

RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pré-textuais não incluídas pelo(a) autor(a) no arquivo original.

RESUMO

Um dos principais propósitos da investigação de fenômenos em qualquer área de atuação é encontrar uma forma adequada de representação dos processos envolvidos que seja o mais simples possível. O estudo da auto-organização em agregados de organismos biológicos não pode fugir a este propósito, e foi realizado aqui em três etapas: experimentação, modelagem e validação. A experimentação vai permitir definir claramente os padrões de comportamento a serem analisados e interpretados. A modelagem irá recorrer a estratégias espaço-temporais para a síntese de explicações matemáticas, para as interações e modos de agir dos organismos. Finalmente, a validação estará baseada em simulações computacionais, comparações com os resultados experimentais e interpretação paramétrica dos modelos resultantes. Foi predominante junto ao processo de modelagem o uso apenas das informações provenientes das observações realizadas e dados experimentais coletados, caracterizando uma abordagem de modelagem *bottom-up*, em detrimento da incorporação de hipóteses intuitivas a respeito dos mecanismos envolvidos, procedimento típico das abordagens *top-down*. Além disso, a acurácia do modelo em reproduzir resultados experimentais não foi o único e principal fator de avaliação da qualidade dos modelos resultantes, pois o aspecto mais importante a ser considerado junto aos modelos é a capacidade de ampliar o conhecimento acerca do fenômeno envolvido. Embora existam muitas manifestações de auto-organização na natureza e que poderiam ser tomadas como casos de estudo, este projeto se propôs a investigar o processo de dispersão larval pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya*. Essas moscas foram introduzidas no Brasil em meados dos anos 70, e são de considerável importância médico-sanitária, podendo ser vetoras de enteropatógenos, causar miíases facultativas nos animais e no homem, além de poderem ser utilizadas em estudos forenses, na estimativa de intervalo pós morte (IPM) em humanos. Nessas moscas, o estágio larval é o principal período em que ocorre competição por recursos alimentares discretos e efêmeros, em ambientes naturais. Após a exaustão dos recursos alimentares, as larvas abandonam o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação. O estudo desse processo de dispersão larval pós-alimentar, envolvendo a investigação da distância percorrida e profundidade atingida pelas larvas para empupar

e a distribuição espacial das pupas nos sítios de pupação, dentre outros fatores, são discutidos nos capítulos seguintes. Esse tipo de estudo pode ser muito útil para uma futura aplicação em estudos de medicina legal.

ABSTRACT

In any area of investigation, one of the main goals is to identify the simplest and most adequate representation of the phenomenon being studied. The study of self-organization in aggregates of organisms is no exception to this rule. In the work described here, we used a combination of laboratory experiments, modeling and validation to clearly identify patterns of behavior. For modeling, spatiotemporal strategies were used to develop mathematical explanations of the interactions and ways organisms act. The final validation was based on computer simulations, comparisons with experimental results and parametric interpretation of the resulting models. The modeling was based on observations and data collected during the experiments, an approach known as bottom-up modeling, and which contrasts with top-down modeling that depends on the incorporation of intuitive hypotheses about the mechanisms involved. Apart from the accuracy of the model in reproducing the experimental results, the most important aspect to be considered is the ability of the resulting model(s) to increase our knowledge about a given phenomenon. In this investigation, we used postfeeding larval dispersal in blowflies of the genus *Chrysomya* as a model to study self-organization. *Chrysomya* blowflies were introduced into Brazil in the mid-1970s, and are of considerable medicosanitary importance since they are vectors of enteropathogens that cause facultative myiasis in animals and man; these flies are also used in forensic studies to estimate the postmortem interval (PMI) in humans. The larval stage in these flies is the principal period in which there is competition for discrete, ephemeral food resources in the wild. After exhaustion of the food resources, the larvae leave the food substrate in search of a site for pupation. The study of post-feeding larval dispersal, which involves an assessment of the distance traveled, the depth of burrowing by the larvae prior to pupation, and the spatial distribution of pupae at pupation sites, as well as other parameters, are discussed in the following chapters. The findings reported here should be applicable to investigations in legal medicine.

Introdução

Muitos sistemas se tornam organizados pela atuação de comandos externos, exercidos por alguém ou algo capaz de operar com os aspectos locais e globais dos referidos sistemas. No entanto, boa parte dos sistemas naturais se torna organizada devido à atuação de seus próprios processos internos, sem intervenção externa, sendo denominados sistemas auto-organizados.

Estruturas auto-organizadas são construídas somente a partir da interação de comportamentos simples desempenhados pelos indivíduos (organismos biológicos, no contexto deste projeto) de um agregado, sendo que o comportamento de cada indivíduo está fundamentado apenas em informações locais que ele é capaz de receber do meio. O princípio fundamental aqui é que comportamentos individuais extremamente simples podem conduzir um agregado de indivíduos a expressar espontaneamente um comportamento coletivo, de natureza espaço-temporal, bastante sofisticado.

Com isso, o padrão espaço-temporal global de um processo auto-organizado em um agregado de indivíduos é uma propriedade emergente, resultante de inúmeros processos elementares caracterizados pela interação local dos indivíduos. Por definição, nenhuma propriedade emergente em um agregado pode ser compreendida e/ou predita pelo exame isolado das características dos indivíduos que compõem o agregado. É necessário levar em conta as interações. Esta é a razão pela qual estes sistemas também recebem a denominação de sistemas complexos (NICOLIS & PRICOGINE, 1977; BAK, 1996).

Toda a metodologia deste trabalho, a ser descrita mais adiante, pode ser justificada a partir da linha de argumentação expressa acima e também levando-se em conta que os indivíduos aqui são organismos biológicos, capazes de apresentar uma grande variedade de comportamentos frente às mais variadas situações ambientais. Deve-se considerar também que o comportamento de qualquer organismo biológico é necessariamente o resultado de um processo evolutivo atuando sobre os indivíduos ao longo das gerações. Sendo assim, a simulação computacional de processos biológicos também foi incorporada no cronograma do projeto.

Objetivos e Escopo do Trabalho

Este estudo está voltado para a experimentação, modelagem e validação de estruturas biológicas construídas através de mecanismos que envolvem auto-organização de grupos de indivíduos. Sendo assim, os resultados de interesse não estão vinculados às conseqüências isoladas da atuação individual de cada membro do grupo, mas sim ao comportamento emergente resultante de todas as possíveis interações dos indivíduos.

Embora as estruturas adaptativas produzidas por insetos sociais, como formigas, abelhas e cupins, sejam as mais evidentes e bem estudadas dentro da perspectiva apontada no parágrafo anterior (BONABEAU *et al.*, 1999), existem outros agregados de organismos biológicos que apresentam comportamento auto-organizado e que pouco têm sido investigados sob esta perspectiva (CAMAZINE *et al.*, 2001). Dentre estes agregados, encontra-se o caso de estudo deste projeto de tese: larvas em processo de dispersão pós-alimentar.

A motivação e a justificativa para este tipo de escolha são as seguintes: os dípteros pertencentes à família Calliphoridae apresentam uma grande diversidade ecológica, ocupando diversos habitats e desenvolvendo-se em variados substratos, que vão de matéria orgânica em decomposição aos tecidos animais vivos, exercendo parasitismo (ZUMPT, 1965). Moscas do gênero *Chrysomya* (Calliphoridae), originárias da África e Australásia, foram introduzidas no continente americano provavelmente através de navios (GUIMARÃES *et al.*, 1978, 1979). Em 1975, 20 anos depois da fuga acidental da abelha africana no Sudeste do Brasil, três espécies de *Chrysomya*, *C. megacephala* (Fabricius), *C. albiceps* (Wiedemann) e *C. putoria* (Wiedemann), foram descobertas na mesma região (IMBIRIBA *et al.*, 1977; GUIMARÃES *et al.*, 1978). Na América do Sul, as espécies de *Chrysomya* variam de região para região e sua atração por fezes também (BAUMGARTNER & GREENBERG, 1984).

Moscas deste gênero têm grande importância médico-sanitária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (FURLANETTO *et al.*, 1984; LIMA & LUZ, 1991), podendo causar miíases nos animais e homem (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.*, 1983), além de serem de fundamental importância nos estudos de entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (GREENBERG, 1991; VON ZUBEN *et al.*, 1996).

O estágio larval é o principal período em que ocorre limitação de recursos alimentares em moscas- varejeiras e a competição por esses recursos é geralmente do tipo exploratória (LEVOT *et al.*, 1979; GOODBROD & GOFF, 1990; REIS *et al.*, 1994, 1999), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (ULLYETT, 1950; BACKER, 1961, 1969; LEVOT *et al.*, 1979; LOMINICKI, 1988, VON ZUBEN *et al.*, 2000, 2001).

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, GOMES *et al.*, 2002).

Estudos anteriores tinham considerado para o processo de dispersão larval, uma calha de 3m de comprimento por 30 cm de largura, que permitia a locomoção das larvas em apenas uma direção e dois sentidos (GODOY *et al.* 1995, 1996; BASSANEZI *et al.*, 1997). O presente estudo, ao considerar uma arena circular, reflete melhor as condições de ambiente natural que as larvas vão enfrentar ao abandonar o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação (ULLYETT, 1950). Isso porque a consideração de uma arena circular permite uma dispersão radial das larvas a partir do substrato alimentar localizado no centro da arena, isto é, em todas as direções, e não simplesmente uma dispersão numa única direção e apenas dois sentidos, como no caso de uma calha.

Assim sendo, além de propor novos enfoques de abordagem para o caso de dispersão larval pós-alimentar no presente estudo, a partir do paradigma da auto-organização, essa tese de pesquisa tem também como propósito sugerir que este mesmo paradigma vai desempenhar um papel fundamental no entendimento e na interpretação de muitas outras formas de estruturação espaço-temporal da natureza, embora nem toda formação de padrões espaço- temporais presente na natureza seja devida à auto-organização de seus elementos constituintes.

Dado que existem vários mecanismos de formação de padrões e emergência de comportamento coletivo na natureza, inclusive já analisados sob a perspectiva da auto-organização (BAK, 1996), é preciso realizar uma clara distinção entre o que se pretende realizar nesta tese, centrada na biologia de organismos, e o que foi abordado por outros estudos de auto-organização na natureza (NICOLIS & PRIGOGINE, 1977; KAUFFMAN, 1993; KAPRAL & SHOWALTER, 1994; GOLDBETER, 1996), centrada na física, química,

bioquímica e no desenvolvimento biológico. O estudo de auto-organização centrada na biologia de organismos não será, assim, uma rerepresentação de modelos químicos e físicos de auto-organização, baseado nas mesmas equações e tendo apenas variáveis com diferentes significados. Aspectos espaço-temporais, memória de curta duração e mecanismos de tomada de decisão serão incorporados ao estudo, garantindo a inovação da abordagem e aumentando a importância dos aspectos de simulação computacional envolvidos.

Metodologia

Para atender os objetivos do presente projeto de pesquisa, são necessárias duas etapas básicas e genéricas:

- análise e síntese dos dois modos básicos de interação dos indivíduos que compõem o agregado capaz de expressar comportamento auto-organizado: realimentação positiva e realimentação negativa;
- entendimento das formas de processamento local de informação adotadas pelos indivíduos que compõem o agregado.

Para uma maior especificidade e detalhamento de propósitos, optou-se por definir uma seqüência mais ampla de etapas, as quais passam a ser apresentadas nas sub-seções seguintes.

Modelagem matemática de processos auto-organizados: uma abordagem espaço-temporal

Para se chegar a uma explanação convincente a respeito das manifestações produzidas por sistemas auto-organizados, é necessário recorrer à metodologia expressa na Figura 1:

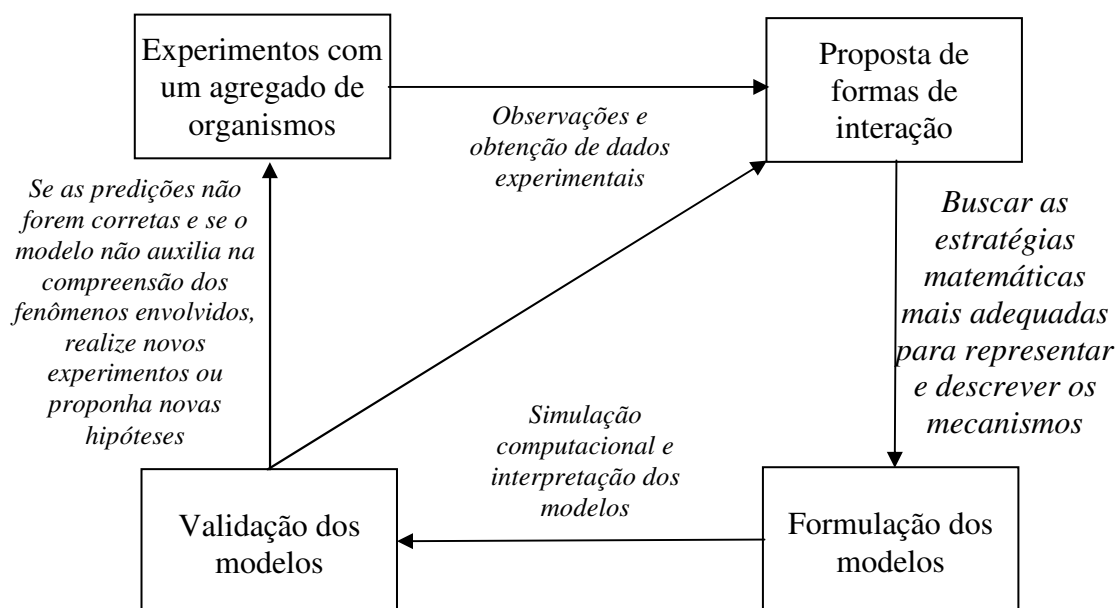


Figura 1: Esquema de como foi realizado o estudo

Metodologia de modelagem a ser adotada

A formulação e validação de modelos matemáticos é essencial no estudo de sistemas auto-organizados, por três motivos:

- um modelo é uma descrição matemática resultante da proposição de hipóteses precisamente formuladas a respeito de como o agregado opera. As previsões produzidas pelo modelo podem ser avaliadas experimentalmente, e assim conduzir à validação ou não das hipóteses que fundamentam o modelo.
- uma vez validado, o modelo pode ser empregado na predição de comportamentos associados a experimentos não realizados na prática, seja por motivos econômicos ou de viabilidade prática. Com isso, há uma possibilidade de se ampliar os conhecimentos acerca da biologia do sistema.

A seguir, é brevemente descrito o modelo matemático a ser considerado nesta pesquisa.

Autômatos celulares

Um autômato celular (AC) é um sistema dinâmico com espaço, tempo e estado discretos (WOLFRAM, 1994). Cada ponto em uma grade espacial regular, chamada célula, pode assumir qualquer um dentre um conjunto finito de estados. Os estados das

células nas grades são atualizados de acordo com uma regra local, ou seja, o estado de uma dada célula, no instante de tempo atual, depende apenas de seu próprio estado e do estado das células vizinhas mais próximas no instante de tempo anterior. Os estados de todas as células são geralmente atualizados de forma síncrona e em instantes discretos de tempo.

Os autômatos celulares são exemplos típicos 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).

Primeiramente introduzidos por von Neumann em 1948 (VON NEUMANN, 1963), como modelo potencial para auto-replicação biológica, os autômatos celulares têm sido usados como ferramenta matemática para o estudo de uma grande variedade de problemas. As equações a diferenças acopladas que compõem os ACs se tornaram ferramentas importantes no estudo de sistemas complexos, pois exibem variados tipos de comportamento dinâmico e têm o potencial de modelar sistemas complexos da natureza a partir de sua estrutura fundamentada em um processamento espaço-temporal.

Modelos espaço-temporais na forma de ACs são idealizações matemáticas de sistemas físicos nas quais espaço e tempo são discretos, e as quantidades físicas pertencem a um conjunto finito de valores discretos. As versões mais utilizadas de autômatos celulares envolvem vizinhança unidimensional, em que as células são arranjadas em fila, e bidimensional, em que as células são arranjadas numa grade regular, com dimensão finita ou infinita. O conjunto de regras de transição certamente deve ser adaptada a cada caso, de acordo com as diferentes definições de vizinhança.

O estado do AC é completamente especificado pelos valores atuais e passados das variáveis de cada célula, podendo haver mais de uma variável discreta por célula. A evolução acontece em intervalos de tempo discretos, com os valores das variáveis de cada célula sendo afetados pelos de suas vizinhas, que normalmente são as de locais imediatamente adjacentes. As variáveis são atualizadas simultaneamente (de forma

síncrona), de acordo com um conjunto bem definido de regras locais (WOLFRAM, 1994), embora variantes e generalizações deste esquema de atualização possam ser considerados (ILACHINSKI, 2001).

Modelos baseados em autômatos celulares representam, portanto, uma alternativa de modelagem para o caso de variáveis discretas e passos temporais discretos. Apesar de ser caracterizado por sua construção simples, nem sempre é possível realizar a síntese direta de modelos apropriados a cada aplicação. O processo de síntese é elementar quando se conhecem as interações locais e se busca verificar que tipo de efeito global estas interações irão causar. Por outro lado, o processo de síntese se torna extremamente desafiador quando se conhece o comportamento global e se busca especificar as interações locais que possivelmente conduzem ao comportamento global conhecido (FORREST, 1990).

Construção de um autômato celular

O elemento básico do AC é a célula. A célula é um tipo de elemento de memória e “armazena” estados. No caso mais simples, cada célula pode ter um dos estados binários, 1 ou 0. Em casos mais complexos, as células podem ter mais estados diferentes. É também possível que cada célula tenha mais de uma propriedade ou atributo e que cada uma delas tenha dois ou mais estados.

As células são arranjadas num padrão espacial: a grade. A mais simples é a unidimensional, significando que as células são arranjadas numa fila. Como já mencionado, os ACs mais comuns são construídos em uma ou duas dimensões. O AC unidimensional tem a vantagem da fácil visualização da evolução temporal. Os estados são plotados numa dimensão e o desenvolvimento dinâmico é mostrado na segunda dimensão, do passo 0 ao n . No AC bidimensional, só se pode representar o estado de um passo temporal e , portanto, visualizar a sua dinâmica é mais difícil. O AC unidimensional apresenta um conjunto menor de regras do que o bidimensional, como seria de se esperar.

As células arranjadas em grade podem expressar comportamentos internos estáticos ou dinâmicos. Para introduzir o efeito espaço-temporal, as regras de transição de estados devem levar em conta não apenas o comportamento interno de cada célula, mas também a influência do estado das células vizinhas, ou seja, o efeito da vizinhança.

Com isso, as regras de transição vão definir completamente o estado de cada célula no próximo passo de tempo.

Há diferentes definições de vizinhança, sendo que para redes bidimensionais, cita-se:

- vizinhança de von Neumann: a vizinhança de von Neumann de uma célula é a célula acima, a abaixo, a do lado esquerdo e a do lado direito. O raio desta vizinhança é 1, pois as células vizinhas são todas adjacentes;
- vizinhança de Moore: A vizinhança de Moore é uma extensão da de von Neumann, contendo também as células diagonais. Neste caso, o raio de vizinhança também é 1;
- vizinhança de Moore estendida: A vizinhança de Moore estendida tem a mesma definição da vizinhança de Moore, mas o raio de vizinhança é 2 ou maior.

Simulação computacional de processos auto-organizados: a emergência de comportamentos padronizados

A auto-organização de um agregado de indivíduos envolve o estabelecimento de comportamentos padronizados (como, por exemplo, sincronização de atividades) a partir de ações individuais de cada membro do agregado. Um aspecto essencial de processos deste tipo é o fato de que cada indivíduo toma decisões baseadas unicamente em informações locais, ou seja, sem dispor de uma visão global do sistema e sem ser comandado externamente (por alguém que disponha desta informação).

Devido à quantidade de interações locais que se estabelecem, não é possível antecipar o tipo de comportamento emergente que irá resultar da auto-organização. Esta é a razão pela qual a simulação computacional, empregando os modelos matemáticos capazes de explicar os fenômenos espaço-temporais envolvidos, é indispensável, pois os modelos permitem expressar as inúmeras interações que se estabelecem entre os indivíduos do agregado ao longo do tempo.

