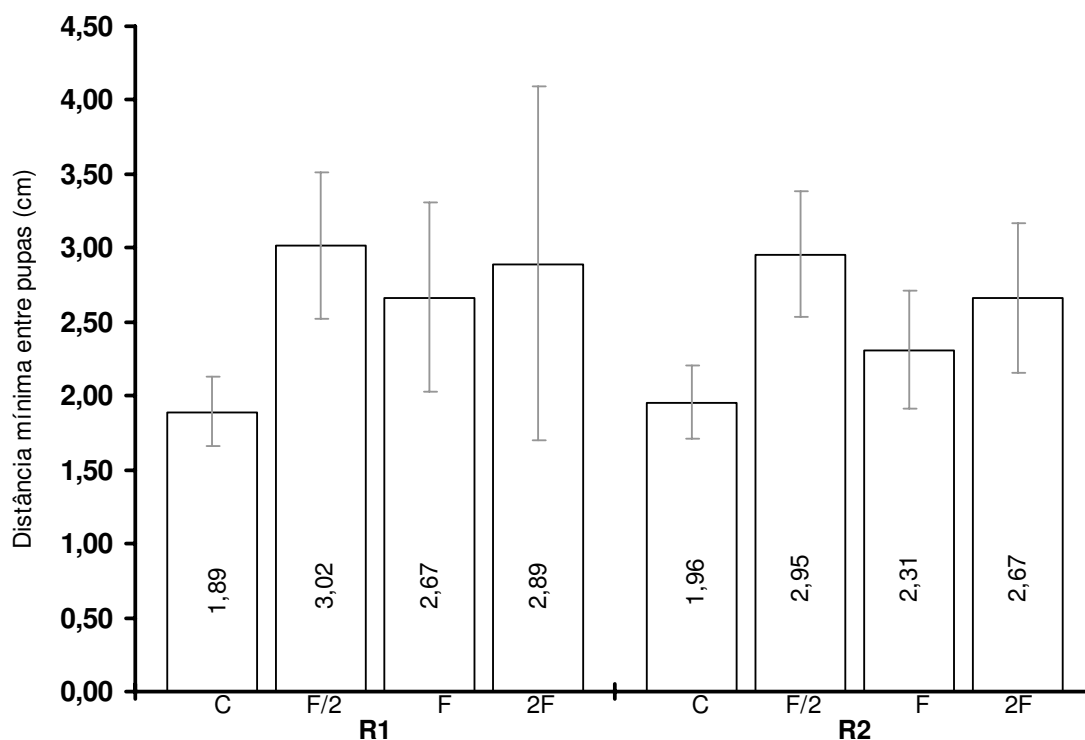


FIGURA 7. Gráfico mostrando a média e a variância da mínima distância entre pupas nas arenas em diferentes tratamentos (C, F/2, F e 2F). R1 e R2 – Réplicas. C – controle, F/2 – metade de F, F – dose utilizada na agricultura e 2F – dobro de F.

A Figura 7 e a Tabela 7 mostram que a menor média de mínima distância entre pupas foi observada no controle, provavelmente devido a dois fatores: número de pupas encontradas e comportamento de dispersão larval. Pode-se observar que a presença do inseticida diminuiu o número de pupas encontradas, aumentando o número de larvas mortas, e alterando a distância e profundidade na escolha do sítio de pupação. Tal variação também foi observada na variável distância calculada entre as pupas nestes tratamentos.

Pode-se observar diferenças entre os tratamentos nas duas réplicas realizadas (R1: $F = 10,3234$; $p = 0,0000$; C difere de todos os tratamentos; R2: $F = 8,2691$; $p = 0,0001$; C é igual a F, e $2F$ é igual a $F/2$ e F, mas $F/2$ é diferente de F).

A presença de Fipronil alterou a distância entre as pupas, provavelmente por dois fatores: o efeito do inseticida no padrão de dispersão (o qual foi alterado, como discutido anteriormente) e o número de pupas encontradas (que diminuiu na medida em que se aumentava a dose de Fipronil). Alguns trabalhos relatam os efeitos de substâncias tóxicas ao sistema nervoso sobre o comportamento dos insetos, em larvas de *Sarcophaga bullata* (ZDÁREK *et al.*, 2004), em que se observam mudanças no comportamento de pupação destes dípteros; efeitos comportamentais e de mortalidade em vespas parasitas *Aphidius ervi* (DESNEUX *et al.*, 2004), efeitos no comportamento de repelência em culicídeos (CHAREONVIRIYAPHAP *et al.*, 2001; MATHENGE *et al.*, 2001; ROBERTS *et al.*, 2000; SUNGVORNYOTHIN *et al.*, 2001;) e efeitos de *deltamethrin* no comportamento de deslocamento de coleópteros adultos (BECKEL *et al.*, 2004). Já estudos com Fipronil relatam o potencial uso deste inseticida no controle de moscas, como foi observado por SMITH *et al.* (2000) em larvas de *Lucilia sericata*.

O efeito no comportamento parece ter sido melhor visualizado no tratamento F/2 em todas as comparações e análises realizadas, pois foi o que mais se diferenciou de todos, talvez pela dose de inseticida ter sido subletal para a maioria das larvas, causando maiores influências no comportamento destes indivíduos e principalmente no comportamento de dispersão larval (HAYNES, 1988), e influenciando menos na mortalidade.

Conclusões

Pode-se constatar que todas as variáveis observadas nos tratamentos com Fipronil sofreram alteração, diferindo do padrão de dispersão larval pós-alimentar de *M.*

domestica no tratamento controle. As larvas em contato com o inseticida apresentaram uma grande mortalidade na medida em que se aumentava a dose do Fipronil nos diferentes tratamentos. O Tratamento F/2 pareceu ser o que melhor mostrou os efeitos do Fipronil no comportamento larval, devido à sobrevivência de maior número de indivíduos comparado com os tratamentos F e 2F, além de ter se diferenciado do padrão obtido nos tratamentos com maior dose do inseticida, provavelmente por efeitos subletais da substância. De acordo com os resultados observados nas variáveis profundidade, distância e massa, o inseticida provavelmente causou mudanças fisiológicas e consequentemente comportamentais nas larvas em contato com o mesmo, atuando assim no metabolismo (aumento metabólico – redução na massa e alteração da distância percorrida nos tratamentos) e percepção sensorial do meio na escolha de um sítio de pupação (efeito da vizinhança e distância mínima entre pupas).

Referências Bibliográficas

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitosanitários, **Consulta de Produtos Formulados**, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/!ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5197&p_tipo_janela=NEW>.
Acesso em: 03 jul 2006.
- BASSANEZI, R. C., LEITE, M. B. F., GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, C. J., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F.. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Mem. Inst. O. Cruz**, 92(2): 281-286, 1997.
- BECKEL, H., LORINI, I. & LAZZARI, S. M. N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revta. Bras. Entomol.**, 48(1): 115-118, 2004.
- BOBE, A., COSTE, C.M., & J. COOPER. Factors Influencing the Adsorption of Fipronil on Soils. **J. Agric. Food Chem.** 45, 4861-4865, 1997.
- BOLDRINI J. L., BASSANEZI, R. C., MORETTI, A.C., VON ZUBEN, C. J. GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **J. Theor. Biol.**, 185: 523-531, 1997.
- BURALLI, G. M. & GUIMARÃES, J. H. Controle de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera, Muscidae) em área de manejo de vinhaça (Macatuba, São Paulo, Brasil). **Rev. Bras. Zool.**, 3(1): 1-6, 1985.