As perguntas que se buscam responder com o auxílio da simulação computacional de agregados de indivíduos são as seguintes:

- *quais são os mecanismos que permitem desenvolver e manter um processo auto-organizado? Em outras palavras, como os indivíduos do agregado interagem para produzir o padrão global resultante?*

- *uma vez caracterizadas as regras de tomada de decisão que irão definir o comportamento individual de cada membro de um agregado, ao longo do tempo, e que supostamente permitem desenvolver e manter um processo auto-organizado, ocorrerá efetivamente algum tipo de auto-organização do comportamento espaço-temporal?*
- *se a resposta à questão acima for afirmativa, qual será o padrão emergente, ou seja, o resultado final da auto-organização?*

Material e Métodos

Coleta e manutenção dos espécimens em condições experimentais

Exemplares de moscas-varejeiras foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, após a identificação das espécies, matéria orgânica em decomposição e os exemplares coletados foram mantidos em gaiolas teladas em sala com temperatura de 25 ± 1 °C, fotofase de 12 horas e 60% +10 %de umidade relativa.

Formação das densidades larvais

Os ovos foram depositados em macerado de carne moída, no centro de arenas circulares de 2 m de diâmetro e 5 cm de profundidade, de 50 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade e de 25 cm de diâmetro e 40 cm de profundidade, forradas com vermiculita, e uma arena de 30 m de diâmetro e 30 cm de profundidade em ambiente natural. Após o desenvolvimento larval, as larvas irradiaram para empupar.

Contagem e determinação da distância e profundidade de pupação em relação ao centro da arena

Após as larvas empuparem, elas foram localizadas e retiradas do substrato, sendo medidas para cada uma a distância e a profundidade do local de pupação em relação ao centro, com o auxílio de réguas e trenas. A contagem começou da periferia para o centro e as arenas foram divididas em 72 setores de 5 graus cada.

Determinação do peso das pupas

Assim que ocorreu a empupação, 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.

Identificação das espécies e sexagem

Após a pesagem, cada pupa foi devolvida ao seu respectivo frasco, para após a emergência ser feita a identificação das espécies e sexagem dos adultos.

Justificativa para a realização dos experimentos

As perguntas que se buscam responder a partir dos resultados de experimentos de laboratório são as seguintes:

- *dado um padrão observado representando o resultado final de um processo auto-organizado em um agregado de indivíduos que interagem localmente, o que deve caracterizar o comportamento individual de cada indivíduo para conduzir à emergência do referido comportamento?*

Neste caso, os resultados obtidos dos experimentos de laboratório fazem o papel de comportamento desejado para os processos auto-organizados simulados computacionalmente. O que vai se buscar aqui são respostas para as perguntas que seguem:

- *dado que existe, na natureza, a formação de padrões espaço-temporais não devidos a processos auto-organizados, em que extensão os padrões obtidos em experimentos de laboratório envolvendo agregados de indivíduos são devidos à ocorrência de processos auto-organizados?*
- *se a resposta for afirmativa para a questão acima (e muitos são os exemplos na literatura de respostas afirmativas), é possível reproduzir em computador os mesmos comportamentos padronizados obtidos como resultado final de processos auto-organizados?*
- *se a resposta for afirmativa para a questão acima (e muitos são os exemplos na literatura de respostas afirmativas), o provável sucesso na reprodução de comportamentos auto-organizados específicos vai permitir associar aspectos de*

tomada de decisão dos indivíduos em simulação computacional (o projetista ou programador certamente sabe quais são estes aspectos, pois estão expressos no programa computacional) com aspectos de tomada de decisão dos indivíduos presentes no experimento de laboratório (o pesquisador de laboratório não é capaz de extrair esta informação, pois os organismos vivos utilizados no experimento possuem um alto grau de autonomia, tomando decisões que não estão necessariamente ao alcance do observador)?

- *qual é o nível de complexidade (local) que cada indivíduo deve apresentar para permitir a emergência da complexidade (global) observada no agregado de indivíduos?*
- *o quanto do comportamento observado no agregado é devido ao efeito da ação individual de cada membro e o quanto é devido à dinâmica do meio?*

CAPÍTULO 1

(Revisão da Literatura)

A review of post-feeding larval dispersal in blowflies: implications for forensic entomology.

Naturwissenschaften, 2006. No prelo

A review of post-feeding larval dispersal in blowflies: implications for forensic entomology

Abstract. Immature and adult stages of blowflies are one of the primary invertebrate consumers of decomposing animal organic matter. When the food supply finishes, or when the larvae complete their development and migrate prior to the total removal of the larval substrate, they disperse to find adequate places for pupation, a process known as post-feeding larval dispersal. Several important ecological and physiological aspects of this process have been studied since the work by Green 50 years ago. An understanding of post-feeding larval dispersal can be useful for determining the post-mortem interval (PMI) of human cadavers in legal medicine, particularly since this interval may be underestimated if older dispersing larvae or those that disperse longer, faster and deeper are not taken into account. In this article, we review the process of post-feeding larval dispersal and its implications for legal medicine, particularly the recent and current studies by Gomes *et al.* which show that aspects such as burial behaviour and competition among species of blowflies can influence this process and, consequently, the estimation of IPM .

Key words. Blowflies, Forensic Entomology, Post-feeding Larval Dispersal, Postmortem Interval, Medical and Veterinary Entomology.

Introduction

Many insect breeding sites are discrete and consist of small, separated, ephemeral units that persist for only one generation because of the rapid successive

changes that occur in them (Wiens, 1976; Shorrocks, 1991; Tilman and Kareiva, 1997). Carrion and faeces are prime examples of patchily distributed, ephemeral resources that have a high nutritive value and are heavily exploited by a large number of insects, mainly blowflies (Calliphoridae) (Hanski, 1987; Martínez-Sánchez *et al.*, 2000)

The larval stage is the main period when blowflies face limits in their food resources. The competition for these resources is generally of the exploitative type (Levot *et al.*, 1979; Goodbrod & Goff, 1990; Reis *et al.*, 1994), in which each larva attempts to feed as much as possible before exhaustion of the resources (De Jong, 1976; Levot *et al.*, 1979; Lominicki, 1988). Following this competition, the larvae begin to search for a pupation site in their habitat, or for another source of food if their fat reserves at this developmental stage are insufficient to allow pupation. This process is known as post-feeding larval dispersal (Greenberg, 1990).

Dispersal is one of the most important but least understood processes in population biology (Taylor, 1984; Marsh & Jones, 1988; Rouhgardien *et al.*, 1988; Rohani and Miramontes, 1995; Turchin *et al.*, 1998). Dispersal involves organisms moving from one place to another, whether instinctively or motivated by a purpose (Wolfenbarger, 1946). In this movement, the organism may be self-propelled or be propelled by energy from an outside source (e.g., temperature and illumination) . An axiom of the dispersal of organisms is that there is a reduction in the number of biological units as the distance from the point of origin increases (Wolfenbarger, 1946).

The dispersal distances of birds and animals, like those of other organisms, are only crudely approximated by a normal distribution (Waser, 1985), and it is unclear why animal species, including blowflies, differ in their mean dispersal distances (Greenwood and Harvey, 1977). Some blowfly species have received particular attention in countries where they are exotic species and have had an impact on the native community of necrophagous dipterans (Wells and Greenberg, 1992). This impact caused by the introduction of exotic species is of interest to ecologists and evolutionists who study the processes involved in invasions, including competition, predation and dispersion, as well as the stability and extinction of local populations (Hengeveld, 1989). Understanding the phenomena involved in such invasions depends on the study of certain population parameters and the space-time structure of the environment in which these phenomena occur (Wiens, 1976; Hengeveld, 1989). In addition, other small

spatial scale phenomena, such as the dispersion of immature stages of the invading organisms, are also important considerations. This is particularly the case for post-feeding larval dispersion and the search for a suitable pupation site by necrophagous flies.

The complexity of dispersal is further enhanced by the spatial scale in which it occurs, which can vary from centimeters to hundreds of kilometers (Gaines and Bertness, 1993). As a result, the parameters that are considered as significant consequences of the pattern of animal movement will vary according to the purpose of the study (Marsh & Jones, 1988). Although the importance of movement in the population dynamics of animals is well recognized (Marsh & Jones, 1988; Turchin *et al.*, 1998), few studies have examined such movements in insect larvae.

According to Wolfenbarger (1946), the movements of small organisms fit the concept of dispersal if the organisms move away from their source but lack mass purposeful and periodical returns to their source for reproduction. Dispersal may be initiated by internal factors, such as the reproductive impulse, hunger, or gregariousness. External influential factors include overcrowding, a shortage of food, a change in food conditions, the wind direction, or the intervention of other organisms.

For dipterans, the immature stages of which live in ephemeral, discrete patches, two phases of the life-history are of paramount significance in determining the fitness of adults. During the first phase, 2nd to early 3rd instar larvae commonly experience crowding that usually results in exploitative competition for resources when the larvae need to acquire the minimum amount of food necessary for successful pupation (Levot *et al.*, 1979; Mueller, 1988). Density-dependent competition among larvae in this stage adversely affects fitness traits such as adult fecundity and body size, with consequences for population dynamics (Prout & McChesney, 1985; Godoy *et al.*, 1993; Von Zuben *et al.*, 1993, 2001; Teixeira *et al.*, 1998; Reis *et al.*, 1999; Faria *et al.*, 1999, 2001).

Following this competition, the larvae begin to search for a site to pupate or for another source of food if they are not heavy enough to pupate; this phenomenon is known as post-feeding larval dispersal (Greenberg 1990). Post-feeding larval dispersal and the consequent spatial distribution of the pupae at pupation sites can influence the susceptibility of larvae to attack by predators or parasites (Peschke *et al.*, 1987; Von Zuben *et al.*, 1996; Legner, 1997). In addition, factors such as luminosity, temperature,

humidity, the degree of soil compactness and the presence of other species can affect the dispersal of blowfly larvae, and must therefore be carefully considered when interpreting the results of dispersal studies.

In the second phase of the life-history of immature dipterans, the post-feeding larvae begin to disperse away from the food source in search of suitable sites for pupation where attacks by predators and parasitoids will be minimal, or for additional food in the case of exhaustion of initial food resources; the form and rate of this process is a function of the probability distribution of the distances travelled by juveniles (Peschke *et al.*, 1987; Legner, 1977).

In this article, we review the phenomenon of post-feeding blowfly larval dispersal and discuss the relevance of this process to other areas of research, particularly forensic entomology. Particular emphasis is given to recent and current studies by Gomes *et al.* 2005 in which aspects such as burial behaviour and competition among species of blowflies, which are the main elements of the fauna on exposed corpses (Lundt 1964), may influence the larval dispersal process and, consequently, estimation of the PMI (Post-Mortem Interval).

First studies

1950-1969

Green (1951) studied the behavior of blowflies in the field and observed that the larvae could travel distances of 6-10 m from the center of dispersal. He also studied the control of blowflies infesting slaughter-houses. The first study to consider the burrowing depth reached by fly larvae was done by Lundt (1964), who found that blowflies could be completely excluded by burial under only 2.5 cm of soil. In addition, the top layers of soil, from 2.5 cm to 10 cm, were dominated by larvae of the fly *Muscina* (Muscidae). At greater depths, larvae of the phorid flies *Conicera* occurred. The coffin-fly (*Conicera tibialis*) may appear on the soil surface above a corpse some 12 months after death and is a good indicator that a corpse lies beneath the soil surface. Consequently, the occurrence of this species at a crime scene is an important finding,

but may not be very useful in helping to establish a relationship between the PMI and dispersal.

1970-1979

Little work was done on blowfly larval dispersal during the 1970s. Nuorteva (1977) showed that, under natural conditions, dipteran pupae of several species can be found directly under an animal corpse or as far away as 6 m. According to this author, if one wave of maggots has already left the body, then puparia and inactive larvae or prepupae should be sought by making a series of shallow transects (three transects 7 cm apart) in several directions up to 20 ft (6 m) from the corpse (Figure 1). Such an analysis can provide important information to support or refute laboratory findings based on dispersal distances of less than 6 m.

		Distance (cm)														
Date	Time	10	20	30	40	50	75	100	125	150	175	20	225	25	275	30
in	(h)											0		0		0
1970																
July	20:00	350	500	100	727	69	8									
30				0												
July	8:00	300	39	82	15	77	0	23	2	2						
31																
Aug 1	20:00	3	5	15	1	72	53	8	5	30	8	1	0	1		
Aug 1	8:00	3	7	68	47	69	27	33	42	39	12	8	9	1		
Aug 1	20:00	54	8	49	4	43	21	13	33	19	0	8	5	1		
Aug 1	8:00	14	6	11	5	12	14	9	16	23	0	6	6	8	0	1

Figure 1: Dispersal of larvae from a carcass (7 kg of raw fish) in a lightly wooded area with a well-developed moss layer and undergrowth in Finland (Sukainen). Five traps were placed at different distances (see abscissa of diagram) and the numbers of larvae found in the traps are shown. Dispersal commenced five days after exposure of the carcass at a mean temperature of 16.8° C (modified from Nuorteva, 1977).

Coe (1978) found that for the larvae of two species of *Chrysomya* feeding on elephant carcasses in Kenya, the larger 'spiky' larvae of *C. albiceps* (Wiedemann, Diptera, Calliphoridae) preyed on the smaller unarmed *Chrysomya marginalis* (Fabricius, Diptera, Calliphoridae) only in the migratory phase (post-feeding larval dispersal), as they left the carcass.

1980-1989

Smith *et al.* (1981) investigated the factors controlling the timing of the exodus of *Lucilia cuprina* (Wied.) larvae from sheep and carrion at night, under field and controlled conditions. An endogenous rhythm was found to be partially responsible for the peak departures soon after darkness fell. Clumping in the exodus of larvae from sheep was also seen and probably resulted from small feeding clusters that used tactile stimuli to encourage mass departures (Smith *et al.*, 1981). This type of analysis is important since the use of abiotic factors can improve the precision with which the PMI is estimated.

Vogt (1982) studied the dispersal of post-feeding larvae of *L. cuprina* from carrion and live sheep. Most of the larvae entered the soil in the immediate vicinity of the host, with median dispersal distances of 0.8-1.6 m. In addition, most of the larvae sampled from both soil types were located in the top 2.5 cm of soil, with none penetrating beyond a depth of 5 cm. The type of host appeared to influence the subsequent dispersal of the post-feeding larvae. The results of this study showed that dispersal in the field was similar to that in the laboratory for considerable periods of time. This pattern of larval distribution strongly suggested that post-feeding larvae entered the soil to pupate within 2 m of where they left the carcass.

Smith (1986) discussed several important aspects of larval dispersal associated with the methods and techniques applied to criminal investigations, particularly forensic entomology. As suggested by Nuorteva (1977), Smith (1986) recommended the use of transects to locate puparia and inactive larvae or prepupae. Empty puparia would indicate that a generation of flies had emerged, although such puparia still contained the third instar mouthparts and spiracles that could be used to identify the fly species. In

such cases, considerable care is needed to ensure that all of the pupal trappings are collected. This requires a knowledge of where to look and an understanding of the pattern of pupal distribution generated by the larval dispersal.

Hanski (1987) described an outdoor cage experiment to test the theory that localised interactions facilitated the coexistence of species breeding in ephemeral habitats. This type of investigation is important because the patterns of competition among blowfly larvae can affect subsequent dispersal and the search for a suitable pupation site by the survivors, with the waves of departing larvae containing different species and different numbers of larvae. In this study, the same amount of larval resource (50 g of liver) divided into one, two, four, eight or 16 portions was placed into each of 15 cages once a week from June to September for four years. The cage populations were initially mixtures of 13 species but, after four years, only *Lucilia illustris*, *Sarcophaga scoparia* and *S. aratrix* remained. *Lucilia illustris*, by far the most abundant species in the field, predominated in every cage; *Sarcophaga* survived in five cages in which the larval resource was very divided and *Lucilia silvarium* emerged about a week later than *L. illustris* in the early summer. This difference apparently explained why *L. silvarium* became extinct in the cages in three years, and probably explained why *L. silvarium* was consistently less abundant than *L. illustris* in the wild.

1990-1999

In 1990, Greenberg compared the dispersal behaviour of post-feeding larvae from five species of Calliphoridae (Calliphorinae and Chrysomyinae) and one muscid in 8.1-m-long channels. The results suggested that post-feeding larvae of Calliphorinae moved farther from the food source, pupated underground and produced a thinner puparium followed by a longer pupation period, when compared to the larvae of the Chrysomyinae. Based on these findings, three patterns of dispersal were identified among post-feeding larvae of the blowflies and the muscid:

- *Lucilia sericata* and *Calliphora vicina* were the most dispersive; <1% of the former and only 15.5% of the latter remained at the food source. The rest moved 3-8.1 m away;

- Post-feeding larvae of *Phormia regina*, *Chrysomya rufifacies* and *M. stabulans* dispersed the least. Ninety-eight percent of *P. regina*, 90% of *M. stabulans*, and 84% of *C. rufifacies* remained at the food site. *Chrysomya rufifacies* larvae moved farthest, with one individual more than 3.3 m away, whereas *P. regina* moved the least.
- *Cochliomyia macellaria* (Wiedemann) larvae showed an intermediate response; about 50% dispersed no farther than 2.4 m, and none moved more than 5.1 m; 40% remained at the food source.

Studies such as this one are important for forensic entomologists when dealing with larval dispersal involving more than one species. Inadequate attention to this aspect can influence the conclusions of a given study and the assessment of PMI because of the effect of different species on the pattern of larval dispersal.

Omar *et al.* (1994) studied certain behavioural patterns of some Malaysian calliphorids and a muscid species on decomposing cat and monkey carcasses. These authors noted that the late third instar larvae of *C. rufifacies*, *C. chani*, *C. villeneuvei* and *Ophyra spinigera* were the least dispersive compared to *C. megacephala*, *C. nigripes*, *C. pinguis* and *Hemipyrellia ligurriens*. In addition, predatory behaviour by third instar larvae of *C. rufifacies*, *C. villeneuvei* and *O. spinigera*, and cannibalism by *C. rufifacies* and *C. villeneuvei*, were observed in the field.

Berrigan and Pepin (1995) described the kinematics and allometry of limbless locomotion in the larvae of *Protophormia terraenovae*. In this species, locomotion consisted of a combination of telescoping and caterpillar-like movements. Speed, the number of contractions per second, and the distance traveled per contraction were correlated with mass. These relationships were compared to the kinematics of locomotion in caterpillars and limbed insects. Larval flies crawled more slowly than limbed insects and the frequency of contraction and the distance traveled per contraction increased with speed. Additional studies similar to this one could provide important information about larval dispersal since an understanding of how individual larvae disperse is essential for analyzing the final, overall pattern of post-feeding larval dispersal.

Godoy *et al.* (1995, 1996) observed an oscillation in the pupal frequency of *C. megacephala* (F.) and *C. putoria* (Wied.) as a function of the distance from the feeding

substrate. According to Boldrini *et al.* (1997), these oscillations could be the result of larval aggregations at certain sites in the substrate used for pupation. Dispersing larvae may be able to sense the density of other larvae already buried in a certain area of substrate, and this could cause them to move on to more distant pupation sites.

Von Zuben *et al.* (1996) proposed a diffusion model to describe larval dispersal that took into account dispersing, post-feeding individuals and larvae that were already buried in the substrate. This model is expressed in space and time as

$$\frac{\partial c(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c(x,t)}{\partial x^2} + \alpha \frac{\partial c(x,t)}{\partial x} - h(x,t)$$

where $c(x,t)$ is the concentration of larvae at any given location (x) and time (t), D is the diffusion coefficient representing the diffusion of larvae, α is a coefficient of proportionality describing the velocity of the larvae (characteristic of a given species), and $h(x,t)$ specifically describes the process of larval burrowing in the soil. Bassanezi *et al.* (1997) fitted this model to data for the post-feeding larval dispersal of calliphorids obtained by Godoy *et al.* (1995). The analytical solution of this equation predicted oscillatory and monotonic dispersal behaviours (Bassanezi *et al.*, 1997).

Tessmer and Meek (1996) investigated the spatial distributions of calliphorid pupae based on adult emergence from pig carcasses under field conditions during four seasons in southern Louisiana, USA. For all seasons, the number of emerged adults collected in screened cages was substantially greater in pastures than in woods. *Cochliomyia macellaria* (F.) was the predominant calliphorid species collected during the summer and autumn, whereas *P. regina* (Meigen) was the principal species during the spring. The pupal densities per square meter were determined and the preferential directions chosen by the post-feeding larvae were also assessed in the different seasons. In the summer, the highest densities of calliphorid pupae per square meter were located within 0.9 m of the animal carcasses in the woods compared to pastures. However, the number of calliphorid pupae per square meter during the summer was substantially greater in pastures than in the woods (2,370/m² compared to 77/m²). Post-feeding calliphorid larvae dispersed towards the southeastern quadrant during the summer and spring, and towards the southeastern to southwestern quadrants in the autumn. This change in direction indicated that dispersal was directional and that the larvae did not necessarily disperse towards all of the cardinal points.