- CARVALHO, C. J.; B. **Muscidae (Diptera) of Neotropical Region – Taxonomy**. Ed. UFPR, Curitiba, p.287, 2002
- CASIDA, J. E. & QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present and future? **Ann. Rev. Entomol.**, 43: 1-16, 1998.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T; SUNGVORNYOTHIN, S; RATANATHAM, S; PRABARIPAI A Insecticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. **J. Am. Mosquito Control**: 17 (1): 13-22, 2001.
- DESNEUX, N., RAFALIMANANA, H. & KAISER, L. Dose–response relationship in lethal and behavioural effects of different insecticides on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. **Chemosphere**, 54: 619–627, 2004.
- DUHAM, E. W., SCHARF, M. E. & SIEGFRIED, B. D.. Toxicity and Neurophysiological Effects of Fipronil and Its Oxidative Sulfone Metabolite on European Corn Borer Larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Pest. Biochem. Physiol.**, 71: 97–106, 2001.
- GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G. P., SAITO, T. (eds), **Pest resistance to pesticides**. Plenum, New York, p. 769-792, 1983.
- GODOY, W. A.C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L., RIBEIRO, O. B. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **J. Appl. Entomol.**, 119: 263-266, 1995.
- GODOY, W. A.C., REIS S. F., VON ZUBEN, C. J. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. **J. Appl. Entomol.**, 120(4): 423-426, 1996.
- GOMES, L.; SANCHES, M. R. & VON ZUBEN, C. J. Dispersal and Burial Behavior in Larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). **J. Insect Behavior**, 18(2): 281-292, 2005.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & GOVONE, J. S. Comportamento de dispersão larval radial pós alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. **Entomol. Vect.**, 9: 115-132, 2002.

- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GOMES, L; GODOY, W. A. C. & VON ZUBEN, C. J. A review of postfeeding larval dispersal in blowflies: implication for forensic entomology, **Naturwissenschaften**, 93: 207-215, 2006.
- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am**: 83: 1210-1214, 1990.
- GREENBERG, B. **Flies and Disease. Classification and Biotic Associations**, Princeton University, New Jersey, p. 856, 1971.
- GRENN, A. A. The controlo f blowflies infesting slaughter-houses. I. Field observations of habits of blowflies. **Ann. Appl. Biol.**, 38: 475, 1951.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol**, 12: 257-266, 1987.
- HAYNES, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol**, 33: 149-168, 1988.
- KIDD, H., & D. JAMES, **The Agrochemicals Handbook**, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.
- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- LUND, A. E. Insecticides: effects on the nervous system. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**, Pergamon Press, New York, vol. 12, p. 9-56, 1985.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MARICONI, F. A. M., GUIMARÃES, J. H. & BERTI-FILHO, E. A mosca domestica e algumas outras moscas nocivas. FEALQ, Piracicaba, p. 135, 1999.
- MATHENGE, EM; GIMNIG, JE; KOLCZAK, M; OMBOK M, IRUNGU LW, HAWLEY WA. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success,

- and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **J. Med. Entomol.**, 38 (4): 531-536, 2001.
- MATSUMURA, F.. **Toxicology of insecticides**. Plenum Press, New Cork, 598p., 1985.
- NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Volume 2: Physical Trauma. Tedeschi, C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.
- ROBERTS, DR; ALECRIM, WD; HSHIEH, P; GRIECO JP, BANGS M, ANDRE RG, CHAREONVIRIPHAP T A probability model of vector behavior: Effects of DDT repellency, irritancy, and toxicity in malaria control. **J. Vector. Ecol.**, 25 (1): 48-61, 2000.
- SKIDMORE, P. The biology of the Muscidae of the word. **Series Entomol.**, 29: 550p, 1985.
- SMITH, K. E.; WALL, R.; HOWARD, J. J.; STRONG, L.; MARCHIONDO, A. A. & JEANNIN, PH. In vitro insecticidal effects of fipronil and b-cyfluthrin on larvae of the blowfly *Lucilia sericata*. **Vet. Parasitol.**, 88: 261–268, 2000.
- SUNGVORNYOTHIN, S; CHAREONVIRIYAPHAP, T; PRABARIPAI, A; THIRAKHUPT V, RATANATHAM S, BANGS MJ. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambdacyhalothrin. **J. Vector Ecol.**, 26 (2): 202-215, 2001.
- TEWS, J., MOLONEY, K. & JELTSCH, F. Modeling seed dispersal in a variable environment: a case study of the fleshy-fruited savanna shrub *Grewia flava*. **Ecol. Model.**, 175: 65–76, 2004.
- UNIVERSITY OF MINNESOTA, Radcliffe.s Integrated Pest, Management. <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>>, Acesso em: 10 jan 2006.
- VON KEYSERLINGK, H. C.. The significance of behaviour studies in insecticide research. **Pestic. Sci.** 16: 558-559, 1985.
- VON ZUBEN, C. J. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 4: 525-533. 1998.

- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- WARE, G. W. **The pesticide book**. Thompson Publication, Fresno, 340p, 1989.
- WORTON, B.J. Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies, **Ecology**, 70(1):164-168, 1989.
- ZDÁREK, J. VERLEYEN, P. MARES, M. DELECKOVÁ, L. & NACHMAN R.. Comparison of effects of pyrokinins and related peptides indentified from arthropods on pupariation behaviour in flesh fly (*Sarcophaga bullata*) larvae (Diptera: Sarcophagidae). **J. Ins. Physiol.**, 50: 233-239, 2004.
- ZIV, Y. The effect of habitat heterogeneity on species diversity patterns: a community-level approach using an object-oriented landscape simulation model (SHALOM). **Ecological Modelling**, 111: 135–170, 1998.

CAPÍTULO 8

Análise da variação da umidade nas arenas de dispersão

Para melhor compreensão dos resultados obtidos nas arenas de dispersão e na tentativa de se levantar prováveis fatores que podem influenciar na escolha do sítio de pupação por larvas de moscas, foi analisada a porcentagem de massa de água (podendo ser inferida como volume de água) presente no substrato de pupação em diferentes regiões e profundidades das arenas utilizadas. Foram escolhidas seis diferentes regiões, divididas em duas porções: centro da arena (0 a 2 cm do centro da arena) e periferia da arena (13 a 15cm do centro da arena), e em três intervalos de profundidade: 0 a 2cm, 4 a 6cm e de 8 a 10cm.

Assim, as Figuras 1 e 2 mostram a porcentagem de massa de água existente em diferentes porções da arena nos diferentes tratamentos (dieta e fígado), antes de ocorrer a dispersão e após a ocorrência da mesma.

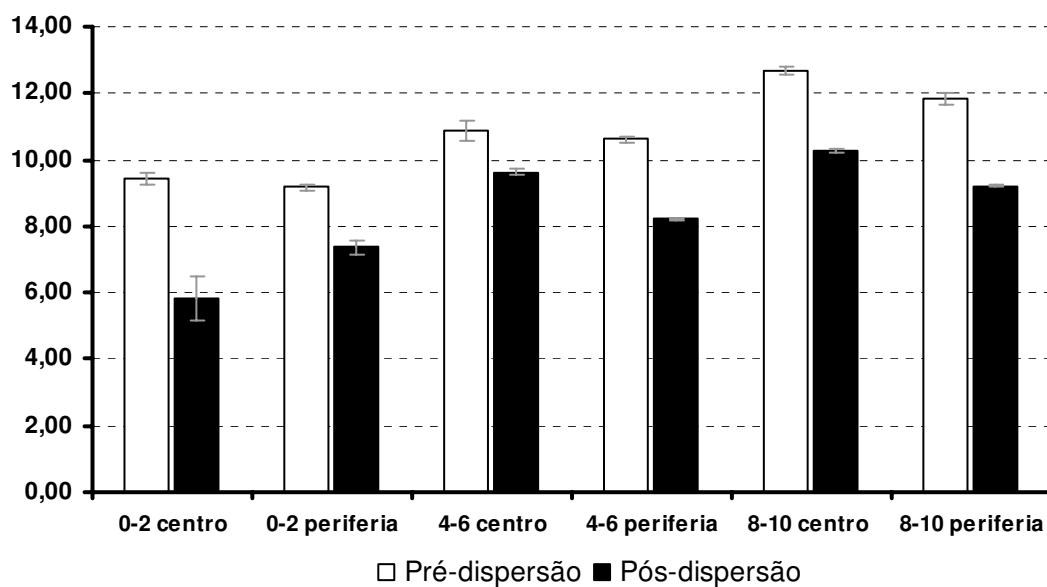


FIGURA 1. Gráfico demonstrativo da porcentagem de água existente nas diferentes porções da arena nos diferentes intervalos de tempo (antes da dispersão e pós-dispersão larval de indivíduos tratados com dieta artificial)

Tabela 1. Porcentagem de perda de água nas diferentes porções da arena (substrato alimentar – dieta artificial).

Porcentagem de perda de água (início/ fim)	
0-2 cm centro	38.39
0-2 cm periferia	19.60
4-6 cm centro	11.59
4-6 cm periferia	22.64
8-10 cm centro	18.70
8-10 cm periferia	22.04

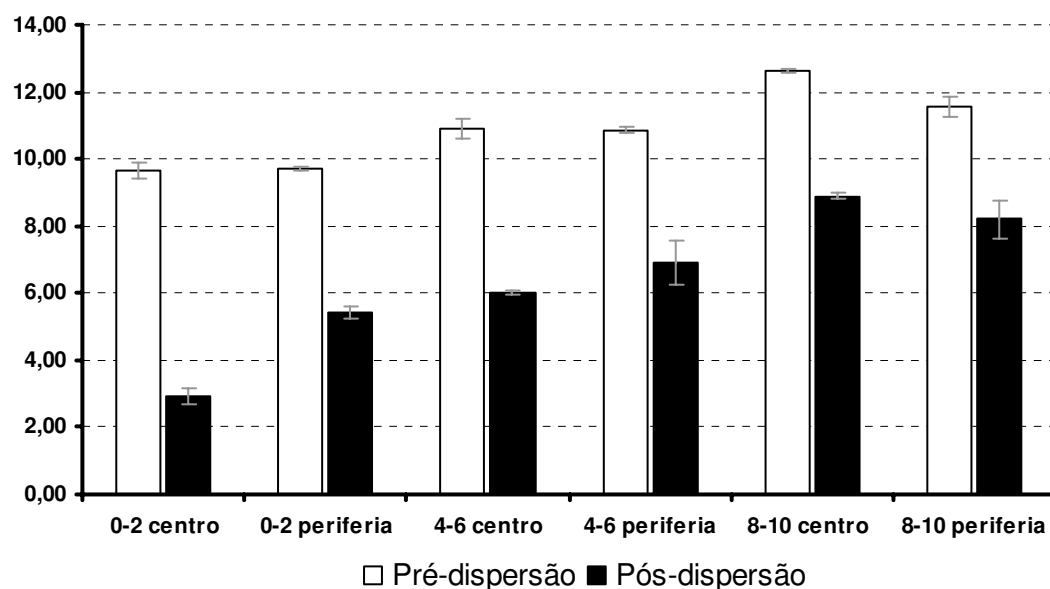


FIGURA 2. Gráfico demonstrativo da porcentagem de água existente nas diferentes porções da arena nos diferentes intervalos de tempo (antes da dispersão e pós-dispersão larval de indivíduos tratados com fígado de coelho)

Tabela 2. Porcentagem de perda de água nas diferentes porções da arena (substrato alimentar – Fígado).
Porcentagem de perda de água (início/ fim)

0-2 cm centro	69.73
0-2 cm periferia	44.17
4-6 cm centro	44.86
4-6 cm periferia	36.42
8-10 cm centro	29.41
8-10 cm periferia	28.88

Pode-se observar que após dois dias aproximadamente, tempo necessário para que as espécies (*Chrysomya megacephala* e *Musca domestica*) dispersassem e empupassem, a porcentagem de água existente nas diferentes porções das arenas sofrem grande mudança, o que já era de se esperar devido a processos de evaporação, tensão e inércia presentes no conjunto (Figura 1 e 2, Tabela 1 e 2). A região superficial das arenas foi a que sofreu maior perda de água, comparando-se o início e o final do processo de dispersão, pois esta porção está mais exposta às variações e condições ambientais do local do experimento (Tabela 1 e 2).

As regiões centrais obtiveram uma porcentagem de água um pouco maior quando comparadas com as porções periféricas (Figura 1 e 2). Entretanto, quando se analisou a

perda de água antes e pós-dispersão (Tabela 1 e 2), a maior diferença foi observada na porção Central 0-2 cm, tanto para dieta quanto para fígado, talvez pela capacidade do substrato alimentar (dieta e fígado) reter mais água que o substrato de pupação (areia). Desta forma o alimento “roubaria” água da areia, pois o mesmo era formado por matéria orgânica (fígado de coelho) ou de ágar (dieta oligídica), os quais possuem como característica a retenção de água. Além deste fator, ao mesmo tempo ocorreria a evaporação e inércia (através da força da gravidade) da água no substrato de pupação. Deste modo, esta região, sob o substrato alimentar, seria a que mais sofreria perda de água, confirmando os dados observados (Tabela 1 e 2). Estas observações poderão ser bastante importantes para melhor interpretação e compreensão da dispersão larval pós-alimentar da espécie, tratamentos realizados, substratos alimentares utilizados e emergência ou não dos adultos nas diferentes porções das arenas.

Assim, nos resultados obtidos e discutidos nos Capítulos 4, 5, 6 e 7, que englobam as duas espécies de interesse (*C. megacephala* e *M. domestica*) e as duas substâncias de interesse (Diazepam e Fipronil), pôde-se observar certa relação na preferência de escolha do sítio de pupação e na sobrevivência das pupas e conseqüente emergência dos adultos, discutidos a seguir.

Como foi observado nos Capítulos 4, 5, 6 e 7, houve uma baixa porcentagem na escolha do sítio de pupação, próximo à superfície (0 a 2 cm de profundidade) observando-se os tratamentos controle das espécies estudadas, local este que apresenta as menores porcentagens de água iniciais nos dois substratos alimentares usados (Figuras 1 e 2). Assim, a baixa umidade associada à grande intensidade luminosa na superfície poderiam diminuir a preferência das larvas para escolha deste local para pupação (GREENBERG, 1990). Em relação à profundidade, os intervalos de maior preferência para sítio de pupação nos tratamentos controle das duas espécies estudadas e nos diferentes substratos alimentares, foi entre 4 e 8 cm de profundidade, somando mais de 50% do total de pupas nesta porção da arena, porção esta que apresenta percentagem de água intermediária (Figura 1 e 2).

Já a sobrevivência das pupas pode estar relacionada com diversos fatores, dentre eles manipulação das mesmas durante partes da metodologia, a massa da pupa encontrada (VON ZUBEN *et al.*, 2000), e provavelmente também, perda de água na região escolhida como sítio de pupação pela espécie. Observando os dados de

profundidade de dispersão nos tratamentos controle das duas espécies, parece não haver uma relação clara entre a porcentagem de sobrevivência e a perda de água no substrato de pupação das areias (areia) durante o processo de dispersão larval (Tabela 1 e 2).

Já analisando a distância percorrida pelas larvas para a escolha do sítio de pupação, pode-se perceber uma preferência na escolha do intervalo de 6 a 12 cm de distância do centro nas duas espécies estudadas, porém esta não tão central. No entanto, pode-se perceber que a variação na porcentagem de água no solo é pequena quando analisamos região central e periferia, sendo que a maior variação ocorre em relação às profundidades (Figura 1 e 2). Assim, a sobrevivência nas diferentes distâncias parece não ter relação com a perda de água no solo quando se observa a sobrevivência de pupas nos diferentes intervalos de profundidade (Capítulos 4, 5, 6 e 7).