Boldrini *et al.* (1997) developed a mathematical model to explain the appearance of oscillations during the dispersal of larvae from the food source and took into account non-local interactions between dispersing and buried larvae. The model considered a single dimension of space and quantified the effect that the neighboring $n(x', t)$ exerted on $n(x, t)$, based on the equation

$$\frac{\partial n}{\partial t}(x, t) = f(n) + \int_{-\infty}^{\infty} w(x - x') n(x', t) dx'$$

where $w(x - x')$ is the kernel function that quantifies the non-local interaction in the space variable, and $f(n)$ is the well-known source term in the reaction diffusion approach. The mathematical results suggested that the greater the neighbourhood influence acting to inhibit pupation, the greater the frequency of waves of dispersing larvae. These waves determined the oscillation in pupal frequencies as a function of the distance from the food source.

Bass (1997) studied the exodus of maggots from carcasses of *Sus scrofa* on a farm. At exodus (about 19 days after maggot hatching), the corpses lost 90% of their weight. The maggots left the body to avoid predators and pushed themselves through the soil up to 25 feet away. So massive was the migration that in short grass on rocky soil the maggots left a trail that was sometimes mistaken for fire tracks. Such behaviour could certainly influence the subsequent interpretation of data.

Benecke (1998) found larvae of *Protophormia terraenovae* in the skull of a 29-day-old corpse in Cologne (Germany), and Introna *et al.* (1998) collected second instar larvae from the charred remains of a body in a rural area of the city of Brindisi (southern Italy), indicating that this species probably pupates directly in cadavers. This finding could be of considerable forensic importance.

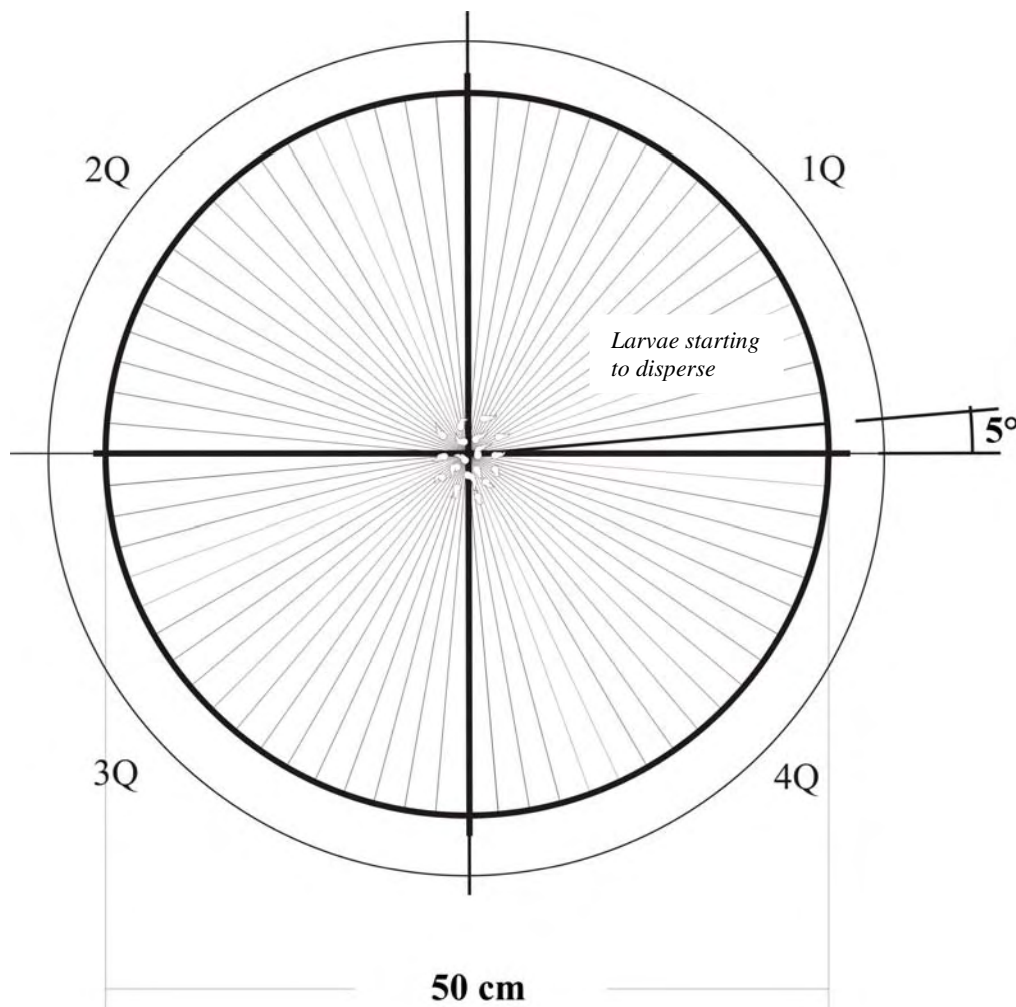
Recent studies (2000-2004)

Kocárek (2001) investigated the post-feeding dispersal of larvae of *Calliphora vomitoria* and *Lucilia caesar* from carrion in the field and found that the larvae dispersed exclusively at night, thereby minimizing interactions with diurnal and

crepuscular predators such as specific insects (e.g., wasps), small insectivorous birds, mammals and parasitoids (i.e. hymenopterans). The dispersal of maggots away from carrion and from soil contaminated by carrion body fluids and by ammonium from the maggots can also accelerate the larval dispersal and have an impact on soil invertebrates and plants (Bornemissza, 1957).

Andrade *et al.* (2002) used an acrylic channel to examine the influence of larval predation on larval dispersal in *C. albiceps* and *C. macellaria*. In two-species experiments, the number of *C. albiceps* larvae recovered was similar to the number initially released, whereas the number of *C. macellaria* larvae recovered was significantly smaller than that initially released. The level of larval aggregation for *C. macellaria* decreased when *C. albiceps* was present whereas the level of larval aggregation for *C. albiceps* increased when *C. macellaria* was present. These findings demonstrate the influence that the larvae of one species can have on the larval dispersal of another species.

Other studies have described general aspects of larval dispersal in a circular arena and have confirmed results obtained using troughs (Gomes *et al.*, 2002, 2003). The circular arena arrangement used by Gomes *et al.* (2002, 2003) (Figure 2) provides a closer simulation of the natural conditions that the larvae face when they abandon their feeding substrate in search of a site to pupate (Ullyett, 1950). Unlike the dispersal in only two directions allowed by a trough, a circular arena allows radial dispersal from a central feeding substrate. An additional advantage is that although the size of the arena can influence the depths and distances travelled by the larvae, it has no effect on the patterns of larval dispersal.



Q= Quadrant

Figure 2: A diagram of the experiment done by Gomes *et al.* (2002, 2003).

Gomes *et al.* (2002, 2003) examined whether there was any correlation among the variables analyzed and demonstrated some general aspects of the dispersal of *C. megacephala* and *C. albiceps* larvae in a circular arena. Their results confirmed previous findings obtained using deeper arenas of smaller diameter. One of these findings was that the larvae with the smallest mass tended to move greater distances after food depletion, perhaps in search of new sources of food rather than for a site to pupate (Figures 3 and 4).

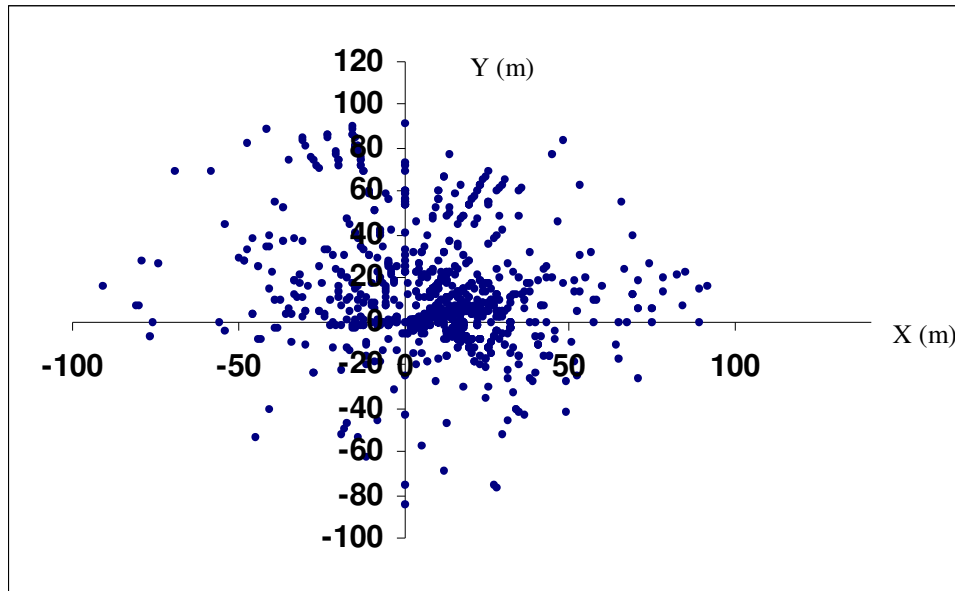


Figure 3: Distribution of buried larvae of *C. megacephala*.

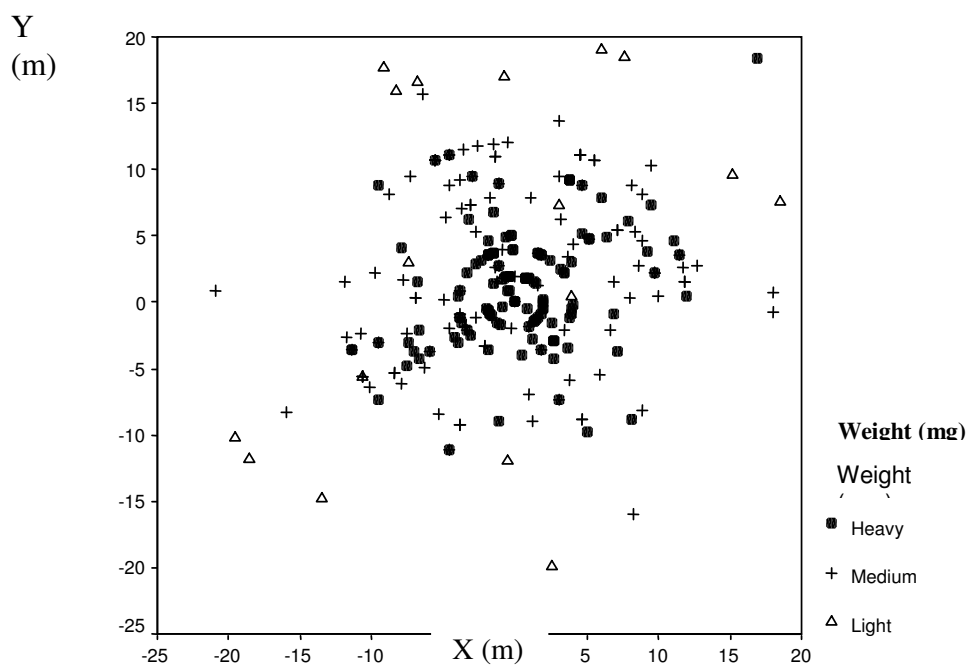


Figure 4. Spatial distribution of 350 pupae of *C. albiceps* based on a classification by weight (light = <47 mg, medium = 47 mg < weight < 56 mg, and heavy = >56 mg).

*Some data are superimposed.

Other studies (Figure 5) investigated the interspecific radial post-feeding larval dispersal of *C. megacephala* and *C. albiceps* since this dispersal more accurately reflects the larval dispersal that occurs in natural environments compared to when these species are studied one at a time. *Chrysomya albiceps* preyed on *C. megacephala* larvae during post-feeding dispersal. In the wild, post-feeding larval dispersal and the subsequent spatial distribution of pupae at pupation sites could have implications for the susceptibility of larvae to attack by predators or parasites (Peschke *et al.*, 1987; Legner, 1997). Since *C. albiceps* larvae prey on *C. megacephala* larvae during larval dispersal, the latter probably disperse farther and deeper in order to escape predation (Goodbrod and Goof, 1990; Wells & Greenberg, 1992; Hanski, 1997; Faria *et al.*, 1999, 2001).

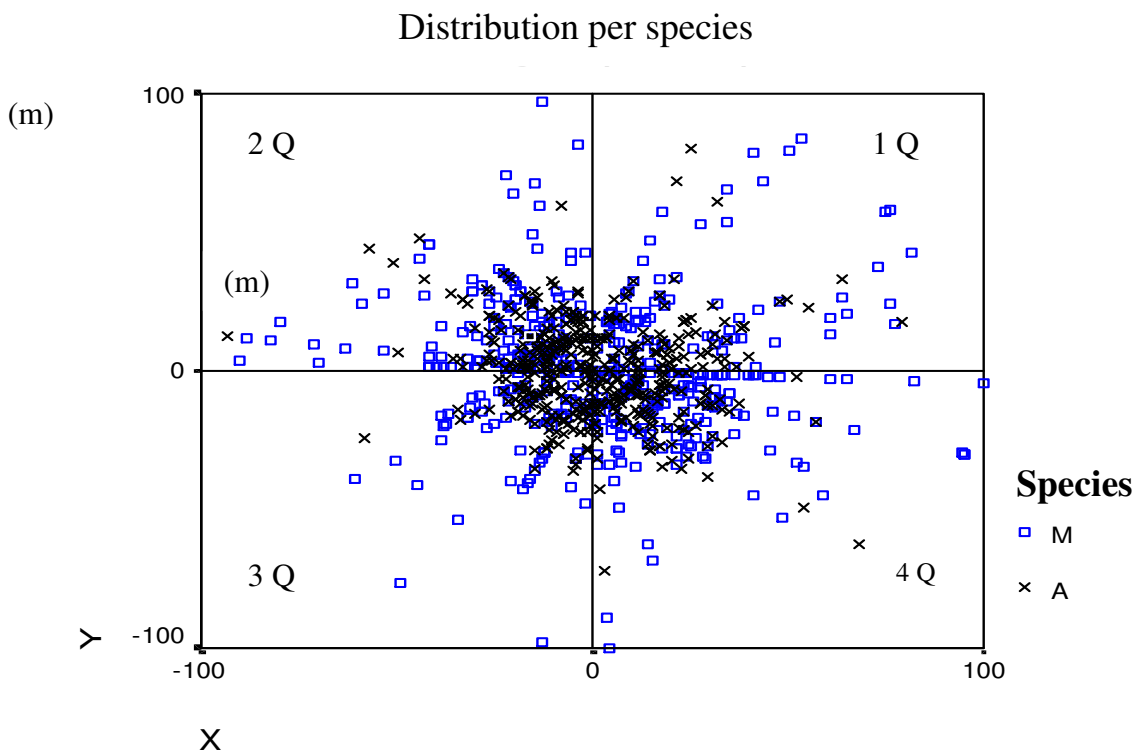


Figure 5: Species distribution in the arena (species M = *C. megacephala* and A = *C. albiceps*) (personal unpublished data).

As shown by Gomes *et al.* (2003), when both species were considered together, there was a positive correlation between the distance from the food source and the depth of burrowing, which indicated a significant correlation with sample size. There was also a significant positive correlation between the variables depth and weight, i.e. the heavier the larvae, the deeper they buried. In contrast, the correlation between weight and distance was negative, indicating that the farther the larvae were from the center, the less they weighed.

An important finding of the study by Gomes *et al.* (2003) was that *C. albiceps* larvae did not distribute themselves uniformly in the arena, in contrast to findings obtained when the species were considered separately; *C. albiceps* larvae concentrated closer to the center of the arena and did not have a uniform distribution, whereas *C. megacephala* larvae had a uniform distribution (Gomes and Von Zuben, 2003; Gomes *et al.*, 2003). This arrangement probably reflected the tendency of the latter species to minimize contact with *C. albiceps* larvae, thereby avoiding predation (Faria *et al.*, 2001).

Apparently, the main factor limiting larval movement was apparently the distance from the center, and not the depth of burrowing, since in an arena 50 cm in diameter and 20 cm deep the depth of burrowing was the same as in an arena 2 m in diameter but with a maximum depth of 5 cm (Gomes *et al.* 2003). Larval movement away from the food source was mainly to search for a suitable pupation site, although the possibility that some larvae were seeking an additional source of food cannot be discarded (Gomes *et al.*, 2002).

In additional experiments, vermiculite and sawdust were used to assess the influence of substrate compactness and density on larval dispersal. A circular arena covered with vermiculite was used to study the radial dispersal of larvae of *C. megacephala* and *C. albiceps* from the center. This dispersal was compared with that seen using wood shavings. Under these conditions, the larvae that dispersed farthest weighed the least, in contrast to other studies (Gomes *et al.*, 2003). In addition, most individuals burrowed to a depth of 7-12 cm before pupating, in contrast to the study by Gomes *et al.* (2003) in which most larvae burrowed to a depth of 10-15 cm before

pupation. Hence, the type of substrate clearly affected the depth of burrowing but not the pattern of post-feeding larval dispersal.

Current studies (2004-2005) and Conclusions

Gomes *et al.* (2004) studied post-feeding larval dispersal using 783 larvae of *L. cuprina* and a circular arena of sawdust (50 cm in diameter and 20 cm in depth) to allow the radial dispersal of larvae from the food source in the center. This arena was the same as that used by Gomes *et al.* (2003). For each pupa, the distance from the center of the arena, the pupal weight and the depth of burrowing were determined. Again, the larvae that dispersed the farthest were those that weighed the least. Most individuals burrowed to a depth of 7-18 cm before pupating, with most larvae burrowing deeper than 12 cm.

Gomes *et al.* (2005) studied the dispersal and burrowing behavior of *C. megacephala* and *C. albiceps* larvae (Diptera, Calliphoridae) in a circular arena 25 cm in diameter and covered with wood shavings to a depth of 40 cm, which allowed post-feeding dispersal from the center of the arena. Larvae of both species were used in five experiments. For each pupa, the location (distance from the center), depth of burrowing and pupal weight, were evaluated. The average distance of dispersal and the depth of burrowing were significantly different between the two species, with *C. megacephala* travelling farther and burrowing deeper than *C. albiceps* (the former species pupated in average 4.7 cm from the center at a depth of 11 cm compared to 3.2 cm from the center at a depth of 9.8 cm for the latter species; the maximum depth of pupation was 23 cm in *C. albiceps* and 32 cm in *C. megacephala*). In contrast, there was no significant difference in the larval weight of the two species.

Gomes and Von Zuben (2005) studied some of the most important aspects of this process in the blowfly *C. albiceps* by using a circular arena to allow the radial dispersion of larvae from the center. Most of the larvae buried themselves near the center of the arena. Moreover, the correlation between weight and traversed distance was -0.14 ($P = 0.0003 < 0.01$), indicating that the greater the larval weight, the smaller the burying distance for pupation. In this case, smaller larvae would be at a disadvantage when competing for a pupation site, and would have to travel greater

distances to pupate or in search of an additional food source. Unlike previous studies, in this work there was no consideration of whether the PMI would be underestimated.

In natural environments, the substrates in which necrophagous flies develop are normally discrete, ephemeral units that are separated in space and last only a short period of time because of the rapid, successive changes they undergo (Atkinson and Shorrocks, 1981). However, the time required for exhaustion of the food resource is greater for human corpses than for animal carcasses, which are normally saturated with insects of one or more species (Beaver, 1977), and may result in intense competition for this resource (Hanski, 1987).

An analysis of environmental factors, particularly photoperiod, can be helpful when searching for dispersing larvae around cadavers, e.g., in closed locations with an LD cycle of 0:0 h, or in totally illuminated locations with an LD cycle of 24:0 h. In experimental studies, the use of a wider range of temperatures but smaller intervals between measurements, e.g. every 1°C instead of every 5°C, could be helpful in detecting the precise temperature at which the maximum depth of burrowing occurs and at which the number of burrowing larvae is also maximal (Gomes & Von Zuben, 2002; Gomes *et al.*, 2003).

Estimation of the PMI is the most important application of entomological evidence in medico-criminal investigations (Amendt, 2004), and the study of blowfly dispersal can be of crucial importance in this determination since the interval will be underestimated if older dispersing larvae or those that disperse farther, faster and deeper are not considered (Smith, 1986; Von Zuben *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 2002, 2003, 2004, 2005).

An understanding of the factors that influence larval dispersal (e.g., competition/predation among species, density of larval aggregates on food substrates, photoperiod, etc) and of the burial behaviour during this process can be particularly helpful in determining whether larvae will pupate close to or far from the corpse, and the effect of this dispersal on the PMI.