Assim, a perda de água parece não influenciar muito a mortalidade das pupas, talvez a massa que as larvas atingiram para poder empupar pode estar mais relacionada com a sobrevivência (VON ZUBEN *et al.*, 2000).

Referências Bibliográficas

- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.** 83: 1210-1214, 1990.
- VON ZUBEN, C. J.; STANGENHAUS, G.; GODOY, W.A.C.. Competição Larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Efeitos de Diferentes Níveis de Agregação Larval sobre Estimativas de Peso, Fecundidade e Investimento Reprodutivo. **Rev. Bras. Biol.**, 60 (2): 195-203, 2000.

CAPÍTULO 9

Discussão e consideração finais

O controle por meio de inseticidas de dípteros de importância econômica em geral, tem sido muito aplicado, pois, estes insetos podem causar danos econômicos à agricultura, e têm importância médico/veterinária por serem vetores de doenças (MARCONDES, 2001; PESSOA & MARTINS, 1988; STONEHOUSE *et al.*, 2004). O principal alvo de ação dos inseticidas tem sido o sistema nervoso, devido à alta eficácia e rápida resposta que proporcionam no controle de pragas (CASIDA & QUISTAD, 1998; LUND, 1985; MATSUMURA, 1985; WARE, 1989).

Além desta importância, as duas espécies observadas neste estudo, *Chrysomya megacephala* e *Musca domestica* apresentam importância forense, pois podem estar presentes (BYRD & CASTNER, 2001; SMITH, 1986; SUKONTASON *et al.*, 2004) se alimentando de cadáveres humanos durante seu estágio larval, podendo assim indicar o intervalo pós-morte (IPM), que envolve a dedução do intervalo de tempo mínimo e máximo entre a morte e a descoberta do corpo (CATTS & GOFF, 1992), dado de extrema importância nas investigações criminais.

A mosca-varejeira *C. megacephala*, assim como a *M. domestica*, utilizam-se de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos pelas fêmeas e para alimentação das larvas (HANSKI, 1987; PESCHKE *et al.*, 1987). O estágio larval é o principal período em que ocorre limitação de recursos alimentares em moscas-varejeiras (LOMINICKI, 1988), e a competição por esses recursos é geralmente do tipo exploratória (REIS *et al.*,

1994), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (ULLYETT, 1950). Após essa competição, as larvas começam a procurar por um sítio de pupação no habitat, ou por mais fonte de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, e esse processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG, 1990).

No entanto, caso haja a presença de alguma substância química no substrato de alimentação larval ou no substrato de dispersão, esta pode atuar sobre os indivíduos interferindo nos processos de transmissão neural, inibindo ou ativando os mensageiros químicos, causando mudanças fisiológicas, no desenvolvimento e no comportamento do organismo em contato com a mesma (HAYNES, 1988; OMOTO, 2000,), mudanças estas que podem prejudicar a estimativa do IPM (CATTS, 1992).

Os valores da média da massa das larvas no tratamento controle de *C. megacephala* foram maiores que o obtido em *M. domestica* (Capítulos 2 e 3), uma vez que o califorídeo estudado é maior que o muscídeo. No entanto, o efeito do Diazepam nas duas espécies foi semelhante, ou seja, as larvas que se alimentaram de substratos em que o ansiolítico estava presente tiveram menor ganho de massa por período de tempo. Desta forma, o benzodiazepínico alterou (diminuindo) o metabolismo larval nas duas espécies estudadas (Capítulos 2 e 3).

Na dispersão larval pós-alimentar das espécies, os tratamentos em que as larvas se desenvolveram na presença de Diazepam puderam ser diferenciados do controle e entre si. A distância e a profundidade percorridas pelas larvas foram menores que as obtidas no controle na maioria dos tratamentos observados (Capítulos 4 e 5). Tal redução na atividade dinâmica das larvas no comportamento de dispersão pode ser explicada pela redução do metabolismo larval que foi observada nos Capítulos 2 e 3.

Assim, a modificação no padrão de dispersão larval pode ter relação com uma diminuição na atividade dinâmica do agregado larval, causada por mudanças fisiológicas nas larvas em função do benzodiazepínico presente no meio, tendo em vista sua provável atuação sobre o sistema GABAérgico destes insetos. Os benzodiazepínicos agem interagindo com receptores de neurotransmissores inibitórios diretamente ativados pelo GABA (GOODMAN & GILMAN, 2003). Neste caso, podem potencializar a ação dos neurotransmissores GABA, atuando sobre os receptores GABA_A, ou seja, ocorre um maior influxo de íons cloro para o neurônio pós-sináptico, dificultando assim sua

despolarização e conseqüentemente, causando uma diminuição da velocidade de transmissão do impulso neural, o que deprime o sistema nervoso central (GOODMAN & GILMAN, 2003; ROGAWSKI & LOSCHER, 2004).

Os benzodiazepínicos, entre eles o Diazepam, têm efeito sobre o sistema nervoso central em humanos, podendo causar: sedação, hipnose, diminuição da ansiedade, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e atividade anticonvulsivante, além de vasodilatação coronária e bloqueio neuromuscular em doses muito altas (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Este modo de ação dos benzodiazepínicos pode ter causado uma diminuição do metabolismo larval e conseqüentemente uma menor atividade dinâmica do agregado larval em ambos os substratos alimentares (dieta artificial e fígado de coelho), acarretando uma alteração no comportamento de dispersão larval pós-alimentar, como é observado na distribuição das pupas nas arenas D e 2D, nas duas espécies (Capítulos 4 e 5), arenas que se diferenciaram significativamente do controle.

Esta redução do metabolismo pode ser observada nos dados dos Capítulos 2 e 3, em que a presença de Diazepam alterou o padrão de desenvolvimento larval de *C. megacephala*, e *M. domestica*, retardando o ganho de massa por tempo de forma proporcional à dose utilizada, ou seja, quanto maior a dose maior o retardo no desenvolvimento. Assim, a droga altera o tempo requerido para o desenvolvimento larval, podendo gerar erros na estimativa do IPM, ao se utilizar técnicas/métodos entomológicos, caso não seja levada em conta a presença desta droga.

Já o inseticida Fipronil, age sobre o sistema receptor do ácido γ -aminobutírico (GABA) do tipo A dos insetos (KIDD & JAMES, 1991), bloqueando os canais de cloro nos neurônios. Assim, o efeito é a remoção da inibição neural pelo GABA, resultando em uma atividade neuronal excessiva (KIDD & JAMES, 1991). Em uma dose suficiente, o Fipronil causa excessiva excitação neural, paralisia severa e morte do inseto (BOBE *et al.*, 1998). A análise da dispersão das larvas em contato com substratos de dispersão (areia) com a presença deste inseticida, causou alterações na dispersão larval das larvas das duas espécies estudadas, comparadas ao controle e entre as diferentes doses utilizadas (Capítulos 6 e 7).

Pode-se observar que quanto maior a dose de Fipronil utilizada menor a quantidade de pupas encontradas e maior o número de larvas mortas (Capítulo 6 e 7).

Esta modificação no número total de pupas encontradas pode ter influência na dispersão larval pós-alimentar, pois já foi observado que a dispersão larval pós-alimentar de moscas varejeiras sofre influência do efeito da vizinhança na escolha do local de pupação, em *C. megacephala* e *C. putoria* (BOLDRINI *et al.*, 1997). Assim, as larvas provavelmente sofreram influência do inseticida no comportamento e metabolismo, e também do efeito da vizinhança, sendo que as réplicas e tratamentos responderam de diferentes formas à mortalidade de indivíduos. Desta forma, a dispersão larval nos tratamentos com Fipronil variou devido provavelmente à forma com que estes fatores atuaram sobre os indivíduos e a sensibilidade dos mesmos às doses.

Pode-se observar que os tratamentos D/2 e F/2 responderam de forma diferente ao observado nas doses maiores. Tal diferença provavelmente se deve, no caso do inseticida utilizado, a efeito subletais da droga no comportamento (HAYNES, 1988), e ao número de dados obtidos ser maior que os encontrados nas maiores doses.

Na análise do desenvolvimento larval, que foi baseada na massa das larvas nos diferentes intervalos de tempo, foi possível diferenciar os valores entre os tratamentos e em relação ao controle. Esta variável observada (massa) sofreu grande influência da substância utilizada nas duas espécies (Capítulos 2 e 3), e do substrato alimentar, no caso de *C. megacephala* (Capítulo 2). Já nos experimentos de dispersão as massas das pupas sofreram também grande influência das substâncias utilizadas e doses.

Nos tratamentos com Diazepam, as massa das pupas de *M. domestica* encontradas apresentaram menores massas em 2D comparadas ao controle; já na espécie *C. megacephala*, a análise da massa foi bastante diferenciada entre as réplicas nos diferentes tratamentos, sendo que em algumas 2D foram maiores e em outros casos, o controle. Desta forma, a alteração da massa das pupas em contato com Diazepam não teve um padrão no califórideo; já no muscídeo, foi observado que a dose de Diazepam em 2D reduziu a massa das pupas (Capítulos 4 e 5).

Já com relação a variação da massa das pupas nos experimentos com Fipronil, pode-se observar um padrão: quanto maior a dose, menor a massa das pupas (Capítulos 6 e 7). Tal efeito pode ser explicado por um aumento metabólico que o inseticida causa nas larvas.

Assim, os dados obtidos (profundidade, distância e massa) sofreram influência do tratamento e da réplica dependendo da espécie e substância utilizada.

A análise dos dados de dispersão larval das duas espécies mostrou que a variável profundidade de enterramento das larvas foi mais afetada pelos tratamentos que a variável distância. Assim seria interessante em estudos posteriores a confecção de arenas com profundidades superiores a 10 cm, pois GOMES, *et al.* (2005) observaram larvas de *C. megacephala* e *C. albiceps* em profundidades bem maiores.

Pode-se observar em todas as análises realizadas, que as substâncias utilizadas alteraram o padrão desenvolvimento larval e de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* e *M. domestica* nos diferentes tratamentos realizados.

CONCLUSÕES FINAIS

- Os resultados do presente estudo mostraram que o Diazepam altera o padrão de desenvolvimento larval de *C. megacephala* e de *M. domestica*, retardando o ganho de massa por tempo. Assim, altera o tempo requerido para o desenvolvimento larval, podendo gerar erros na estimativa do IPM, ao se utilizar técnicas/métodos entomológicos, caso não seja levada em conta a presença desta droga.

- Os resultados do presente estudo mostraram que o Diazepam altera o padrão do comportamento de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* e *M. domestica*, diminuindo em geral a distância e a profundidade na escolha do sítio de pupação, quando comparado com o controle. No entanto, dependendo da dose e réplica consideradas a distância pode ser maior ou menor que a do controle, podendo ser influenciada pelo efeito da vizinhança, da massa e alteração sensorial pelas diferentes doses de ansiolítico.

- Pode-se constatar que todas as variáveis observadas nos tratamentos com Fipronil sofreram alteração, diferindo do padrão de dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* e de *M. domestica* no tratamento controle. As larvas em contato com o inseticida apresentaram uma grande mortalidade na medida em que se aumentava a dose do Fipronil nos diferentes tratamentos, mostrando ser este inseticida eficaz no controle

das formas imaturas destas moscas. Desta forma, de acordo com os resultados observados nas variáveis profundidade, distância e massa, o inseticida provavelmente causou mudanças fisiológicas e consequentemente comportamentais nas larvas em contato com o Fipronil, atuando assim no metabolismo (aumento metabólico – redução na massa e alteração da distância percorrida nos tratamentos) e percepção sensorial do meio na escolha de um sítio de pupação (efeito da vizinhança e distância mínima entre pupas). Sendo assim, foram observadas diferenças nos mesmo tratamentos em diferentes réplicas, devido à mortalidade ter sido diferente e assim, com influência na dispersão.

Referências Bibliográficas

- BOBE, A., COOPER, J., COSTE, C.M., & MARIE-ANNE MULLER. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. **Pestic. Sci.** 52, 275-281, 1998.
- BOLDRINI J. L., BASSANEZI, R. C., MORETTI, A.C., VON ZUBEN, C. J. GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **J. Theor. Biol.**, 185: 523-531, 1997.
- BYRD, J.H., CASTNER J.L. **Insects of forensic importance.** In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Florida, p.43– 79, 2001.
- CASIDA, J. E. & QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present and future? **Ann. Rev. Entomol.**, 43: 1-16, 1998.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.
- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- GOMES, L.; SANCHES, M. R. & VON ZUBEN, C. J. Dispersal and Burial Behavior in Larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). **J. Insect Behavior**, 18(2): 281-292, 2005.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **Goodman e Gilman; as bases farmacológicas da terapêutica.** 10.ed., Rio de Janeiro:Mc-Graw-Hill, p. 1647, 2003.

- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am.**: 83: 1210-1214, 1990.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol.**, 12: 257-266, 1987.
- HAYNES, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol.**, 33: 149-168, 1988.
- LUND, A. E. Insecticides: effects on the nervous system. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**, Pergamon Press, New York, vol. 12, p. 9-56, 1985.
- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MATSUMURA, F.. **Toxicology of insecticides**. Plenum Press, New York, 598p., 1985.
- OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. **In: Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.
- PESCHKE, K.; KRAPF, D. & FULDNER, D. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. **Zool. Jb. Syst.**, **114**: 241-265, 1987.
- PESSÔA, S. B. & MARTINS A. V. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara, 11ª edição, Rio de Janeiro, p. 872, 1988.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- STONEHOUSE, J., MUMFORD, J., POSWAL, A. MAHMOOD, R., MAKHDUM, A. H., CHAUDHARY, Z. M., BALOCH, K. N., MUSTAFA, G. & MCALLISTER, M. The accuracy and bias of visual assessments of fruit infestation by fruit flies (Diptera: tephritidae). **Crop Protection**, 23: 293–296, 2004.
- SUKONTASON, K., SUKONTASON, K. L., PIANGJAI, S., BOONCHU, N., KURAHASHI, H., HOPE, M. & OLSON, J. K. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. **Micron**, 35: 391–395, 2004.
- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 234 B: 77-174, 1950.

WARE, G. W. **The pesticide book**. Thompson Publication, Fresno, 340p, 1989.

LITERATURA CITADA

A

- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitosanitários, **Consulta de Produtos Formulados**, Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/!ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=5197&p_tipo_janela=NEW>.
Acesso em: 03 jul 2006.
- ALUNNI-PERRET, V., OHAYON, P., DUVAL, H.P. & QUATREHOMME, G. Acute fatal poisoning with cyamemazine. **Forensic Sci. Int.**, 137: 13-15, 2003.
- ARNALDOS, I; ROMERA E.; GARCÍA, M. D. & LUNA, A. An initial study on the succession of sarcosaprophagous Diptera (Insecta) on carrion in the southeastern Iberian peninsula. **Int. J. Legal Med.** 114: 156–162, 2001.