Based on the various aspects discussed in this review, we suggest the following protocol that can be used to search for pupae undergoing post-feeding larval dispersal at a crime scene:

- Locate the center of dispersal (in many cases, this is the place where the cadaver or carcass lies) and measure off a distance of up to 6 m;
- Divide this distance into four segments of 1.5 m each;
- Divide the circumference to four quadrants based on the cardinal points (the radius will be 6 m);
- Choose one quadrant point and remove 10 cm of soil for up to 1.5 m from the center of dispersal, then choose another quadrant and remove 1.5 cm to 3.0 cm of soil for up to 6 m.
- If the first quadrant chosen is an odd numbered quadrant (1st or 3rd), then the next quadrant must be an even numbered one. This procedure, which must also be applied to the last two distances, is essential in order to ensure a reasonable sampling of pupae and larvae in the area around the cadaver and to provide a more accurate estimate of the PMI.

Hence, when assessing post-feeding larval dispersal, the main features to be considered include competition amongst the larvae of different species for food or a site for pupation, the type of soil, the way in which the corpse died, abiotic factors, the influence of predators and/or parasitoids and the geographic area topography where the murder occurred. The most helpful studies when undertaking such an investigation are those of Nuorteva (1977), Smith *et al.* (1981), Greenberg (1990), Tessmer and Meek (1996), Von Zuben *et al.* (1996), Gomes *et al.* (2002, 2003, 2004, 2005) and Amendt *et al.* (2004) because they deal with important features of post-feeding larval dispersal.

ACKNOWLEDGMENTS

Leonardo Gomes was supported by a fellowship from FAPESP (03/00540-3) and Cláudio José Von Zuben by a research fellowship from CNPq. The authors thank to Iracema Monteiro da Silva and Guilherme Gomes for help in collecting data. To the referees by the comments to improve this manuscript and to Dr. Stephen Hyslop by revising the English manuscript.

References

- Amendt J, Krettek R, Zehner R (2004) Forensic Entomology. *Naturwissenschaften* 91: 51-65.
- Andrade J B, Rocha F A, Rodrigues P, Rosa G. S, Faria L D B, Von Zuben C J, Rossi M. N., Godoy W A C (2002). Larval dispersal and predation in experimental populations of *Chrysomya albiceps* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 1137-1140.
- Atkinson W D, Shorrocks B (1981) Competition on a divided and ephemeral resource: a simulation model. *J of Anim Ecol* 50: 461-471.
- Bass B (1997) The body farm. *Popular Science* September: 76- 82.
- Bassanezi R C, Leite M B F, Godoy W A C, Von Zuben C J, Von Zuben F J, Reis S F (1997). Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*: 92: 281-286.
- Benecke M (1998) Six forensic entomology cases: description and commentary. *J For Sci* 43: 797- 805.
- Berrigan D, Pepin D J (1995) How maggots move- allometry and kinematics of crawling in larval Diptera. *J Ins Phys* 41: 329- 337.
- Boldrini J L, Bassanezi R C, Moretti A C, Von Zuben C J, Godoy W A C, Von Zuben F J, Reis S F (1997) Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. *J Theor Biol* 185: 523-531.
- Bornemissza G F (1957) An analysis of arthropod succession in carrion and effect of this decomposition on the soil fauna. *Aust J Zool* 5: 1-12
- Coe M (1978) The decomposition of elephant carcasses in the Tsavo (east) National Park, Kenya. *J. Arid Envir* 1: 71-86.
- de Jong G (1976) A model of competition for food. I. Frequency-dependent viabilities. *Am Nat* 110:1013-1027.
- Faria L D B, Orsi L, Trinca L A, Godoy W A C (1999) Larval predation by *Chrysomya albiceps* on *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria*. *Entomol Exp Appl* 90: 149-155.
- Faria L D B, Godoy W A C (2001) Prey choice by facultative predator larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 875-878.

- Gaines S D, Bertness (1993) The dynamics of juvenile dispersal: why field ecologists must integrate. *Ecology* 74: 2430-2435.
- Godoy W A C, Reis S F, Von Zuben C J, Ribeiro O B (1993) Population Dynamics of *Chrysomya putoria* (Wied.) (Dip., Calliphoridae). *J Appl Entomol* 116: 163- 169.
- Godoy W A C, Fowler H G, Von Zuben C J, Ziti L, Ribeiro O B (1995) Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J Appl Entomol* 119: 263-266.
- Godoy W A C, Reis S F, Von Zuben C J (1996) Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. *J Appl Entomol* 120: 423-426.
- Godoy W A C, Von Zuben, C J, Reis S F, Von Zuben S F (1996) Dynamics of experimental populations of native and introduced blowflies (Diptera: Calliphoridae): Mathematical Modelling and the transition from asymptotic equilibrium to bounded oscillations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 641- 648.
- Gomes L, Von Zuben C J, Govone J S (2002) Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. *Entomol Vect* 9: 115 - 132.
- Gomes L, Von Zuben C J, Sanches M R (2003) Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). *Rev Bras Entomol* 47: 229-234.
- Gomes L, Von Zuben C J (2004) Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. *Iheringia. Série Zoologia* 94: 135 - 138.
- Gomes L, Sanches M R, Von Zuben C J (2005) Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). *J Ins Behav* 18 (2) 281- 292.
- Gomes L, Von Zuben C J (2005) Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *For Sci Intern* (in press).

- Goodbrod J R, Goff M L (1990) Effects of larval pupation density on rates of development and interactions between two species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture. *J Med Entomol* 27: 388- 343.
- Green A A (1951) The control of blowflies infesting slaughter- houses. I. Field observations of the habits of blowflies. *Ann Appl Biol* 38: 475.
- Greenberg B (1990) Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera). *Ann Entomol Soc America* 83: 1210-1214.
- Greenwood P J, Harvey P H (1977) Feeding strategies and dispersal of territorial passerines: a comparative study of the blackbird *Turdus merula* and the greenfinch *Carduelis chloris* *Ibis* 119: 528- 531.
- Hanski I (1987) Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol Entomol* 12: 257-266.
- Hengeveld R (1989) Dynamics of biological invasions. New York: Chapman & Hall, 160 p.
- Introna F, Campobasso C P, Di- fazio A (1998) Three case studies in forensic entomology from southern Italy. *J For Sci* 43: 210- 214.
- Kocarek P (2001). Diurnal patterns of postfeeding larval dispersal in carrion blowflies (Diptera, Calliphoridae). *Eur J Entomol* 98: 117-119
- Legner E F (1977) Temperature, humidity and depth of habitat influencing host destruction and fecundity of muscoid fly parasites. *Entomophaga* 22: 199-206.
- Levot G W, Brown K R, Shipp E (1979) Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. *Bull Ent Res* 69: 469-475.
- Lomnicki, A. (1988) Population ecology of individuals. Princeton: Princeton Press, 233 p.
- Lundt H (1964) Ecological observations about the invasion of insects into carcasses buried in soil. *Pedobiologia* 4: 158- 180.
- Martínez- Sánchez A, Rojo S, Marcos- García M A (2000) Annual and spatial activity of dung flies and carrion in a Mediterranean holm- oak pasture ecosystem. *Med Vet Ent* 14: 56- 63.
- Mueller L D (1988) Density- dependent population growth and natural selection in food- limited environments: the *Drosophila* model. *Am Nat* 132: 786- 809

- Nuorteva P (1977) Sarcosaphrophagous insects as forensic indicators, pp. 1072- 1075. In c. G Tedeshi, W G Echert, L G Tedeshi [eds.], Forensic medicine: a study in trauma and environmental hazards, vol. 2 Saunders, Philadelphia.
- Omar B, M A Marwi, Oothuman P, Othman H F (1994) Observations on the behaviour and adults of some Malaysian sarcosaprophagous flies. Trop Biomed 11: 149- 153.
- Peschke K, Krapf D, Fuldner D (1987) Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. Zool Jb Syst 114: 241-265.
- Prout T, Mcchesney F (1985) Competition among immatures affects their adult fertility: population dynamics. Am Nat 126: 521- 558.
- Reis S F, Stangenhuis G, Godoy W A C, Von Zuben, C J, Ribeiro O B (1994) Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). Rev Bras Entomol 38: 33-34.
- Reis S F, Teixeira M A, Von Zuben F J, Godoy W A C, Von Zuben C J (1996) Theoretical dynamics of experimental populations of introduced and native blowflies (Diptera: Calliphoridae). J Med Ent 33: 537- 544.
- Reis S F, Von Zuben C J, Godoy W A C (1999) Larval aggregation and competition for food in experimental populations of *Chrysomya putoria* (Wied.) and *Cochliomyia macellaria* (F.) (Diptera: Calliphoridae). J Appl Entomol 123: 485- 489.
- Shorrocks B (1991) Competition on a divided and ephemeral resource: a cage experiment Biol J Linnean Soc 43: 211- 220.
- Smith P H, Dallwitz R, Wardhaugh K G, Vogt W G, Woodburn T L (2001) Timing of larval exodus from sheep and carrion in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. Ent Exp Appl 30: 157- 162.
- Smith K G V (1986) A Manual of Forensic Entomology. Cornell University Press, Ithaca. 205p.
- Taylor L R (1984) Assessing and interpreting the spatial distribution of insect populations. Ann Review Entomol 29: 321- 357.
- Teixeira M A, Von Zuben F J, Godoy W A C, Von Zuben C J, Reis S F (1998) Delayed density dependence at the immature stage in insects and the dynamic behavior of nonlinear difference equations. Ciência & Cultura 50: 268- 272.

- Tessmer J W, Meek C L (1996) Dispersal and distribution of Calliphoridae (Diptera) Immatures from animal carcasses in Southern Louisiana. *J Med Entomol* 33: 665-669.
- Tilman D, Kareiva P (1997) *Spatial Ecology. The role of space in population dynamics and interspecific interactions. Monographs in population biology 30.* Princeton, Princeton University Press.
- Turchin P (1998) Population consequences of aggregative movement. *J Anim Ecol* 58: 75- 100.
- Ullyett G C (1950) Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Phil Trans Real Soc London B234*: 77-174.
- Vogt W G, Woodburn T L (1982) Dispersal of post- feeding larvae of *Lucilia cuprina* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *J Aust Entomol Soc* 21: 289- 291.
- Von Zuben C J, Bassanezi R C, Reis S F, Godoy W A C, Von Zuben F J V (1996) Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. *J Appl Entomol* 120: 379-382.
- Von Zuben C J (1998) Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). *An Soc Entomol Brasil* 4: 525-533.
- Von Zuben C J, Von Zuben F J, Godoy W A C (2001) Larval competition for patchy resources in *Chrysomya megacephala* (Dipt., Calliphoridae): implications of the spatial distribution of immatures. *J Appl Entom* 125 : 537- 541.
- Waser P M (1985) Does competition drive dispersal? *Ecology* 66: 1170- 1175.
- Wells J D, Greenberg B (1992) Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. *Bull Entomol Res* 82: 133-137.
- Wiens J A (1976) Population responses to patchy environments. *Ann Rev Ecol Syst* 7: 81-120 .
- Wolfenbarger D O (1946) Dispersion of small organisms. *The Am Mid Natur.* 35: 1-152.

CAPÍTULO 2

THE EFFECT OF SUBSTRATE OF PUPATION ON THE POSTFEEDING RADIAL DISPERSAL IN LARVAE OF *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): IMPLICATIONS FOR FORENSIC ENTOMOLOGY.

Revista Brasileira de Entomologia (aceito mediante modificações)

The effect of substrate of pupation on the postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology.

ABSTRACT. Blowflies utilize discrete and ephemeral breeding sites for larval nutrition. After the exhaustion of food, larvae begin dispersing in search of sites to pupate, a process referred as postfeeding larval dispersal. Some of the most important aspects of this process were investigated in the blowfly *Chrysomya megacephala*, employing a circular arena to allow radial dispersion of larvae from the center. The results showed a weak positive correlation between burial depth and distance, and a weak negative correlation between distance and pupal weight. These results can be used in forensic entomology for the postmortem interval estimation of human corpses in medico-criminal investigations, since the presence of larvae and pupae in the vicinities or under human corpses can aid in estimating their postmortem intervals (PMI). The evaluation of PMI is one of the most important aspects of legal medicine, and it could be underestimated if the older dispersing larvae or those that disperse longer and faster or deeper, are not taken into account. Because of this, it is necessary to investigate the pattern of larval dispersal on the pupation site, as demonstrated in this study with larvae of *C. megacephala*.

Keywords: blowfly; *Chrysomya megacephala*, forensic entomology; larval dispersal.

* *corresponding author: leugomes@yahoo.com.br*

O efeito do substrato de pupação na dispersão radial pós-alimentar em larvas de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae): implicações para entomologia forense.

RESUMO. Moscas-varejeiras utilizam substratos discretos como locais para alimentação das larvas. Após a exaustão do alimento, as larvas começam a dispersar por locais para empupar, um processo conhecido como dispersão larval pós-alimentar. Alguns desses mais importantes aspectos desse processo foram investigados em larvas de mosca-varejeira *Chrysomya megacephala*, empregando uma arena circular que permitisse a dispersão radial das larvas a partir do centro. Os resultados demonstraram uma correlação fraca e positiva entre a profundidade de enterramento e a distância, uma correlação fraca e negativa entre a distância e o peso de pupação. Esses resultados podem ser utilizados em entomologia forense para se estimar o intervalo pós-morte em cadáveres humanos em investigações médico-legais, uma vez que a presença de larvas e pupas nas vizinhanças ou sob o corpo podem ajudar nessa estimativa (IPM). A estimativa do IPM é um dos aspectos mais importantes em medicina legal, e pode ser subestimado se as larvas mais velhas que dispersaram ou aquelas que dispersaram mais longe ou mais profundamente, não foram levadas em conta. Por causa disso, é necessário investigar tais padrões de dispersão larval e empupação nos locais, como demonstrado nesse estudos com larvas de *C. megacephala*.

PALVRAS-CHAVES: *Chrysomya megacephala*, dispersão larval, entomologia forense, moscas-varejeiras.

Introduction

Calliphoridae dipterans present a great ecological diversity and occupy a variety of habitats. They develop in various substrates, from decomposing organic matter to living animal tissues (Zumpt, 1965). Flies of the genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) originating from Africa and Australasia and were probably introduced into the American continent by ships (Guimarães *et al.* 1978, 1979). In 1975, 20 years after the accidental escape of African bees in southeast Brazil, three species of *Chrysomya*, *C. megacephala* (Fabricius), *C. albiceps* (Wiedemann) and *C. putoria* (Wiedemann) collected in the same region (Imbiriba *et al.* 1977; Guimarães *et al.* 1978).

Flies in the genus *Chrysomya* have great medico-sanitary importance as they carry enteropathogens such as viruses, bacteria and helminths (Furlanetto *et al.* 1984;

Lima & Luz, 1991) and they may cause myiasis to animals and men (ZUMPT, 1965; Guimarães *et al.* 1983). They are also of fundamental importance in forensic entomology studies, because they can be indicators of the decomposition time of human cadavers (Greenberg, 1990; Von Zuben, 1996; Gomes & Von Zuben 2005).

Chrysomya flies have drawn attention for being an exotic species and for their impact on the native community of necrophagous dipterans (Wells & Greenberg 1992). The impact caused by the introduction of exotic species is interesting both to ecologists and evolutionists who study the process of these invasions, which include competition, predation and dispersal as well as stability and extinction of local populations (Hengeveld 1989). The understanding of the phenomena of competition, predation and dispersal involved in this invasion process depends on the study of certain population parameters (such as distance and depth) and the space-time environmental structure in which these phenomena occur (Wiens 1976; Hengeveld 1989). In addition there are phenomena that occur on a small spatial scale such as the dispersal of immature stages of the invading organisms. In the context of the invasion of exotic species and in the specific case of the necrophagous flies, post-feeding larval dispersal in search of a pupation site is of ecological interest.

The substrates in which blowflies develop are discrete and ephemeral (Backer, 1961, 1969; Atkinson & Shorrocks, 1981; Ives, 1989; Hanski, 1987). Normally these substrates are saturated with insects of one or more species, involving an intense competition for resources (Hanski, 1987).

The larval stage is the main period when blowflies experience limited food resources. The competition for these resources is generally of the exploitative type (Levot *et al.* 1979; Reis *et al.* 1994), where each larva attempts to feed as much as possible before the complete exhaustion of resources (Ullyett, 1950; Lominicki, 1988).

Following this competition, the larvae begin to search for a pupation site in the habitat or for another source of food if they do not have enough weight for pupation. This process is called post-feeding larval dispersal (Greenberg, 1990).

Some experimental studies on calliphorid larval dispersal have already been done (Greenberg, 1990; Gomes & Von Zuben, 2005; Kocareck, 2001) and models on post-feeding larval dispersal restricted to one direction based on diffusion equations have been developed (Bassanezi *et al.*, 1997), on statistical analyses of spatial

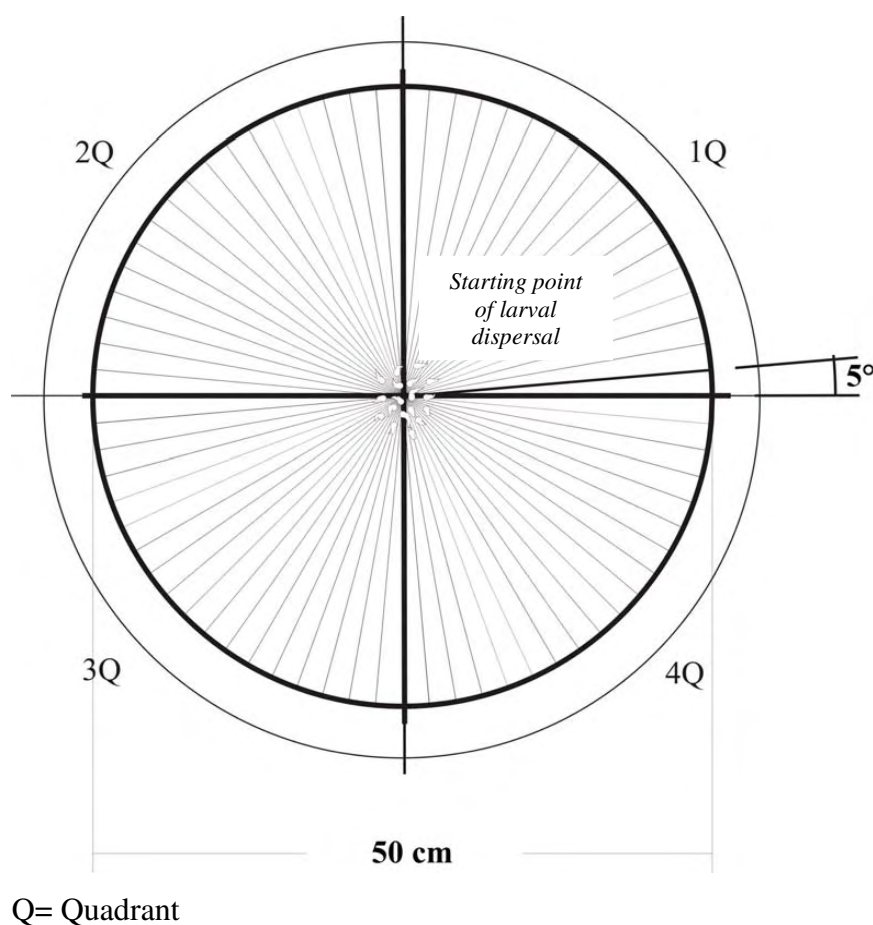
distribution (Godoy *et al.* 1995; Von Zuben *et al.*, 1996), and on non-local interactions (Boldrini *et al.*, 1997). All of these are a basis for future experimental studies simulating the natural environment, as proposed in this study.

With the use of a circular arena, this study reflects better the conditions of the natural environment the larvae will face when they abandon their feeding substrate in search of a site to pupate when compared with previous studies (Greenberg, 1990; Godoy *et al.* 1995). A circular arena allows a radial dispersal from a central feeding substrate unlike the dispersal in only one direction allowed by a trough.

The objective of the present study was to investigate, under experimental conditions simulating the natural environment, the radial dispersal in larvae of *C. megacephala*, to establish a relationship among weight, burial distance and depth for the larvae, in an arena covered with vermiculite allowing movements in all directions to evaluate if this species have a different pattern in this kind of dispersal and burial behavior and to compare with previous studies that used a arena covered with sawdust (Gomes & Von Zuben, 2003).

Material and Methods

Adults of *C. megacephala* were collected with carrion fish baits in the Biosciences Institute of UNESP, at Rio Claro, São Paulo, Brazil. The specimens collected were identified and kept at temperatures of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% relative humidity and 12h photoperiod. Adult females were fed fresh beef liver to allow them to complete their gonotrophic cycle. Larvae emerging from these ovipositions were raised on three vials containing ground bovine meat. Each one of these vials, with 920 larvae (the average of 930, 910 and 920 of three trials), was placed in the center of the arenas, prior to larval dispersal (Fig. 1).



2m

Fig. 1. Scheme of the experiment performed where the larvae were put in the center and after dispersal were collected yours pupae.

Three circular arenas were built on the floor of a laboratory room, totally isolated from lighting, with windows closed and the temperature controlled (25° C and 60% of Relative Humidity), both 2 m in diameter and 5 cm deep, covered with vermiculite and limited by a cardboard margin. In spite of the construction of an arena with 2 m in diameter does not represent the real situation in crime scene, because the larvae can move far to 1m of the center, the aim of this study was to check the dispersal and burial behavior of larvae near the center of dispersal, what can be useful for forensic entomologists which are searching for pupae near of the cadaver and compare with other studies, with arenas 50cm in diameter and 20 cm in depth (Gomes & Von Zuben, 2005).

After pupation, the arena was divided into 72 sectors of 5 degrees each, and the pupae were located, their distance from the center of the arena as well as the depth from the surface were determined. Each pupa was weighed, isolated in an *Eppendorf* bottle, and after emerging, the adult's sex was determined.

Statistical analysis

The Pearson correlation was performed to analyze the correlation among variables and ANOVA test to check the difference among three experiments and groups (Zar, 1999).

Results

No significant difference among replications was found for three arenas and thus the data were pooled. The ANOVA test for three replications for *C. megacephala* showed that distance ($F= 3,7$ and $p= 0,54$ significantly), depth ($F= 6,5$ and $p= 0,65$ significantly) and weight ($F= 2,8$ and $p= 0,47$ significantly) between and within groups were not different. The mean values and standard deviations for burial depth, distance and weight for pupation, considering three arenas combined, are shown in Table 1.

Table 1. Depth, distance and weight (average and standard deviation) for 920 pupae of *Chrysomya megacephala* in an arena of 2 m in diameter.

	SEX	Media	Standard deviation	Minimum	Maximum	Number of pupae
DISTANCE (cm)	Undetermined	40,60	35,50	0	1	20
	Male	42,16	31,67	0	98	483
	Female	46,17	32,43	0	1	417
	Total	43,94	32,13	0	98	920
DEPTH (cm)	Undetermined	3,25	1,37	0	5	20
	Male	3,49	1,14	0	5	483
	Female	3,57	1,15	0	5	417
	Total	3,52	1,15	0	5	920
WEIGHT (mg)	Undetermined	57,38	6,12	48,2	71,6	20
	Male	56,99	8,32	27,9	84,9	483
	Female	56,70	7,68	31,5	76,5	417
	Total	56,87	7,99	27,9	84,9	920

The great majority of larvae buried themselves near the center of an arena, but there are so much larvae (13%) that reached the maximal distance. Moreover, the correlation between weight and traversed distance was significant and negative (-0.136 , $P = 0.0003$) and between distance and depth was significant and positive (0.140 , $P = 0.0003$), indicating that the greater the larval weight, the shorter the dispersal distance and the greater dispersal distance the deeper the larvae bury (Table 2).

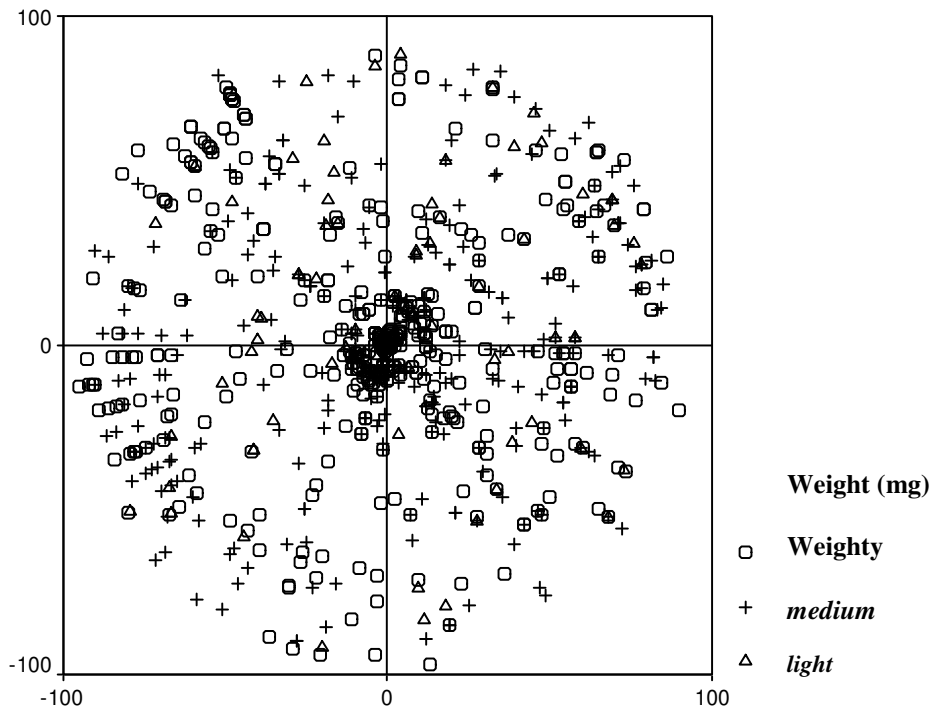
Table 2: Pearson correlation among variables analyzed of larvae of *C. megacephala*.

		Distance (cm)	Depth (cm)	Weight (mg)
Pearson correlation	distance		0.140**	-0.136**
	depth	0.140**		-0.58
	weight	-0.136**	-0.58	
Sig. (2- tailed)	distance		0.000	0.000
	depth	0.000		0.078
	weight	0.000	0.078	
N	distance	920	920	920
	depth	920	920	920
	weight	920	920	920

** Correlation is significant at the 0.01 level (2- tailed).

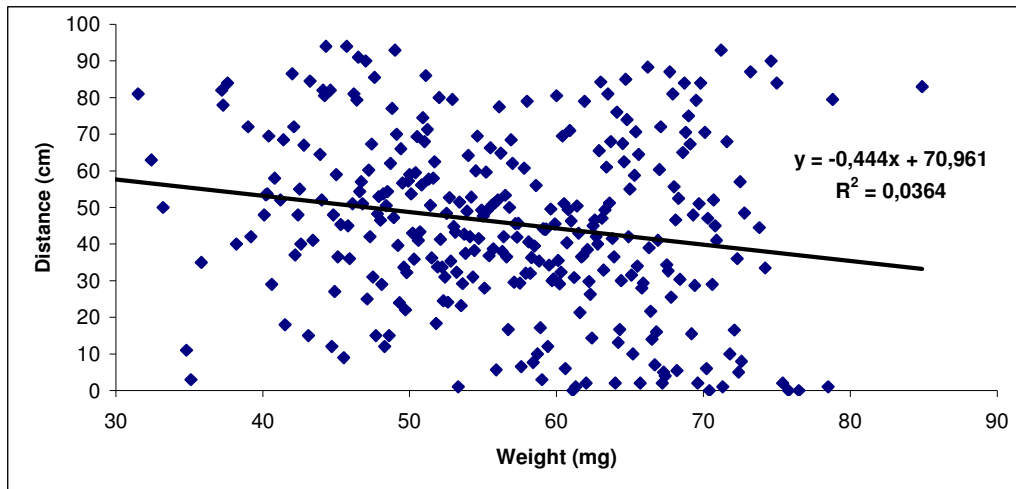
It was the same pattern when compared with the previous study of Gomes & Von Zuben (2003). To understand better these relations, Fig. 2 shows the distribution of larvae in arena according to three intervals of weight, i.e. therefore: *light*, *medium* and *heavy*.

Fig. 2. Spatial distribution of 920 pupae of *C. megacephala* according to the interval of weight (weight < 47mg [*light*], 47mg < weight < 56 mg [*medium*] and weight >56 mg [*heavy*]). * Note that some data are superimposed.



Regarding the very weak correlation ($R^2 = 0.0364$), useful to do some previsions about correlation between burial distance and weight, when some data are being collected, it was observed that Fig. 3, the smaller was the average pupal weight, the greater the distance dispersed.

Fig. 3. Pupal weight (horizontal axis) X distance of burying (vertical axis).



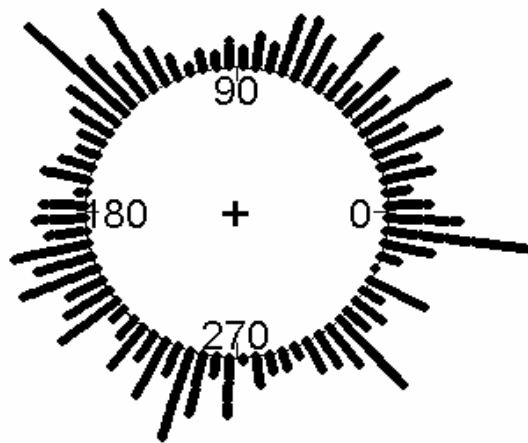
The ANOVA test for sex and the other variables showed that there were not differences (Table 3).

Tabela 3: Result of the Anova test to check for differences among the independent variables.

ANOVA Table							
			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Distance (cm) * Sex	Between Groups	(Combined)	3824	2	1911,76	1,85536	0,2569
	Within Groups		943845	916	1030,40		
	Total		947669	918			
Dept (cm) * Sex	Between Groups	(Combined)	3	2	1,39	1,04877	0,3507
	Within Groups		1210	915	1,32		
	Total		1213	917			
Weight (mg) * Sex	Between Groups	(Combined)	24	2	11,80	0,18468	0,8313
	Within Groups		58542	916	63,91		
	Total		58566	918			

Directional movement was established, and the length of media vector was 0.0025, and the analysis of the direction of media vector was 63.66° (Fig. 4). Thus, by the Watson test, is indicated that larvae had a negative uniformity, i.e., the larvae dispersed randomly in the arena.

Fig. 4. Directional distribution of larvae of *C. megacephala* in arena



Discussion

Dispersal is one of the most significant aspects in the life history of insects. The complexity of dispersal is further enhanced by the spatial scale in which it occurs, which may vary from centimeters to hundreds of kilometers (Gaines & Bertness, 1993)). The present study demonstrated some general aspects on the dispersion process of larvae of *C. megacephala* in a circular arena and confirmed results using arenas covered with sawdust, where the lightest larvae tend to move longer distances (Gomes & Von Zuben, 2003). It means that the kind and compactness of substrate for pupation

does not affect the pattern of larval dispersion and in natural conditions, the compactness of soil could not affect this pattern (personal observation, not published).

Apparently, what limited larval movement the most in this study was depth, not distance from the center. The use of an arena with 2 m in diameter and 5 cm of depth allowed the larvae traveled further before burial longer distances those of than other recent studies, where the arena had 50 cm in diameter and 20 cm depth (Gomes *et al.* 2003; Dimou *et al.* 2001).

Larval movement from the substrate probably took place mainly to find a pupation site, even though the possibility that some, smaller larvae were searching for an additional source of food can not be discarded (Gomes *et al.* 2003; Gomes & Von Zuben, 2003). Thus, the smaller larvae would be at a disadvantage when competing for a pupation site, and would be going over greater distances to pupate or in search of an additional food source (Greenberg, 1990; Gomes *et al.* 2003; Gomes & Von Zuben, 2003)

The results probably mean that larvae do not have any preference in distributing themselves in the quadrants. Meanwhile, this aspect of larval distribution must be confirmed in future experiments identifying the factors that initiate larval dispersal (e.g., competition, feeding or running out of food resources) from a carcass and subsequently contribute to distance and directional movements of the larvae. However, to determine such factors would be of interest for forensic entomology and this represents an obviously complex question, requiring a study with additional species and possible influences of overwintering and diapause behavior, parasite- predator pressure, and soil conditions.

For blowflies of the genus *Chrysomya*, there is a variation in the frequency of pupae buried in the substrate as a function of distance from the food substrate (Godoy *et al.* 1995). According to Boldrini *et al.* (1997), these variations would be a consequence of a larval perception of larval density in a particular site of substrate; great aggregations of larvae in central point of dispersal (like the center of arena in this study) would induce those still moving to search for farther sites to pupate.

These former studies had considered a trough 3 m long and 30 cm wide for the larval dispersion process, allowed larval movements in only one direction. With the use

of a circular arena, this study reflects better the conditions of the natural environment the larvae will face when they abandon their feeding substrate in search for a site to pupate (Ullyett, 1950).

These dispersion studies could have implications for the population ecology of insects, because the dispersion behavior will directly interfere on a greater or lesser susceptibility of larvae and pupae to predators and parasitoids (Greenberg, 1990; Dimou *et al.*, 2001), because the old larvae dispersing at night will probably not be predated like the ones dispersing at day or the larvae that started dispersing in searching for a site and not for a new food resource. The analysis of postfeeding larval dispersal of blowflies has important implications for medico-criminal investigations considering forensic entomology, since the presence of larvae and pupae in the vicinities or under human corpses can aid in estimating their postmortem intervals (PMI) (Smith, 1986).

This dispersal was compared with that have been used wood shavings. Under these conditions, the larvae that dispersed farthest weighed the least, in contrast to other studies (Gomes *et al.*, 2003). In addition, most individuals burrowed to a depth of 7-12 cm before pupating, in contrast to the study by Gomes *et al.* (2003) in which most larvae burrowed to a depth of 10-15 cm before pupation. Thus, this kind of study with patterns of substrate for pupation could be too important in the evaluation of PMI, because the type of substrate clearly affected the depth of burrowing but not the pattern of post-feeding larval dispersal and it is the most important to know to evaluate the PMI.

This evaluation is one of the most important aspects of legal medicine (Smith, 1986), and it could be underestimated if the older dispersing larvae or those that disperse longer and faster or deeper, are not taken into account (Greenberg, 1990; Gomes & Von Zuben, 2005). Because of this, it is necessary to investigate the pattern of larval dispersal on the pupation site, as demonstrated in this study with larvae of *C. megacephala*.

Acknowledgements

To FAPESP by the financial support (Process 03/00540-3).

References

- Atkinson, W.A. & B. Shorrocks. 1981. Competition on a divided and ephemeral resource: a simulation model. *Journal of Animal Ecology* 50: 461-471.
- Backer, K. 1961. An analysis of factors which determine success in competition for food among larvae of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Need. Zool.* 14: 200-281.
- Backer, K. 1969. Selection for rate of growth and its influence on competitive ability of larvae of *Drosophila melanogaster*. *Netherland Journal of Zoology* 19: 541-595.
- Bassanezi, R. C., M. B. F. Leite, W. A. C. Godoy, C. J. Von Zuben, F. J. Von Zuben & S. F. Reis. 1997. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersal in blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92: 281-286.
- Boldrini, J.L., R. C. Bassanezi, A. C. Moretti, C. J. Von Zuben, W. A. C. Godoy, F. J. Von Zuben & S. F. Reis. 1997. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. *Journal of Theoretical Biology* 185: 523-531.
- Dimou, I., Koutsikopoulus, A. P., Economopoulus, A. P. & Lykakis, J. 2001. Depth of pupation of the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmel.) (Dipt., Tephritidae), as affected by soil abiotic factors. *Journal of Applied Entomology* 127: 12-17.
- de Jong, G. 1976. A model of competition for food. I. Frequency-dependent viabilities. *American Naturalist* 110:1013-1027.
- Furlanetto, S.M.P., M. L. C. Campos, C. M. Hársi, G. M. Buralli & G. K. Ishihata. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15: 170-174.
- Gaines, S.D. & Bertness. 1993. The dynamics of juvenile dispersal: why field ecologists must integrate. *Ecology* 74: 2430-2435
- Godoy, W.A.C., H. G. Fowler, C. J. Von Zuben, L. Ziti and O. B. Ribeiro. 1995. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Applied Entomology* 119: 263-266.
- Gomes, L. & C. J. Von Zuben. 2003 Dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Profundidade, Distância e Peso de enterramento para pupariação. *Bioscience Journal* 18: 67-76.

- Gomes, L. & C. J. Von Zuben. 2005. Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *Forensic Science International* (in press).
- Gomes, L. C. J. Von Zuben & M. R. Sanches. 2003. Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 229-234.
- Guimarães, J. H., A.P. Prado & A.X. Linhares. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22: 53-60.
- Guimarães, J.H., A. P. Prado and G. M. Buralli. 1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 23: 245-255.
- Guimarães, J.H., N. Papavero & A. P. Prado. 1983. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 239-416.
- Greenberg, B. 1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and a muscid (Diptera). *Annals of Entomological Society of America* 83: 1210-1214.
- Hanski, I. 1987. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol. Entomol.* 12: 257-266.
- Hengeveld, R. 1989. *Dynamics of biological invasions*. Chapman & Hall, New York.
- Imbiriba, A.S., D. T. Izutani, I. T. Milhoreto & E. Luz. 1977. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 20: 35-39.
- Ives, A.R. 1989. The optimal clutch size of insects when many females oviposit per patch. *American Naturalist* 133: 671-687.
- Ives, A. R. 1991. Aggregation and coexistence in a carrion fly community. *Ecol. Mon.* 61: 75-94.
- Kocarek, P. 2001. Diurnal patterns of postfeeding larval dispersal in carrion blowflies (Diptera, Calliphoridae). *European Journal of Entomology* 98: 117-119
- Levot, G.W., K. R. Brown & E. Shipp. 1979. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. *Bulletin of Entomological Research* 69: 469-475.

- Lima, M.L.P.S. & E. Luz. 1991. Espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) como veiculadoras de enterobactérias patogênicas em Curitiba, Paraná, Brasil. *Acta Biológica do Paraná*. 20: 61-83.
- Lomnicki, A. 1988. Population ecology of individuals. Princeton: Princeton Press, 233 p.
- Reis, S.F., G. Stangenhuis, 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). *Revista Brasileira de Entomologia* 38: 33-34.
- Smith, K.G.V. 1986. A manual of forensic entomology. Ithaca : Cornell University Press, 475p.
- Ulyett, C.G. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B234*: 77-174.
- Von Zuben, C. J., R. C. Bassanezi, S. F. Reis, W. A. C. Godoy & F. J. Zuben. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. *Journal of Applied Entomology* 120: 379-382.
- Wells J. D. & B. Greenberg. 1992. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. *Bulletin of Entomological Research* 82: 133-137.
- Wiens, J.A. 1976. Population responses to patchy environments. *Annual Review of Ecological and Systematics* 7: 81-120 .
- Zar, J.H.1999. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, New Jersey.
- Zumpt, F. 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths, London.

CAPÍTULO 3

**ANÁLISE DO EFEITO DO TIPO DE SUBSTRATO PARA PUPAÇÃO NA
DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR EM *CHRYSOMYA ALBICEPS*
(WIEDEMANN) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE).**

Entomologia y Vectores. 2005. No prelo

ANÁLISE DO EFEITO DO TIPO DE SUBSTRATO PARA PUPAÇÃO NA DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR EM *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)

Abstract

Analysis of the effect of the kind of substrate for pupation in the postfeeding larval dispersal in *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae)- Blowflies utilize discrete and ephemeral sites for breeding and for larval nutrition. After the exhaustion of food, the larvae begin dispersing to search for sites to pupate or to find additional food source, process referred as postfeeding larval dispersal. The kind of substrate can affect this process and some of its aspects were investigated in *Chrysomya albiceps* in this work, utilizing a circular arena covered with vermiculite to permit the radial dispersion of larvae from the center and to compare with others studies with wood shavings. To determinate the localization of each pupa, the arena was split in 72 equal sectors from the center. For each pupa, distance from the center of arena, weight and depth of burying were determined. Statistical tests of regression, correlation and equality of averages at 95% of significance and directional analysis for variables were performed, to verify the relation among weight, depth and distance of burying for pupation. Differences between sexes in relation to variables of distances traveled, weight and depth for pupation were analysed using the Kruskal-Wallis test. It was verified that the larvae that most disperse are those with lower weights, what confirm the other studies. The majority of individuals reached the distance for burying for pupation between 5 and 20 cm (21,39 cm in average). The study of this process of dispersion can be utilized in the estimation of postmortem interval (PMI) for human corpses in medico-criminal investigations.