B

- BARBONE, F.; MCMAHON, A.D.; DAVEY, P.G.; MORRIS, A.D.; REID, I.C.; MCDEVITT, D. G.; MACDONALD, T.M. Association of road-traffic accidents with benzodiazepine use. **The Lancet**, 532: 1331-1336, 1998.
- BASSANEZI, R. C., LEITE, M. B. F., GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, C. J., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F.. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). **Mem. Inst. O. Cruz**, 92(2): 281-286, 1997.
- BECKEL, H., LORINI, I. & LAZZARI, S. M. N. Comportamento de adultos de diferentes raças de *Rhyzopertha dominica* (Fabricius) (Coleoptera, Bostrichidae) em superfície tratada com deltamethrin. **Revta. Bras. Entomol.**, 48(1): 115-118, 2004.
- BERMAN M.E., WALLEY J.C. Imitation of self-aggressive behavior: an experimental test of the contagion hypothesis. **J. Appl. Soc. Psychol.**, 5: 1036–1057, 2003.
- BERMAN, M. E.; JONES, G. D. & MCCLOSKEY, M. S. The effects of diazepam on human self-aggressive behavior. **Psychopharmacology**, 178: 100-106, 2005.
- BOBE, A., COOPER, J., COSTE, C.M., & MARIE-ANNE MULLER. Behavior of Fipronil in Soil under Sahelian Plain Field Conditions. **Pestic. Sci.** 52, 275-281, 1998.
- BOBE, A., COSTE, C.M., & J. COOPER. Factors Influencing the Adsorption of Fipronil on Soils. **J. Agric. Food Chem.** 45, 4861-4865, 1997.
- BOLDRINI J. L., BASSANEZI, R. C., MORETTI, A.C., VON ZUBEN, C. J. GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, F. J., REIS, S. F. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. **J. Theor. Biol.**, 185: 523-531, 1997.

- BOND, A.J. Drug-induced behavioural disinhibition: incidence, mechanisms and therapeutic implications. **CNS Drugs**, 9:41–57, 1998.
- BOUREL, B., G. TOURNEL, V. HEDOUIN & D. GOSSET. Entomofauna of buried bodies in Northern France. **Int. J. Legal Med.**:118, 2004.
- BOUREL, B., TOURNEL, G., HEDOUIN, V., DEVEAUX, M., GOFF, M. L. & GOSSET, D. Morphine extraction in necrophagous insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. **Forensic Sci. Int.**, 120, 127-131, 2001.
- BURALLI, G. M. & GUIMARÃES, J. H. Controle de *Musca domestica* Linnaeus (Diptera, Muscidae) em área de manejo de vinhaça (Macatuba, São Paulo, Brasil). **Rev. Bras. Zool**, 3(1): 1-6, 1985.
- BYRD, J.H., CASTNER J.L. **Insects of forensic importance**. In: Byrd JH, Castner JL (eds) Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC Press, Florida, p.43– 79, 2001.

C

- CAMPOBASSO, C. P.; GHERARDI, M.; CALIGARA, M.; SIRONI, L.; INTRONA, F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. **Int. J. Legal Med.** 118: 210-214, 2004.
- CANGELOSI, A. & PARIS, D. The processing of verbs and nouns in neural networks: Insights from synthetic brain imaging. **Brain and Language**: 89: 401–408, 2004.
- CARMENA, J. M., LEBEDEV, M. A., CRIST, R. E., O'DOHERTY, J. E., SANTUCCI, D. M., DIMITROV, D. F., PATIL, P. G., HENRIQUEZ, C. S. & NICOLELIS, M. A. L. Learning to control a brain-machine interface for reaching and grasping by primates. **Plos Biol.**, 1(2): 1-16, 2003.
- CARVALHO, C. J.; B. **Muscidae (Diptera) of Neotropical Region – Taxonomy**. Ed. UFPR, Curitiba, p.287, 2002
- CARVALHO, L. M. L., LINHARES A. X. & TRIGO J. R. Determination of drug levels and effects of diazepam on the growth of necrophagous flies of forensic importance in southeasten Brazil. **Forensic Sci. Int.**, 120: 140-144, 2001.
- CASIDA, J. E. & QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: Past, present and future? **Ann. Rev. Entomol.**, 43: 1-16, 1998.
- CATTS, E P. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **J. Agric. Entomol.**, 9 (4): 245-255, 1992.

- CATTS, E. P. & GOFF, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 253-272, 1992.
- CAYRE, M., MALATERRE, J. SCOTTO-LOMASSESE, S., STRAMBI, C. & STRAMBI, A. The common properties of neurogenesis in the adult brain: from invertebrates to vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol.**, 132: 1-15, 2002.
- CHAPMAN, R. F. **The Insects: Structure and Function**. Cambridge University Press, 4th edition, Cambridge, p.770, 1998.
- CHAREONVIRIYAPHAP, T; SUNGVORNYOTHIN, S; RATANATHAM, S; PRABARIPAI A Insecticide-induced behavioral responses of *Anopheles minimus*, a malaria vector in Thailand. **J. Am. Mosquito Control**: 17 (1): 13-22, 2001.
- CLARK, K.; EVANS, L. AND WALL. R.. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. **Forensic Sci. Int.**, 156 (2-3): 145-149, 2006.
- CONACHER, G. & WORKMAN, D. Violent crime possibly associated with anabolic steroid use. **Am. J. Psych.**, 146: 679, 1989.

D

- DALLE, K. & COLLET, T. S. Using artificial evolution and selection to model insect navigation. **Cur. Biol.**, v.11 (17), p.1305-1316, 2001.
- DE CHATEAU P. Mortality and aggressiveness in a 30-year follow-up study in child guidance clinics in Stockholm. **Acta Psych. Scand.**, 81: 472-476, 1990.
- DE LETTER, E. A., CLAUWAERT, K. M., LAMBERT, W. E., VAN BOCXLAER, J. F., DE LEENHEER, A. P., PIETTE, M. H. Distribution study of 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine in a fatal overdose. **J. Anal. Toxicol.**, 26 (2): 113-118, 2002.
- DESNEUX, N., RAFALIMANANA, H. & KAISER, L. Dose-response relationship in lethal and behavioural effects of different insecticides on the parasitic wasp *Aphidius ervi*. **Chemosphere**, 54: 619-627, 2004.
- DIETCH J.T.; JENNINGS, R.K. Aggressive dyscontrol in patients treated with benzodiazepines. **J. Clin. Psychiatry**, 49:184-188, 1988.
- DUHAM, E. W., SCHARF, M. E. & SIEGFRIED, B. D.. Toxicity and Neurophysiological Effects of Fipronil and Its Oxidative Sulfone Metabolite on European Corn Borer Larvae (Lepidoptera: Crambidae). **Pest. Biochem. Physiol.**, 71: 97-106, 2001.

E

- ERMENTROUT, G. B. & EDELSTEIN-KESHET, L. Cellular automata approaches to biological modeling. **J. Theor. Biol.**, 160: 97-133, 1993.

F

- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA, G.K. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. **Revta. Microbiol.**, 15(3): 170-174, 1984.

G

- GARDNER, D.L & COWDRY R.W. (1985) Alprazolam-induced dyscontrol in borderline personality disorder. **Am. J. Psychiatry**, 142: 98–100, 1985.
- GEORGHIOU, G. P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G. P., SAITO, T. (eds), **Pest resistance to pesticides**. Plenum, New York, p. 769-792, 1983.
- GODOY, W. A.C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L., RIBEIRO, O. B. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **J. Appl. Entomol.**, 119: 263-266, 1995.
- GODOY, W. A.C., REIS S. F., VON ZUBEN, C. J. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. **J. Appl. Entomol.**, 120(4): 423-426, 1996.
- GOFF M.L., MILLER M.L., PAULSON J.D., LORD W.D., RICHARDS E., OMORI A.I.. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficornis* (Diptera:Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae, and puparia. **J. Forensic Sci.**, 42(2): 276-80, 1997.
- GOFF, M. L., BROWN, W. A., OMORI, A. I. & LAPOINTE, D. A. Preliminary observations of effects of amitriptyline in decomposing tissues on the development of *Parasarcophaga ruficollis* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect to estimation of post mortem interval, **J. Forensic Sci.**, 38: 316-322, 1993.
- GOFF, M.L. & W.D. LORD. Entomotoxicology: A new area for forensic investigation. **Am. J. Forensic Med. Pathol.**, 15: 51-57, 1994.