Key words: Blowflies, Calliphoridae, *Chrysomya albiceps*, substrate for pupation, larval dispersal

Resumo

Moscas-varejeiras utilizam substratos discretos e efêmeros para reprodução e para nutrição larval. Após a exaustão do alimento, as larvas começam a se dispersar à procura de locais para pupação ou de fonte adicional de alimento, processo denominado de dispersão larval pós-alimentar. O tipo de substrato pode afetar esse processo e alguns de seus aspectos foram investigados em *Chrysomya albiceps* neste trabalho, utilizando uma arena circular coberta com vermiculita, a fim de permitir a dispersão radial larval a partir do centro e comparar com outros estudos. Para determinar a localização de cada pupa, a distância a partir do centro da arena, o peso e a profundidade de enterramento foram determinados. Testes estatísticos de regressão e correlação a 95% de confiança e análises direcionais para as variáveis estudadas foram feitos para verificar a relação entre peso, profundidade e distância de enterramento para pupação. Diferenças entre sexos quanto às distâncias percorridas, peso e profundidade de enterramento foram feitas com uso do teste de Kruskal-Wallis. Foi verificado que as larvas que mais dispersam são aquelas com menor peso, o que corrobora os dados obtidos em outros estudos. A maioria das larvas alcançou a distância de enterramento para pupação entre 5 e 20 cm (21,39 em média). O estudo desse processo de dispersão pode ser utilizado na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) para cadáveres humanos em investigações médico-criminais.

Palavras-chave: Moscas-varejeiras, Calliphoridae, *Chrysomya albiceps*, substrato para pupação, dispersão larval

INTRODUÇÃO

Chrysomya albiceps (Wiedemann), originária do continente africano, foi introduzida acidentalmente no Continente Americano provavelmente através de navios (Guimarães *et al.*, 1978; 1979). Em 1975, esta espécie foi descoberta no Sudeste do Brasil juntamente com *C. megacephala* (Fabricius) e *C. putoria* (Wiedemann) (Imbiriba *et al.*, 1977; Guimarães *et al.*, 1978).

As moscas do gênero *Chrysomya* têm grande importância médico-veterinária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos

(Furlanetto *et al.*, 1984), podendo causar também miíases nos animais e no homem (Zumpt, 1965; Guimarães *et al.*, 1983). São de fundamental importância em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (Wells & Greenberg, 1992; Von Zuben *et al.*, 1996; Gomes & Von Zuben, 2004). A introdução de espécies exóticas pode provocar competição por recursos alimentares e por sítios de pupação com espécies nativas (Hengeveld, 1989). Por causa disto, é importante conhecer a escala espacial de dispersão dos estágios imaturos dos organismos invasores.

Moscas-varejeiras utilizam substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos 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, e a competição por esses recursos é, geralmente, do tipo exploratório (Reis *et al.*, 1994), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (Ullyett, 1950). Após esta fase, as larvas começam a procurar um sítio para pupação, ou por fontes adicionais de alimento, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação (Gomes *et al.*, 2002). Tal processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (Greenberg, 1990).

Alguns estudos com dispersão larval pós-alimentar em *C. albiceps* já foram feitos, com a intenção de se observar padrões de distribuição (Gomes & Von Zuben, 2003; Gomes *et al.*, 2002, 2003). Porém, uma das questões levantadas nesses estudos foi se o tipo de substrato influenciaria no processo de dispersão e enterramento para pupação.

Por isso, o objetivo desse trabalho foi estudar sob condições experimentais, em simulação de ambiente natural, a dispersão larval pós-alimentar em *C. albiceps* em uma arena com vermiculita e tentar estabelecer uma comparação com os referidos estudos em que foi usada serragem, além de estabelecer uma relação entre as variáveis peso, distância e profundidade de enterramento.

Material e Métodos

Exemplares adultos de *C. albiceps* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP, utilizando como isca, matéria orgânica em decomposição (carcaça de peixe) e comparados com material testemunho, da coleção entomológica

do Depto de Zoologia, do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro. Os indivíduos coletados foram mantidos em gaiolas teladas, em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% de umidade relativa e fotofase de 12 horas, sendo ministrados água, açúcar e fígado *ad libitum*.

Uma arena circular de 2 m de diâmetro, dividida em 72 setores de 5 graus cada (Fig. 1), foi montada sobre o piso de uma sala do laboratório, iluminada de forma homogênea, sendo forrada com camada de 5 cm de vermiculita, tendo suas margens delimitadas por papelão. No centro da arena circular, foi colocada carne moída com 925 larvas até o 3º instar, e aguardou-se até que elas irradiassem para empupar (Fig. 1).

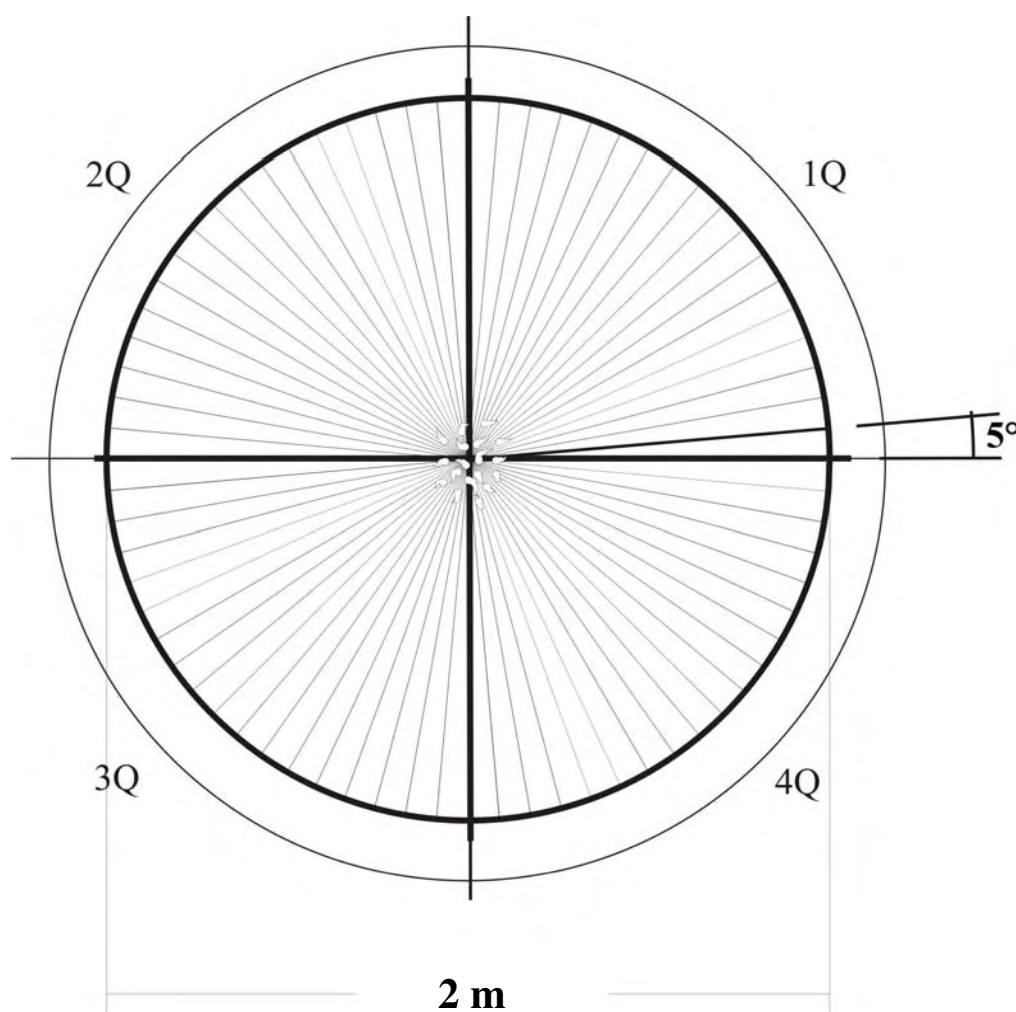


Figura 1: Esquema da arena de 2 m de diâmetro utilizada no presente trabalho (no centro, larvas iniciando a dispersão)

As 925 pupas foram localizadas e retiradas da vermiculita, sendo determinadas as suas localizações por setor, e medidas, para cada uma, a distância e a profundidade do local de pupação, com o auxílio de régua ou trena. Cada pupa foi pesada em balança analítica e individualizada em frascos de plástico, antes que ocorresse a emergência do adulto. Os indivíduos adultos foram sexados.

Para verificar se as distribuições eram normais foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram feitos testes estatísticos de correlação (Spearman) e igualdade de médias (Kruskal-Wallis) a 95% de confiança, além de análises direcionais para as variáveis estudadas (Zar, 1999).

Resultados

Os valores de média e desvio-padrão para (distância em relação ao centro) profundidade de enterramento, da arena e peso, para as 925 pupas nos quatro quadrantes da arena estão representados na Tabela I. Os valores máximos para distância, profundidade e peso foram respectivamente 98 cm, 5 cm e 69,2 mg. O teste de Kolmogorov-Smirnov determinou as seguintes probabilidades para distância, profundidade e peso: 0,743, 0,707 e 0,435, respectivamente, indicando que todas as três variáveis não têm distribuição normal.

Tabela I: Média e desvio-padrão das variáveis analisadas das pupas coletadas de *Chrysomya albiceps*, na arena de 2 m de diâmetro forrada com vermiculita.

	SEXO	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Número de pupas
DISTÂNCIA (cm)	Indeterminado	23,39	22,55	2	85	41
	Macho	21,48	21,94	1	98	432
	Fêmea	21,12	21,29	1	92	452
	Total	21,39	21,63	1	98	925
PROFUNDIDADE (cm)	Indeterminado	3,05	0,92	2	5	41
	Macho	3,01	0,95	1	5	432
	Fêmea	2,98	0,90	0	5	452
	Total	3,00	0,92	0	5	925
PESO (mg)	Indeterminado	50,77	6,35	37,3	62,2	41
	Macho	53,46	6,44	38,5	67,3	432
	Fêmea	53,86	6,40	32,2	69,2	452
	Total	53,53	6,44	32,2	69,2	925

A Figura 2 mostra a distribuição das pupas na arena de uma forma geral. Pode-se observar que a grande maioria das pupas se encontra perto do centro da arena, até a uma distância de 25 cm, como em estudos anteriores (Gomes & Von Zuben 2003). Um número maior de pupas foi encontrado no lado direito do gráfico (lado positivo), como nos estudos de Gomes & Von Zuben (2003).

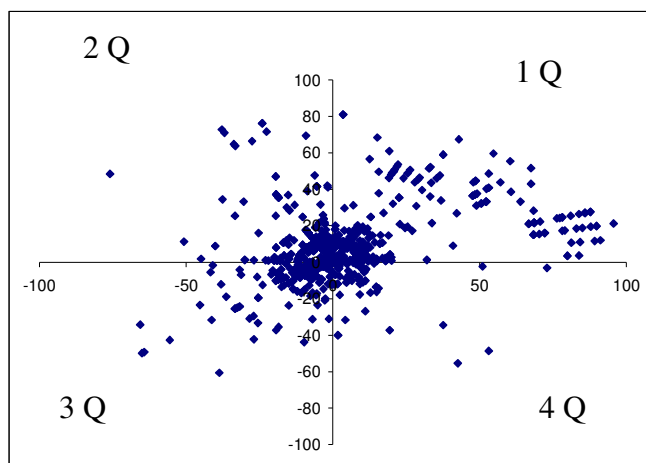


Figura 2: Distribuição das pupas de *Chrysomya albiceps* nos quadrantes (Q) da arena coberta com vermiculita após soltura de 925 larvas do ponto central.

O histograma a seguir (Fig. 3), mostra a distribuição das distâncias percorridas desde o centro da arena, considerando todas as direções. Foi visto que há uma concentração de pupas em distâncias menores e poucas pupas atingiram distâncias maiores, com distribuição leptocúrtica, ou seja, a curtose é maior que zero e não é Normal. De qualquer forma, existe um grupo pequeno de larvas que passaram dos 50 cm.

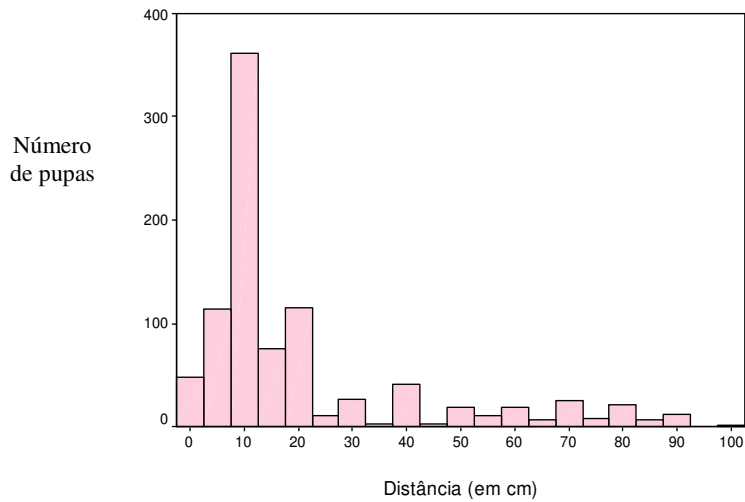


Figura 3: Distribuição das distâncias percorridas pelas larvas de *Chrysomya albiceps* desde o centro da arena

O histograma para a variável peso é mostrado na Figura 4, e indica três tipos de modas. Um tipo leve, com peso em torno de 42 mg, outro de peso médio, com peso em torno de 52 mg e outro com peso maior, com média em torno de 60 mg.

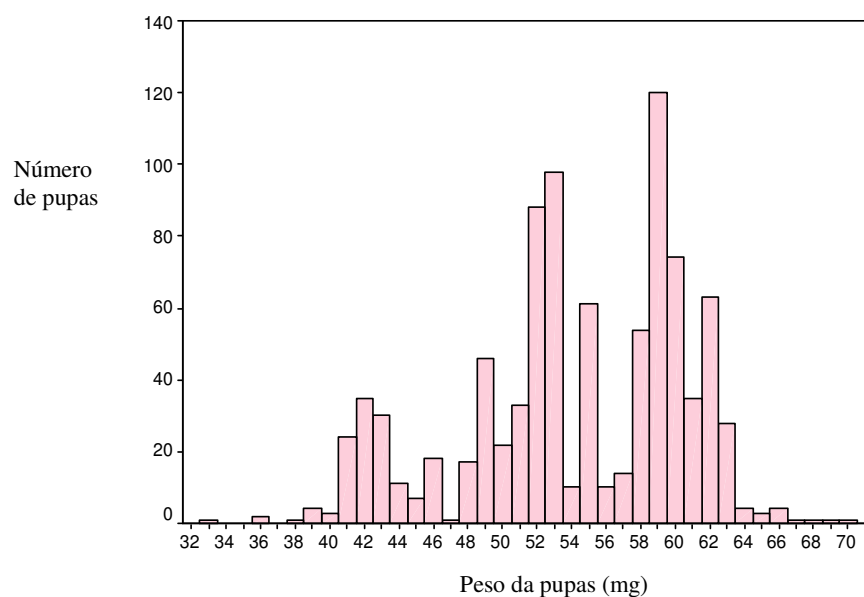


Figura 4: Distribuição do número de pupas de *Chrysomya albiceps* por peso (mg).

É interessante notar que com a profundidade limitada a 5 cm apenas, houve poucas larvas que chegaram na profundidade máxima. Havendo uma granulometria maior da vermiculita, as larvas podem ter tido dificuldades para suplantar esse obstáculo, o que impediu que se enterrassem mais profundamente. Aqui se obteve apenas 5% das larvas na profundidade 5 cm (Fig. 5), enquanto que em estudos anteriores com serragem(Gomes & Von Zuben, 2003), 38% das larvas atingiram 5 cm

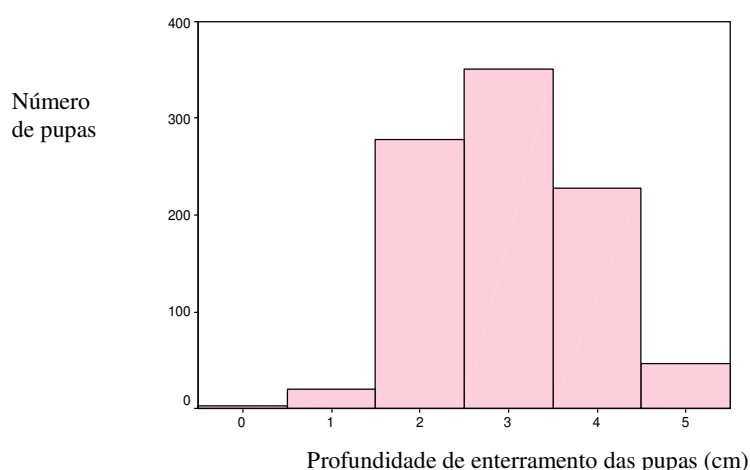


Figura 5: Distribuição do número de pupas de *C. albiceps* por profundidade (cm).

A seguir, tem-se o gráfico de dispersão entre Peso e Distância (Fig. 6), no qual para cada valor de peso calculou-se a média da distância, sempre que havia pelo menos dois valores. Através de uma análise de correlação não paramétrica de Spearman, observou-se que a correlação entre peso e distância é de $-0,44$. Já entre profundidade e distância, é de $0,078$, a 5% de significância, sendo que para profundidade e peso não houve correlação significativa.

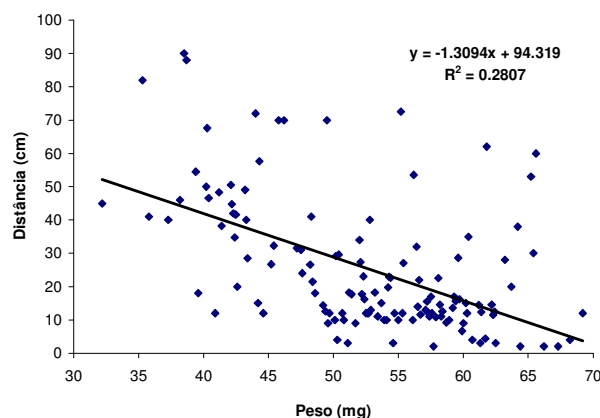


Figura 6: Reta de regressão entre as variáveis peso das pupas e distância percorrida pelas larvas de *C. albiceps*.

Pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, pôde-se constatar que não houve diferença significativa entre as variáveis analisadas, de acordo com o sexo (Tabela II).

Tabela II - Resultados do teste de Kruskal-Wallis das variáveis de acordo com o sexo.

	Distância	Profundidade	Peso
Chi-square	0,108	0,141	0,609
Graus de liberdade	1	1	1
Significância	0,743	0,707	0,435

As análises do comprimento do vetor médio (comprimento = 0,2791), e da direção do vetor médio (direção = 92,01°), indicaram que o teste de uniformidade foi negativo, o que pelo teste de Watson, que indica que entre 95 e 99% de confiança, as larvas não se distribuíram uniformemente na arena.

Discussão

Este estudo demonstrou aspectos gerais sobre o processo de dispersão larval em uma arena circular, e confirmou resultados anteriores obtidos (Gomes & Von Zuben, 2003) em que foram utilizadas arenas com diâmetros e profundidades similares, porém com serragem, como meio para dispersão de larvas de *C. albiceps*. A tendência para um maior deslocamento por larvas com menor peso pode ter ocorrido por estas estarem à procura de nova fonte alimentar (Gomes *et al.*, 2002; 2003; Gomes & Von Zuben, 2003).

Aparentemente, o que mais limitou a movimentação individual das larvas na vermiculita foi a granulometria maior, quando comparada com a serragem. Porém, pode-se dizer que o tipo de substrato de uma maneira geral não interferiu no comportamento de dispersão das larvas de *C. albiceps*, uma vez que elas se distribuíram aleatoriamente e em distâncias médias próximas (21,39 cm, no presente estudo) contra (18,39 cm) (Gomes & Von Zuben 2003), apenas confirmando que na presença de obstáculos para empupar, as larvas se enterram menos profundamente.

Não houve uniformidade na distribuição das larvas na arena, fato esse semelhante ao observado em estudos efetuados por Gomes & Von Zuben (2003) e não foi detectada uma relação entre as variáveis estudadas e o sexo das larvas, ou seja, não se pode dizer que existe uma correlação significativa entre o sexo das moscas e as variáveis de análise.

Estudos anteriores tinham considerado para o processo de dispersão larval, uma calha de 3m de comprimento por 30 cm de largura, que permitia a locomoção das larvas em apenas uma direção e dois sentido (Godoy *et al.*, 1995; 1996; Bassanezi *et al.*, 1997). O presente estudo, ao considerar uma arena circular, reflete melhor as condições de ambiente natural que as larvas vão enfrentar ao abandonar o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação (Ullyett, 1950; Gomes *et al.*, 2002, 2003). A arena circular permite uma dispersão radial das larvas a partir do substrato alimentar localizado no centro, e não simplesmente uma dispersão numa única direção e apenas dois sentidos, como no caso de uma calha.