- GOMES, L.; SANCHES, M. R. & VON ZUBEN, C. J. Dispersal and Burial Behavior in Larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). **J. Insect Behavior**, 18(2): 281-292, 2005.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & GOVONE, J. S. Comportamento de dispersão larval radial pós alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. **Entomol. Vect.**, 9: 115-132, 2002.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 47: 229- 234, 2003.
- GOMES, L; GODOY, W. A. C. & VON ZUBEN, C. J. A review of postfeeding larval dispersal in blowflies: implication for forensic entomology, **Naturwissenschaften**, 93: 207-215, 2006.
- GOODMAN, L.S., GILMAN, A. **Goodman e Gilman; as bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed., Rio de Janeiro:Mc-Graw-Hill, p. 1647, 2003.
- GREENBERG, B. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and Muscidae (Diptera). **Ann. Entomol. Soc. Am**: 83: 1210-1214, 1990.
- GREENBERG, B. **Flies and disease. Biology, disease transmission**. New Jersey : Univ. Press. Princeton. v. 2, 1973.
- GREENBERG, B. **Flies and Disease. Classification and Biotic Associations**, Princeton University, New Jersey, p. 856, 1971.
- GRENN, A. A. The control of blowflies infesting slaughter-houses. I. Field observations of habits of blowflies. **Ann. Appl. Biol.**, 38: 475, 1951.
- GROSSBERG, S., GOVINDARAJAN, K. K., WYSE, L. L. & COHEN, M. A. Artstream: a neural network model of auditory scene analysis and source segregation. **Neur. Net.**, 17: 511-536, 2004.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). **Revta. Bras. Zool.**, 1 (4): 239-416, 1983.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., BURALLI, G.M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 23 (4): 245-255, 1979.
- GUIMARÃES, J.H., PRADO, A. P., LINHARES, X. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revta. Bras. Ent.**, 22(1): 53-60, 1978.

H

- HALL R.C.W., ZISOOK S.. Paradoxical reactions to benzodiazepines. **Br. J. Clin. Pharmacol**, 11: 45–49, 1981.
- HANSKI, I. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. **Ecol. Entomol**, 12: 257-266, 1987.
- HAYNES, K.F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Ann. Rev. Entomol**, 33: 149-168, 1988.

I

- ILACHINSKI, A. “**Cellular Automata: A Discrete Universe**”, World Scientific, 2001
- IMBIRIBA, A. S., IZUTANI, D.T., MILHORETO, I.T., LUZ, E. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). **Arq. Biol Tecnol.**, 20: 35-39, 1977.
- INTRONA, F., C.P. CAMPOBASSO & M.L. GOFF. Entomotoxicology. **Forensic Sci. Int.** 120: 42-47, 2001.
- IRELAND, S. & TURNER, T. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. **Forensic Sci. Int.**, 2006 (in press).

K

- KAMAL, A. S., Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) I. Bionomics. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, 51: 261-271, 1958.
- KANESHRAJAH, G. & TURNER, B.D. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. **Int. J. Legal Medic.**, 118: 242–244, 2004.
- KIDD, H., & D. JAMES, **The Agrochemicals Handbook**, Third Edition. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.
- KIM, S. P., SANCHEZ, J. C., ERDOGMUS, D., RAO, Y. N., WESSBERG, J., PRINCIPE, J. C. & NICOLELIS, M. Divide-and-conquer approach for brain machine interfaces: nonlinear mixture of competitive linear models. **Neur. Net.**, 16: 865–871, 2003.

L

- LAURENCE, B. R. Geographical expansion of the range of *Chrysomya* blowflies. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 75: 130-131, 1981.

- LEAL, T.T.S.; PRADO, A.P. & ANTUNES, A. J. Rearing the larvae of blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wiedemam) (Diptera: Calliphoridae) on oligidic diets. **Rev. Bras. Zool.**, 1: 41 – 44, 1982.
- LEGNER, E. F. & MCCOY, C. W. The house fly *Musca domestica* Linnaeus as an exotic species in the Western Hemisphere incites biological control studies. **Can. Entomol.**, 98(3): 243-248, 1966.
- LESTER, D. Case consultation: diffusion of responsibility in the care of a difficult patient. **Suicide Life Threat Behav.**, 25: 415–421, 1995.
- LEVINE, O. S. & LEVINE, M. M. Houseflies (*Musca domestica*) as mechanical vectors of Shigellosis. **Infect. Immun.**, 31: 445-452, 1991.
- LEVOT, G.W., BROWN, K. R., SHIPP, E. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. **Bull. Entomol. Res.**, 69: 469-475, 1979.
- LINHARES, A.X.. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in the laboratory. **Rev. Bras Entomol.**, 32: 383-392, 1988.
- LOMNICKI, A.. **Population ecology of individuals**. Princeton: Princeton Press, 233 p., 1988.
- LOPES DE CARVALHO, L. M. & LINHARES, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decompositon in a natural forest area in southeastern Brazil, **J. Forensic Sci.**, 46 (3): 604-608, 2001.
- LUND, A. E. Insecticides: effects on the nervous system. In: KERKUT, G. A., GILBERT, L. I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**, Pergamon Press, New York, vol. 12, p. 9-56, 1985.

M

- MARCONDES, C. B. **Entomologia Médica e Veterinária**, Editora Atheneu, São Paulo, p. 432, 2001.
- MARICONI, F. A. M., GUIMARÃES, J. H. & BERTI-FILHO, E. A mosca domestica e algumas outras moscas nocivas. FEALQ, Piracicaba, p. 135, 1999.
- MATHENGE, EM; GIMNIG, JE; KOLCZAK, M; OMBOK M, IRUNGU LW, HAWLEY WA. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. **J. Med. Entomol.**, 38 (4): 531-536, 2001.
- MATSUMURA, F.. **Toxicology of insecticides**. Plenum Press, New Cork, 598p., 1985.

MICOZZI, M. S. Experimental study of postmortem change under field conditions: effects of freezing, thawing and mechanical injury. **J. Forensic Sci.**, 36: 1732 – 1735, 1991.

N

NEUTEL, C. I. & PATTEN, S. B. Risk of suicide attempts after benzodiazepine and/or antidepressant use. **AEP**, 7 (8): 568-574, 1997.

NICOLELIS, M. A. L. Brain-machine interfaces to restore motor function and probe neural circuits. **Nature Neuroscience**, 4: 417-422, 2003.

NIOSH (National Institute for Occupation and Safety and Health - USA). **The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances**. Na Internet <<http://www.cdc.gov/niosh/homepage.html>> Acesso em: 10 dez 2004.

NOLTE, K.B., R.D. PINDER & W.D. LORD. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. **J. Forensic Sci.**, 37: 1179-1185, 1992.

NUORTEVA, P. Sarcosaprophagous insects as forensic indicators. In: **Forensic Medicine: a study in trauma and environmental hazards**. Volume 2: Physical Trauma. Tedeschi, C.G., Eckert, W.G. and Tedeschi, L.G. (Eds) W.B. Saunders Company: London, p.1072-1095, 1977.

NUORTEVA, P.; SCHUMANN, H.; ISOKOSKI, M. & LAIAHO, K. Studies on the possibilities of using blowflies (Diptera: Calliphoridae) as medicolegal indicators in Finland. **Ann. Ent. Fenn.**, 40: 70-74, 1974.

O

O'BRIEN, C., B. TURNER. Impact of paracetamol on the development of *Calliphora vicina* larval development. **Int. J. Legal Med.**, 118: 188-189, 2004.

OMOTO, C. Modo de Ação de Inseticidas e Resistência de Insetos a Inseticidas. In: **Bases e Técnicas do Manejo de Insetos**, ed. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria, v.1, p. 31-49, 2000.

P

PARRISH, J. K. & EDELSTEIN-KESHETZ, L.. Complexity, Pattern, and Evolutionary Trade-Offs in Animal Aggregation. **Science**, 284: 99-101, 1999.

PESCHKE, K.; KRAPF, D. & FULDNER, D. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. **Zool. Jb. Syst.**, 114: 241-265, 1987.

- PESSÔA, S. B. & MARTINS A. V. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara, 11ª edição, Rio de Janeiro, p. 872, 1988.
- PIEN K, PIPELEERS-MARICHAL M, GROOTAERT P, DE BOECK G, SAMYN N, BOONEN T, VITS K, WOOD M Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. **Int. J. Legal Med.**, 118 (4): 190-193, 2004.
- POPE, H. & KATZ, D. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. **Arch. Gen. Psychiatry**, 51: 375-381, 1994.
- PUTMAN, R. J. Dynamics of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*, within carrion. **J. Anim. Ecol.**, 46: 853-866, 1977.

R

- REIS, S.F.; G. STANGENHAUS, W.A.C. GODOY, C.J. VON ZUBEN & O.B. RIBEIRO. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). **Rev. Bras. Ent.**, 38: 33-34, 1994.
- ROBERTS, DR; ALECRIM, WD; HSHIEH, P; GRIECO JP, BANGS M, ANDRE RG, CHAREONVIRIPHAP T A probability model of vector behavior: Effects of DDT repellency, irritancy, and toxicity in malaria control. **J. Vector. Ecol.**, 25 (1): 48-61, 2000.
- ROGAWSKI, M. A. & LOSCHER, W.. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews: Neuroscience**, 5: 553-564, 2004.

S

- SACCÁ, G. Comparative bionomics in the genus *Musca*. **Ann. Rev. Entomol.**, 9:341-358, 1964.
- SADLER, D. W., FUKU, C., COURTE, F. & POUDE, D, J. Drug accumulation and elimination in *Calliphora vicina* larvae. **Forensic Sci. Int.**, 71: 191-197, 1995.
- SADLER, D; ROBERTSON, L; FUKU, C.; POUNDER, D.J. Barbiturates and analgesics in *Calliphora vicina* larvae. **J. Forensic Sci.**, 42: 481-485, 1997.
- SAS Institute Inc., **SAS User's Guide: Statistics**, Version, 8th Edition, Cary, NC, USA, 2001.
- SHIOTA, H., NAKASHIMA, M., TERAZONO, H., SASAKI, H., NISHIDA, K., NAKAMURA, J. & TANIYAMA, K. Postmortem changes in tissue concentrations of triazolam and diazepam in rats. **Legal Medicine**, 6(4): 224-232, 2004.

- SILVA, H. S. & MARTINS, M. L.. A cellular automata model for cell differentiation. **Physica A**, 322: 555 – 566, 2003.
- SKIDMORE, P. The biology of the Muscidae of the world. **Series Entomol.**, 29: 550p, 1985.
- SMITH, K. E.; WALL, R.; HOWARD, J. J.; STRONG, L.; MARCHIONDO, A. A. & JEANNIN, PH. In vitro insecticidal effects of fipronil and b-cyfluthrin on larvae of the blowfly *Lucilia sericata*. **Vet. Parasitol.**, 88: 261–268, 2000.
- SMITH, K.G.V. **A manual of forensic entomology**. Cornell University Press, NY, 1986.
- STONEHOUSE, J., MUMFORD, J., POSWAL, A. MAHMOOD, R., MAKHDUM, A. H., CHAUDHARY, Z. M., BALOCH, K. N., MUSTAFA, G. & MCALLISTER, M. The accuracy and bias of visual assessments of fruit infestation by fruit flies (Diptera: tephritidae). **Crop Protection**, 23: 293–296, 2004.
- SUKONTASON, K., SUKONTASON, K. L., PIANGJAI, S., BOONCHU, N., KURAHASHI, H., HOPE, M. & OLSON, J. K. Identification of forensically important fly eggs using a potassium permanganate staining technique. **Micron**, 35: 391–395, 2004.
- SUNGVORNYOTHIN, S; CHAREONVIRIYAPHAP, T; PRABARIPAI, A; THIRAKHUPT V, RATANATHAM S, BANGS MJ. Effects of nutritional and physiological status on behavioral avoidance of *Anopheles minimus* (Diptera: Culicidae) to DDT, deltamethrin and lambdacyhalothrin. **J. Vector Ecol.**, 26 (2): 202-215, 2001.
- SZARA, S. I. & LUDFORD, J. P. **Benzodiazepines: A Review of Research Results**. NIDA Research Monograph, p.101, 1980.

T

- TEWS, J., MOLONEY, K. & JELTSCH, F. Modeling seed dispersal in a variable environment: a case study of the fleshy-fruited savanna shrub *Grewia flava*. **Ecol. Model.**, 175: 65–76, 2004.

U

- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. **Phil. Trans. R. Soc. Lond.**, 234 B: 77-174, 1950.
- UNIVERSITY OF MINNESOTA, Radcliffe.s Integrated Pest, Management. <[http://ipmworld.umn.edu / chapters/ware.htm](http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm)>, Acesso em: 10 jan 2006.

V

- VON KEYSERLINGK, H. C.. The significance of behaviour studies in insecticide research. **Pestc. Sci.** 16: 558-559, 1985.

- VON ZUBEN, C. J. **Competição larval e efeitos sobre a dinâmica populacional de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae)**. Tese de Doutorado, UNESP, Rio Claro, p. 132, 1995.
- VON ZUBEN, C. J. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, 4: 525-533. 1998.
- VON ZUBEN, C. J.; R. C. BASSANEZI; S. F. REIS; W. A. C. GODOY & F. J. V. ZUBEN. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. **J. Applied Entomol.**, 120 (3): 379-382, 1996.
- VON ZUBEN, C. J.; STANGENHAUS, G.; GODOY, W.A.C.. Competição Larval em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Efeitos de Diferentes Níveis de Agregação Larval sobre Estimativas de Peso, Fecundidade e Investimento Reprodutivo. **Rev. Bras. Biol.**, 60 (2): 195-203, 2000.

W

- WARE, G. W. **The pesticide book**. Thompson Publication, Fresno, 340p, 1989.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. **Bull. Entomol. Res.**, 82: 133-137, 1992.
- WOLFRAM, S., **Cellular Automata and Complexity – Collected Papers**, Addison-Wesley Publishing Company, 1994
- WOODS, J. H. Problems and opportunities in regulation of benzodiazepines, **J. Clin. Pharmacol.**, 38: 773-782, 1998.
- WOODS, J. H., Katz, J. L. & Winger, G. Benzodiazepines: Use, Abuse, and Consequences. **Pharmacol. Rev.**, 44(2): 151-347, 1992.
- WORTON, B.J. Kernel Methods for Estimating the Utilization Distribution in Home-Range Studies, **Ecology**, 70(1):164-168, 1989.

Z

- ZDÁREK, J. VERLEYEN, P. MARES, M. DELECKOVÁ, L. & NACHMAN R.. Comparison of effects of pyrokinins and related peptides indentified from arthropods on pupariation behaviour in flesh fly (*Sarcophaga bullata*) larvae (Diptera: Sarcophagidae). **J. Ins. Physiol.**, 50: 233-239, 2004.

- ZIV, Y. The effect of habitat heterogeneity on species diversity patterns: a community-level approach using an object-oriented landscape simulation model (SHALOM). **Ecological Modelling**, 111: 135–170, 1998.
- ZUMPT, F.. **Myiasis in man and animals in the Old World**. London: Butterworths, 267 p, 1965.