Godoy *et al.* (1995, 1996) observaram tanto para *C. megacephala* (F.) como para *C. putoria* (Wied.) uma oscilação na frequência de pupas em função da distância a partir do substrato alimentar. Segundo Boldrini *et al.* (1997), estas oscilações seriam uma consequência da formação de agregações larvais em determinado local do substrato de pupação. Acredita-se que as larvas dispersantes seriam capazes de perceber a densidade de larvas já enterradas em um determinado ponto do substrato, sendo que aglomerações de larvas num determinado ponto induziriam aquelas que ainda estavam caminhando, a procurar sítios de pupação mais distantes.

O comportamento de dispersão larval pós-alimentar e o consequente padrão de distribuição espacial das pupas nos sítios de pupação, podem ter implicações na maior ou menor susceptibilidade das mesmas ao ataque de predadores e parasitóides, em populações de ambientes naturais (Legner, 1977; Peschke *et al.*, 1987).

É interessante citar que esses estudos de dispersão podem ter importantes implicações para investigações médico-criminais, porque a presença de larvas e pupas nas circunvizinhanças de ou em cadáveres humanos pode auxiliar na estimativa do intervalo de tempo entre a morte e a descoberta do cadáver, referido como intervalo pós-morte (IPM). Essa estimativa constitui-se em um dos aspectos fundamentais em

estudos de medicina legal (Smith, 1986; Von Zuben *et al.*, 1996; Gomes & Von Zuben, 2004; Gomes *et al.*, 2005).

Agradecimentos

Os autores do presente trabalho agradecem à FAPESP (Processo 03/00540-3) e à Iracema Monteiro da Silva pelo apoio no desenvolvimento do trabalho, e aos revisores, pela paciência e cuidado em corrigir o artigo.

Referências bibliográficas

- Bassanezi, R.C.; Leite, M.B.F.; Godoy, W.A.C.; Von Zuben, C.J.; Von Zuben, F.J. & Reis, S.F., 1997. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92: 281-286.
- Boldrini J.L.; Bassanezi, R.C.; Moretti, A.C.; Von Zuben, C.J.; Godoy, W.A.C.; Von Zuben, F.J. & Reis, F.J., 1997. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. J. Theor. Biol. 185: 523-531.
- Furlanetto, S.M.P.; Campos, M.L.C., Hársi, C.M.; Buralli, G.M. & Ishihata, G.K., 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. Rev. Microb. 15: 170-174,.
- Godoy, W. A.C.; Fowler, H. G.; Von Zuben, Ziti, C. J. L. & Ribeiro, O. B., 1995. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). J. Appl. Entomol. 119: 263-266.
- Godoy, W.A.C.; Reis, S.F. & Von Zuben, C.J., 1996. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. J. Appl. Entomol.120: 423-426.
- Gomes, L.; Von Zuben, C.J. & Govone, J.S., 2002. Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. 2002. Entomol. Vect. 9:115-132.

- Gomes, L. & Von Zuben, C.J., 2003. Distribuição larval radial pós- alimentar em *Chrysomya albiceps* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae): profundidade, distância e peso de enterramento para pupação. *Entomol. Vect.* 10: 211-222.
- Gomes, L.; Von Zuben, C.J. & Sanches, M.R., 2003. Estudo da dispersão larval radial pós- alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 47: 229-234.
- Gomes, L. & Von Zuben, C.J., 2004. Insetos ajudando a desvendar crimes: Entomologia forense. *Ciência Hoje* 208: 28- 31.
- Gomes, L., Sanches, M.R., Von Zuben, C.J., 2005. Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). *J. Ins. Behav.* 18: 281- 292.
- Greenberg, B., 1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 1210-1214.
- Guimarães, J.H.; Prado, A.P. & Linhares, A.X., 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 22: 53-60.
- Guimarães, J.H.; Prado, A.P. & Buralli, G.M., 1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 23: 245-255.
- Guimarães, J.H.; Papavero, N. & Prado, A.P., 1983. As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239-416.
- Hanski, I., 1987. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol. Entomol.* 12: 257-266.
- Hengeveld, R., 1989. Dynamics of biological invasions. Chapman & Hall. New York: 160 p.
- Imbiriba, A.S.; Izutani, D.T.; Milhoreto, I.T. & Luz, E., 1977. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arq. Biol. Tecnol.* 20: 35-39.
- Legner, E.F., 1977. Temperature, humidity and depth of habitat influencing host destruction and fecundity of muscoid fly parasites. *Entomophaga* 22: 199-206.
- Peschke, K.; Krapf, D. & Fuldner, D., 1987. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. *Zool. Jb. Sys.* 114: 241-265,.

- Reis, S.F.; Stangenhais, G.; Godoy, W.A.C.; Von Zuben, C.J. & Ribeiro, O.B., 1994. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacepala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). Rev. Bras. Entomol. 38: 33-34.
- Smith, K.G.V., 1986. A Manual of Forensic Entomology. Ithaca: Cornell University Press.
- Ulyett, G. C., 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. Philip. Trans. R. Soc. London B 234: 77-174.
- Von Zuben, C.J.; Bassanezi, R.C.; Reis, S.F.; Godoy, W.A.C. & Von Zuben, F.J., 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. J. Appl. Entomol. 120: 379-382.
- Wells, J.D. & Greenberg, B., 1992. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. Bull. Entomol. Res. 82: 133-137.
- Zar, J. H., 1999. Biostatistical Analysis, Prentice Hall, New Jersey. 666 p.
- Zumpt, F., 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. Butterworths. London. 267 p.

CAPÍTULO 4**ANÁLISE DO EFEITO DO SUBSTRATO (VERMICULITA) PARA PUPAÇÃO
NA DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR EM *CHRYSOMYA*
MEGACEPHALA (FABRICIUS) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)**

Revista Brasileira de Entomologia. 2005. no prelo

Análise do efeito do substrato (vermiculita) para pupação na dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae)

ABSTRACT. The effect of the substrate type (vermiculita) for pupation in the postfeeding larval dispersal in *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Blowflies utilize discrete and ephemeral sites for breeding and larval nutrition. After the exhaustion of food, the larvae begin dispersing to search for pupation sites or for additional food source, process referred as postfeeding larval dispersal. As the type of substrate can affect this process and so some of the most important aspects of this were investigated in *Chrysomya megacephala*, utilizing a circular arena filled with vermiculite to permit the radial dispersion of larvae from the center and to compare with the findings of others studies done with wood shavings. To determine the localization of each pupa, the arena was divided in 72 equal sectors from the center. For each pupa, distance from the center of arena, weight and depth were determined. Statistical tests were performed to verify the relation among weight, depth and distance of burying for pupation. The results showed that the larvae that disperse farthest are those with lower weights, different from the study by GOMES *et al.* (2003). The majority of individuals pupated between 7 and 12 cm of depth and the type of substrate did not affect the pattern of postfeeding larval dispersal. The study of this process of dispersion can be utilized in the estimation of postmortem interval (PMI) for human corpses, in criminal investigations.

KEYWORDS. blowflies, forensic entomology, larval dispersal, substrate for pupation.

RESUMO. Efeito do tipo de substrato (vermiculita) para pupação na dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae)

Moscas-varejeiras utilizam substratos discretos e efêmeros para procriação e alimentação larval. Após a exaustão de alimento, as larvas começam a dispersar à procura de locais para empupar ou fonte adicional de alimento, processo denominado como dispersão larval pós-alimentar. O tipo de substrato pode afetar esse processo e alguns dos mais importantes aspectos desse processo foram investigados em *Chrysomya megacephala*, utilizando uma arena circular coberta de vermiculita, que permitisse a dispersão das larvas a partir do centro, para se comparar com outros estudos feitos com serragem. Para determinar a localização de cada pupa, a arena foi dividida em 72 setores iguais a partir do centro. Para cada pupa, a distância a partir do centro, o peso e a profundidade de enterramento para pupação foram determinados. Testes estatísticos foram realizados para verificar a relação entre peso, distância e profundidade de enterramento para pupação. Foi verificado que as larvas com peso menor dispersaram mais longe, diferente do observado por Gomes *et al.* (2003). A maioria das larvas alcançaram profundidades de enterramento para pupação entre 7 e 12 cm e o tipo de substrato (vermiculita) não afetou o padrão geral de dispersão larval. O estudo desse processo de dispersão pode ser utilizado na estimativa do intervalo pós-morte (IPM) de cadáveres humanos, em investigações criminais.

PALAVRAS-CHAVE: moscas-varejeiras, entomologia forense, dispersão larval e substrato para pupação.

INTRODUÇÃO

Chrysomya megacephala (Fabricius), originária da Australásia, foi introduzida acidentalmente no Continente Americano provavelmente através de navios (GUIMARÃES *et al.* 1978; 1979). Em meados da década de 1970, esta espécie foi descoberta no Sudeste do Brasil juntamente com *C. albiceps* (Wiedemann) e *C. putoria* (Wiedemann) (IMBIRIBA *et al.* 1977; GUIMARÃES *et al.* 1978).

As moscas do gênero *Chrysomya* são consideradas de grande importância médico-veterinária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (FURLANETTO *et al.* 1984), podendo causar também miíases nos animais e no homem (ZUMPT 1965; GUIMARÃES *et al.* 1983). Também são de fundamental importância em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de

decomposição de cadáveres humanos, para a estimativa do intervalo pós-morte (WELLS & GREENBERG 1992; VON ZUBEN *et al.* 1996).

Além das questões epidemiológicas, o impacto causado com a introdução de espécies exóticas tem interessado aos ecologistas, sendo que a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos neste processo de introdução tais como competição por recursos alimentares e por sítios de pupação depende da investigação de determinados parâmetros populacionais, além da estrutura ambiental espaço-temporal em que ocorrem estes fenômenos (HENGEVELD 1989). Além desses, ocorrem outros de pequena escala espacial como no caso de dispersão dos estágios imaturos dos organismos invasores.

Em espécies de Calliphoridae, pode-se observar que os indivíduos se utilizam de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos, no caso das fêmeas adultas, e para alimentação das larvas (HANSKI 1987; PESCHKE *et al.* 1987). O estágio larval é o principal período durante o ciclo de vida dessa moscas, em que ocorre limitação de recursos alimentares, e a competição por esses recursos é, geralmente, do tipo exploratório (REIS *et al.* 1994), em que cada larva procura ingerir o máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (ULLYETT 1950). Após o pleno desenvolvimento, as larvas começam a procurar um sítio para pupação, ou no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação, por fontes de alimento adicional. Tal processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG 1990).

Alguns estudos com dispersão larval pós-alimentar em *C. megacephala* já foram feitos, com a intenção de se observar padrões de distribuição bem como a análise das variáveis em estudo durante esse comportamento de buscas por substratos para pupação ou por novas fontes de alimento (GOMES *et al.* 2003). Porém, uma das questões levantadas nesses estudos (GOMES *et al.* 2002, 2003) foi se o tipo de substrato influenciaria esse processo de dispersão larval e o padrão de enterramento para pupação.

Destarte, o objetivo desse trabalho foi estudar, sob condições experimentais, em simulação de ambiente natural, a dispersão larval pós-alimentar em *C. megacephala* em uma arena com vermiculita e tentar estabelecer uma comparação com outros estudos (Gomes & Von Zuben 2005; GOMES *et al.* 2002,2003) em que foi usada serragem além

de estabelecer uma relação entre as variáveis peso, distância e profundidade de enterramento em uma arena que permitisse às larvas deslocamento em todas as direções.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de adultos de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP, utilizando como isca, matéria orgânica em decomposição (carcaça de peixe). Os exemplares coletados foram identificados até espécie e mantidos em gaiolas teladas, em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% + 10% de umidade relativa e fotofase de 12 horas, sendo fornecidos água, açúcar e fígado *ad libitum*.

Uma arena circular foi montada sobre o piso de uma sala do laboratório iluminada de forma homogênea (a fim de evitar tendências na dispersão das larvas), sendo forrada com vermiculita, tendo suas margens delimitadas por papelão e dividida em 72 setores de 5 graus cada. O desenvolvimento larval da geração F₂ - por seguir a mesma geração de estudos anteriores, a fim de evitar diferenças de comportamento no estudo- deu-se em carne moída, sendo este substrato então colocado no centro da arena circular forrada com vermiculita, para que as larvas abandonassem a mesma e irradiassem para empupar.

Foram utilizados para esse estudo da dispersão larval radial pós-alimentar, dois experimentos (teste e replicata), com uma arena com 50 cm de diâmetro e forrada com uma camada de 20 cm de vermiculita. A camada de vermiculita serviu para investigar qual a profundidade máxima em que as larvas se enterravam para empupar e comparar o efeito do tipo de substrato com outros estudos (GOMES *et al.* 2003).

As pupas foram localizadas e retiradas da vermiculita, sendo determinadas as suas localizações por setor, e medidas, para cada uma, a distância e a profundidade do local de pupação, com o auxílio de régua ou trena. A coleta das pupas começou da periferia da arena para o centro. Cada pupa foi pesada em balança analítica e individualizada em frascos plásticos, antes que ocorresse a emergência do adulto. Os indivíduos adultos foram sexados.

Foram feitos testes estatísticos de regressão e igualdade de médias a 95% de confiança (ANOVA), e análises direcionais para as variáveis estudadas (ZAR 1999).

RESULTADOS

Os valores de média e desvio-padrão (distância em relação ao centro) para profundidade de enterramento, da arena e peso, para as 282 larvas (Experimento 1) e 277 larvas (Experimento 2) nos quatro quadrantes da arena, estão representados na Tabela I. É preciso ressaltar que nas tabelas e figuras a seguir, constam os dados dos dois experimentos conjuntamente, porque não houve diferença significativa entre os dois grupos (ANOVA, $p > 0.05$ a 5% de significância).

A distância, a profundidade e o peso não foram significativamente diferentes nos dois experimentos. No entanto, não se tem evidências ($p > 0,05$, ANOVA) para dizer que o peso varia significativamente conforme o experimento.

Tabela I: Número total (N), Média e Desvio Padrão das variáveis analisadas para os Experimentos (Exp) 1 e 2, e total.

Variáveis analisadas		Número de pupas coletadas	Média	Desvio Padrão
Distância (cm)	Exp1	282	16,04	5,00
	Exp2	277	14,77	4,95
	Total	559	15,41	5,01
Profundidade (cm)	Exp1	282	9,70	3,05
	Exp2	277	8,54	3,11
	Total	559	9,12	3,13
Peso (mg)	Exp1	282	34,69	4,16
	Exp2	277	35,13	4,14
	Total	559	34,91	4,15

Para analisar a direção média dos ângulos de enterramento, foi feito o teste de igualdade da direção média de Rao para igualdade de ângulo, e, como resultado, não se tem evidências de que haja diferença na direção média para os dois experimentos ($U_{0,05, GL1, GL2} = 0,4272$; $P = 0,05$). Foi verificado que não se pode dizer que a direção média dos dois experimentos é diferente pela Figura 1, o que já era esperado, visto que no segundo experimento nem mesmo tem-se uma direção média que seja significativa, ou seja, as larvas se espaçaram mais ou menos uniformemente em todas as direções.

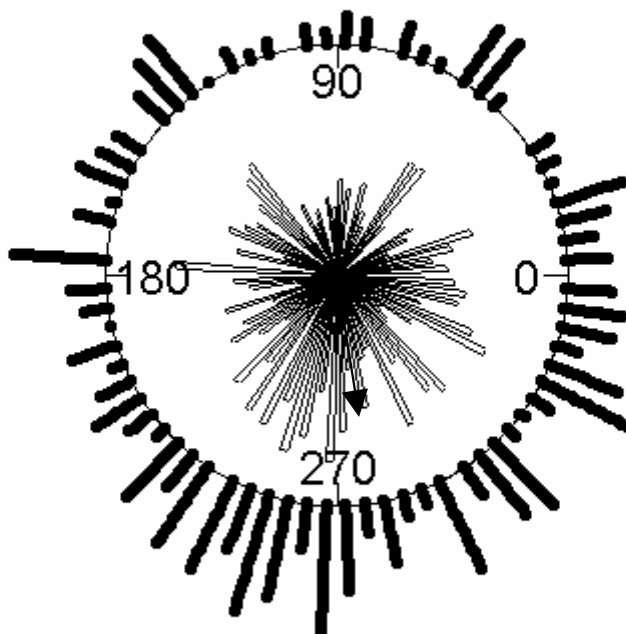
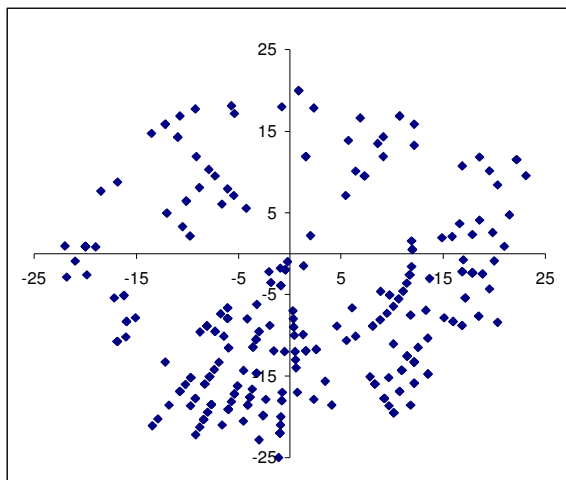


Figura 1: Análise direcional da distribuição das larvas de *C. megacephala* na arena considerando os dois experimentos juntos com o vetor direcional (seta) da tendência das larvas dispersarem na arena.

A Figura 2, a seguir, demonstra a distribuição das larvas por ocorrência na arena de dispersão com vermiculita. Através de uma Análise de Variância dos dados da Tabela I, conclui-se que não se tem evidências para dizer que distância e profundidade variam com o sexo ($p > 0,01$ a 5% de significância) (Fig. 3). Assim como nos experimentos anteriores com serragem (Gomes *et al.* 2002, 2003), foi feita uma análise da distribuição das larvas por profundidade, distância e peso, como pode-se ver pelas Figuras 4, 5 e 6 a seguir:



A Figura 2: distribuição das larvas de *C. megacephala* na arena

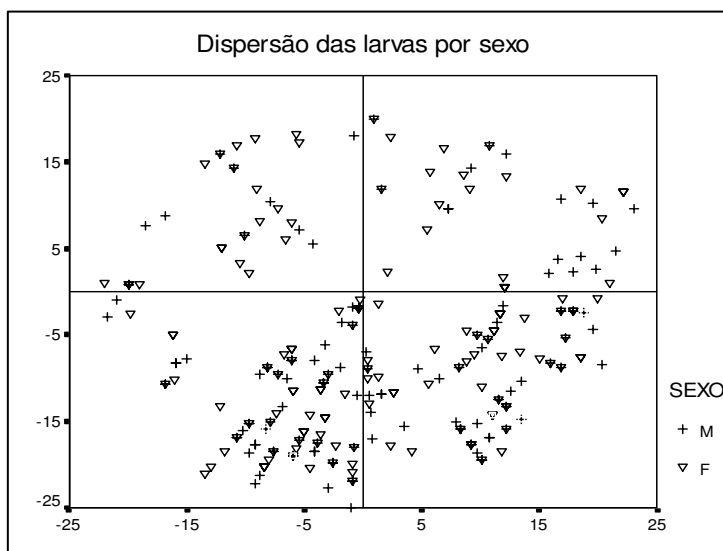


Figura 3: distribuição das larvas de *C. megacephala* por sexo na arena

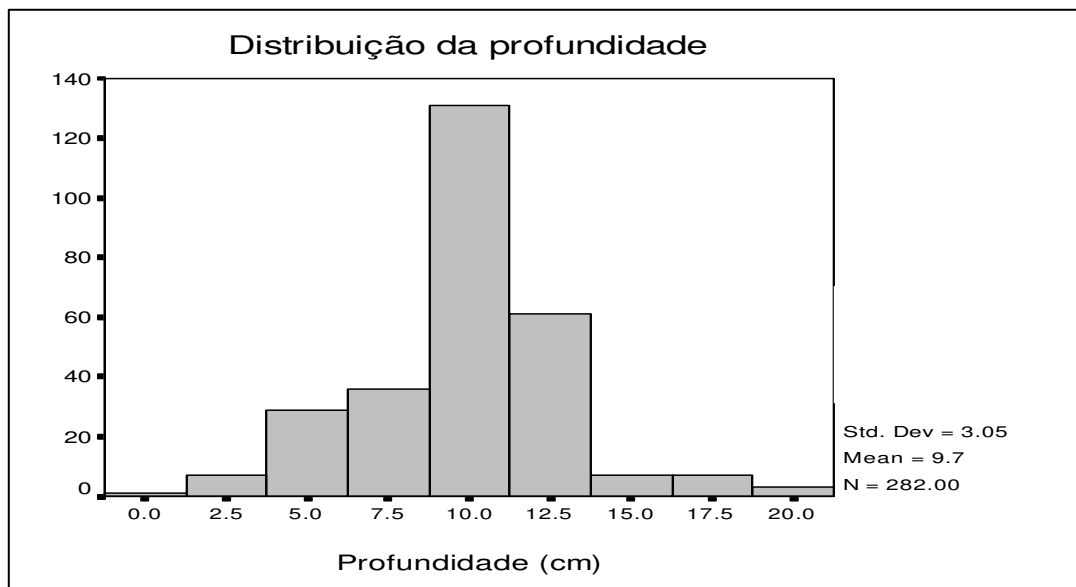


Figura 4: distribuição das larvas de *C. megacephala* por profundidade

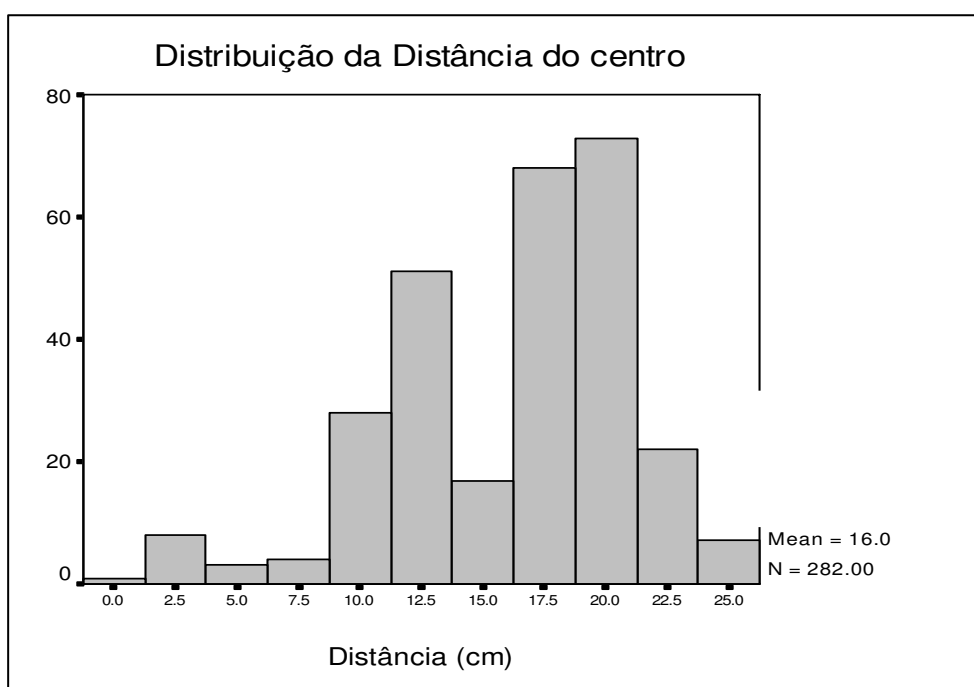


Figura 5: distribuição das larvas de *C. megacephala* por distância

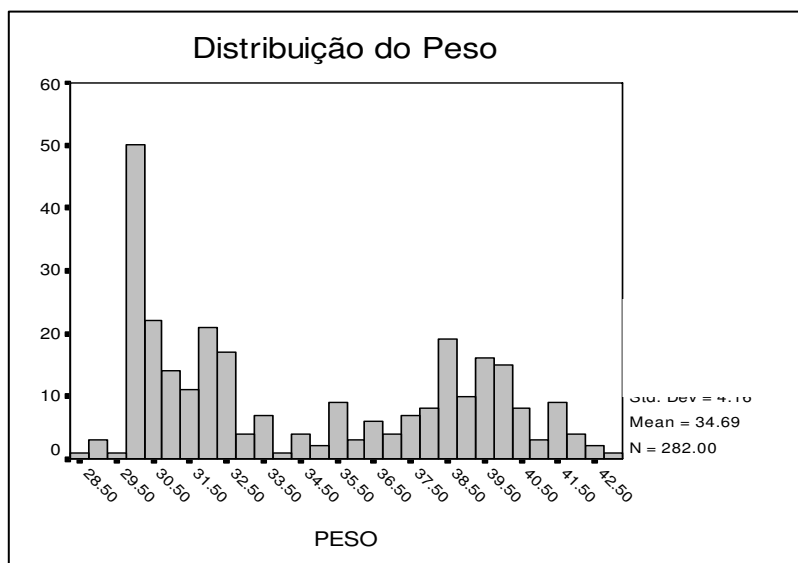


Figura 6: distribuição das larvas por peso

Por outro lado tem-se uma evidência estatística fraca que o peso varia com o sexo ($p > 0,06$). Além disso, a relação entre o peso e a distância é bastante significativa e negativa ($r = -0,767$, a 1%), ou seja, larvas mais pesadas tendem a se enterrar menos distante do centro e as larvas mais leves distanciam-se mais, diferentemente do que ocorreu em Gomes *et al.* (2003) em que a correlação foi positiva ($r = 0,085$, a 5% de significância). Além disso, as relações entre peso e profundidade de enterramento (0,244) e profundidade e distância de enterramento (0,179) a 5%, foram positivas e significativas, da mesma forma que em Gomes *et al.* (2003).

Embora tenha-se evidências através da Tabela I. para dizer que a direção escolhida pelas larvas não foi uniforme, esta evidência não é tão forte ($p > 0,05$) como a que se observou no caso reportado do experimento de Gomes *et al.* (2003).

Para analisar a concentração das larvas, foi verificado o comprimento do vetor média, o qual dá uma idéia do quão concentradas estão as larvas, quanto à direção escolhida. Se as larvas escolhessem uma direção completamente aleatória (uniforme) ao redor da circunferência, então o vetor média provavelmente teria comprimento muito próximo de zero. O tamanho máximo do vetor média é 1. Quanto mais próximo de 1 é o

comprimento do vetor média, mais concentradas estão as larvas; ele terá comprimento 1 quando todas as larvas escolherem a mesma direção. O P- Valor do teste de uniformidade ficou entre 1% e 3% ($P= 0,018$) demonstrando esta ser significativa. Isto demonstra que a direção das larvas ($\text{ângulo} = -86^\circ$) foi uniforme. Embora significativa, o comprimento do vetor média é pequeno (0,2733), o que significa que praticamente não existe uma direção média na qual houve maior concentração de larvas, pelo fato do teste da uniformidade ter dado um ângulo negativo. Vê-se que o número de larvas por quadrante é bastante homogêneo (Figuras 1 e 2), apesar de aparentar através dessas figuras que elas escolheram os quadrantes 2 e 3.

Foi feita uma análise de variância e não se encontraram evidências de que distância, profundidade e peso variem com o sexo das larvas, nas concentrações dos dois experimentos, sendo que a direção média do vetor de enterramento para as larvas de sexo masculino foi de $-147,47^\circ$, com um comprimento de 0,1258 e um teste de uniformidade positivo, ou seja, não se tem evidências suficientes para dizer que houve alguma direção predominante para as larvas. Para as fêmeas a direção média do vetor de enterramento para as larvas foi de $-78,46^\circ$, com um comprimento de 0,2129 e com um teste de uniformidade, também positivo. No caso das fêmeas já há evidências de uma concentração maior de larvas nos dois quadrantes inferiores, o que significa que se tem evidências para dizer que as larvas do Sexo feminino não se distribuíram uniformemente quanto à direção escolhida. Observa-se que o comprimento do vetor média é bem maior do que para o sexo masculino.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou aspectos gerais sobre o processo de dispersão em uma arena circular, e não confirmou resultados anteriores utilizando arenas com mesmo diâmetro e mesma profundidade, com serragem, em que as larvas com peso menor são as que têm tendência de deslocar menos, talvez por estarem à procura de nova fonte alimentar, e não estarem buscando distâncias maiores para se enterrarem para empupar (GOMES *et al.* 2002, 2003). No presente estudo, observou-se uma correlação negativa entre distância e peso das pupas. Isto não confere com outro experimento em serragem (GOMES *et al.* 2003) onde observou-se que o peso aumenta com a distância. Esta

diferença pode ser devida ao fato de que neste experimento as larvas não puderam se enterrar a grandes profundidades. Se as larvas encontraram um obstáculo nos grãos da vermiculita e voltaram à procura de um lugar mais longe e com menos obstáculos, isto pode ter feito com que a correlação seja negativa, quando deveria ser positiva como no outro experimento.

A maior concentração de pupas foi observada nas profundidades inferiores a 10 cm e algumas larvas (oito larvas) chegaram a atingir a distância máxima possível a partir do centro (25 cm). Aparentemente, o que mais limitou a movimentação das larvas no presente estudo foi a distância do centro e não a profundidade, embora a utilização de uma arena com essas dimensões de 20 cm de profundidade e 50 cm de diâmetro possibilitou profundidades maiores, quando comparado a estudos recentes com uma arena de 2m de diâmetro e 5 cm de profundidade (GOMES *et al.* 2002). A movimentação das larvas na arena provavelmente ocorreu principalmente em função da busca de sítios para pupação, embora não se possa desconsiderar a possibilidade de alguns indivíduos estarem se movimentando à procura de uma fonte adicional de alimento (GOMES *et al.* 2002).

Com relação a esses dois experimentos que foram realizados, pode-se dizer que as larvas atingiram menores profundidades de enterramento e maiores distâncias em relação ao centro da arena, quando comparadas com os experimentos anteriores que já tinham sido realizados (GOMES *et al.*, 2002 e 2003), com serragem como substrato para pupação.

Um fato curioso é que não houve uniformidade na distribuição espacial das larvas na arena nos dois experimentos realizados e que não há uma relação entre as variáveis estudadas e o sexo das larvas, ou seja, não se pode dizer que existe uma correlação significativa entre o sexo das moscas e as variáveis de análise.

Houve uma forte correlação negativa entre a distância percorrida e o peso, confirmando estudos anteriores em que quanto maior o peso, menor será a distância percorrida pelas larvas na arena quando se utiliza um substrato mais fino como a serragem (Gomes *et al.*, 2003). Porém, pode-se dizer que o tipo de substrato de uma maneira geral não interfere no comportamento de dispersão das larvas de *C. megacephala*, uma vez que elas se distribuíram aleatoriamente e nas mesmas distâncias (15,41 cm) como em GOMES *et al.* (2003) (15,56 cm), apenas confirmando um

comportamento esperado que na presença de obstáculos para empupar, as larvas se enterram a profundidades menores.

O fato de se usar arenas em experimentos de dispersão radial larval pós-alimentar de moscas-varejeiras é vantajoso, pois a arena é a melhor figura espacial que representa o ambiente, já que a região que as larvas têm para escolher e se dispersarem em ambiente natural é uma circunferência (GOMES *et al.* 2002 e 2003). Estudos anteriores tinham considerado para o processo de dispersão larval, uma calha de 3m de comprimento por 30 cm de largura, que permitia a locomoção das larvas em apenas uma direção e dois sentidos (GODOY *et al.* 1995, 1996; BASSANEZI *et al.* 1997). A arena circular permite uma dispersão radial das larvas a partir do substrato alimentar localizado no centro, e não simplesmente uma dispersão numa única direção e apenas dois sentidos, como no caso de uma calha.

O comportamento de dispersão larval pós-alimentar e o consequente padrão de distribuição espacial das pupas nos sítios de pupação podem ter implicações na maior ou menor susceptibilidade das mesmas ao ataque de predadores e parasitóides, em populações de ambientes naturais (LEGNER 1977; PESCHKE *et al.* 1987).

Da mesma maneira, é interessante citar que esses estudos de dispersão também podem ter importantes implicações para investigações médico-criminais na estimativa do Intervalo Pós Morte (IPM), constituindo-se em aspectos fundamentais em estudos de medicina legal (SMITH 1986), sendo que esta estimativa pode ser seriamente prejudicada, caso não sejam consideradas as larvas dispersantes (VON ZUBEN *et al.* 1998; Gomes & Von Zuben 2005).

CONCLUSÃO

Pode-se dizer que a ocorrência de substratos mais compactos ou com maiores obstáculos dificulta provavelmente a penetração das larvas durante a dispersão para enterramento, como pôde-se notar nesse experimento em que a vermiculita, apesar de ser menos densa que a serragem, possui uma granulometria maior que esta (GOMES *et al.*, 2003), o que poderia, provavelmente, dificultar a movimentação das larvas pelo fato de haver menos poros ou espaços para as larvas se movimentarem.

Além disso, pôde-se confirmar que a correlação entre peso e distância é negativa, o que vem a reafirmar que as larvas menos pesadas são as que percorrem

maiores distâncias no ambiente natural, talvez por estarem à procura de novos substratos alimentares ou para pupação (Gomes et al., 2002 e 2003).

AGRADECIMENTOS. Os autores do presente trabalho agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização desses estudos (Processo 03/00540-3) e à Iracema Monteiro da Silva, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

- BASSANEZI, R. C.; M. B. F. LEITE; W. A. C. GODOY; C. J. VON ZUBEN; F. J. VON ZUBEN, & S. F. REIS. 1997. F.. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 92(2): 281-286,.
- BOLDRINI J. L.; R. C. BASSANEZI; A. C. MORETTI; C. J. VON ZUBEN; W. A. C. GODOY; F. J. VON ZUBEN & F. J. REIS. 1997. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. *Journal of Theoretical Biology* 185: 523-531,.
- FURLANETTO, S. M. P.; M. L. C. CAMPOS, C. M. HÁRSI; G. M. BURALLI & ISHIHATA , G.K. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15(3): 170-174,.
- GODOY, W. A.C.; H. G. FOWLER; C. J. VON ZUBEN; L. ZITI & O. B. RIBEIRO. 1995. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Applied Entomology* 119: 263-266.
- GODOY, W. A.C.; S. F. REIS & C. J. VON ZUBEN. 1996. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. *Journal of Applied Entomology* 120 (4): 423-426.
- GOMES, L.; C. J. VON ZUBEN; J. S. GOVONE. 2002. Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. 2002. *Entomologia y Vectores* 9(01): 115 - 132.

- Gomes, L.; C. J. Von Zuben & Marcos Rogério Sanches. 2003. Estudo da dispersão larval radial pós- alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47 (2): 229- 234.
- Gomes L, C. J. Von Zuben. 2005. Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. *Forensic Science International* (no prelo).
- GREENBERG, B.1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera). *Annals of Entomological Society of America* 83: 1210-1214.
- GUIMARÃES, J.H.; A. P.PRADO & A. X.. LINHARES. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22 (1): 53-60.
- GUIMARÃES, J.H.; A. P. PRADO & G. M. BURALLI 1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 23 (4): 245-255.
- GUIMARÃES, J. H.; N. PAPAVERO & A. P. PRADO. 1983. As mííases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia* 1 (4) : 239-416.
- HANSKI, I. 1987. Carrion fly community dynamics:patchiness, seasonality and coexistence.. *Ecological Entomology* 12, p. 257-266.
- HENGEVELD, R. 1989. *Dynamics of biological invasions*. New York: Chapman & Hall, 160 p..
- IMBIRIBA, A. S.; D. T. IZUTANI; I T. MILHORETO & E. LUZ. 1977. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 20: 35-39.
- LEGNER, E. F. 1977. Temperature, humidity and depth of habitat influencing host destruction and fecundity of muscoid fly parasites. *Entomophaga* 22: 199-206.
- LEVOT, G.W., BROWN, K. R. & SHIPP, E. 1979. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. *Bulletin Entomological Research* 69: 469-475.
- PESCHKE, K.; D. KRAPF & D. FULDNER. 1987. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. *Zoological Jb. System* 114: 241-265,.

- REIS, S. F.; G. STANGENHAUS; W. A. C. GODOY; C. J. VON ZUBEN & O. B. RIBEIRO. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). Revista Brasileira de Entomologia 38(1): 33-34.
- SMITH, K. G. V. 1986. A Manual of Forensic Entomology. Ithaca : Cornell University Press.
- ULLYETT, G. C. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. Philosophical Transactions of The Royal Society of London B234: 77-174.
- 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. Journal of Applied Entomology 120 (3): 379-382.
- VON ZUBEN, C. J. 1998. 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.
- WELLS, J. D. & B. GREENBERG. 1992. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. Bulletin Entomological Research 82: 133-137.
- Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis, Prentice Hall, New Jersey, 666 p..
- ZUMPT, F. 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. London: Butterworths, 267 p.

CAPÍTULO 5

ESTUDO DO EFEITO DO TIPO DE SUBSTRATO PARA PUPAÇÃO NA DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR EM *CHRYSOMYA ALBICEPS* (WIEDEMANN, 1819) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)

Iheringia. 2006. (aceito após modificações)

ESTUDO DO EFEITO DO TIPO DE SUBSTRATO PARA PUPAÇÃO NA DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR EM *CHRYSOMYA ALBICEPS* (WIEDMANN, 1819) (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)

Abstract

Study of the effect of the kind of substrate for pupation in the postfeeding larval dispersal in *Chrysomya albiceps* (Wiedmann, 1819) (Diptera: Calliphoridae). Blowflies utilize discrete and ephemeral sites for breeding and larval nutrition. After the exhaustion of food, the larvae begin dispersing to search for sites to pupate or to additional food source, process referred as postfeeding larval dispersal. The kind of substrate can affect this process and some of the most important aspects of this process were investigated in *Chrysomya albiceps*, utilizing a circular arena covered with vermiculite to permit the radial dispersion of larvae from the center and compare with others studies with wood shavings. To determinate the localization of each pupa, the arena was split in 72 equal sectors from the center. For each pupa, distance from the center of arena, weight and depth were determined. Statistical tests were performed to verify the relation among weight, depth and distance of burying for pupation. It was verified that the larvae that disperse farthest are those with lower weights as the other studies (Gomes & Von Zuben, 2005). The majority of individuals reached the depth for burying for pupation between 2 and 8 cm (4,96 cm in average). The study of this process of dispersion can be utilized in the estimation of postmortem interval (PMI) for human corpses in medico-criminal investigations.

Key words: blowflies, Calliphoridae, *Chrysomya albiceps*, substrate for pupation, larval dispersal.

INTRODUÇÃO

Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819), originária da África e algumas regiões do Mediterrâneo, foi introduzida acidentalmente no Continente Americano provavelmente através de navios (GUIMARÃES *et al.* 1978; 1979). Em 1975, esta espécie foi descoberta no Sudeste do Brasil juntamente com *C. megacephala* (Fabricius) e *C. putoria* (Wiedemann) (IMBIRIBA *et al.*, 1977; GUIMARÃES *et al.*, 1978).

As moscas do gênero *Chrysomya* têm grande importância médico- veterinária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (Greenberg, 1971; FURLANETTO *et al.*, 1984), podendo causar também miíases nos animais e no homem (ZUMPT, 1965; GUIMARÃES *et al.* 1983). São de fundamental importância em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (WELLS & GREENBERG, 1992; VON ZUBEN *et al.*, 1996; GOMES & VON ZUBEN, 2004). O impacto causado com a introdução de espécies exóticas tem interessado aos ecologistas, sendo que a compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos neste processo de introdução tais como competição por recursos alimentares e por sítios de pupação depende da investigação de determinados parâmetros populacionais, além da estrutura ambiental espaço-temporal em que ocorrem estes fenômenos (HENGEVELD, 1989). Além desses, ocorrem outros de pequena escala espacial como no caso de dispersão dos estágios imaturos dos organismos invasores. No caso do presente estudo, pode ser citada a dispersão larval pós-alimentar de *C. albiceps* em busca de um sítio para pupação.

Nessas espécies de moscas-varejeiras pode-se observar que elas utilizam-se de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos 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, e a competição por esses recursos é, geralmente, do tipo exploratório (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 um sítio para pupação, ou por mais fontes de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação (GOMES *et al.*, 2002). Tal processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (GREENBERG 1990).

Alguns estudos com dispersão larval pós- alimentar em *C. albiceps* já foram feitos, com a intenção de se observar padrões de distribuição bem como a análise das variáveis em estudo durante esse comportamento de buscas por substratos para pupação ou por novas fontes de alimento (GOMES *et al.*, 2002). Porém, uma das questões levantadas nesses estudos (GOMES & VON ZUBEN, 2003; GOMES *et al.* 2002, 2003) foi se o tipo de substrato influenciaria esse processo de dispersão e enterramento para pupação da mesma forma que pode ocorrer em ambiente natural.

Por isso, o objetivo desse trabalho foi estudar sob condições experimentais, em simulação de ambiente natural, a dispersão larval pós- alimentar em *C. albiceps* em uma arena com vermiculita e tentar estabelecer uma comparação com outros estudos (GOMES & VON ZUBEN, 2005) em que foram usados serragem, além de estabelecer uma relação entre as variáveis peso, distância e profundidade de enterramento em uma arena que permitisse às larvas deslocamento em todas as direções.

MATERIAL E MÉTODOS

Exemplares de adultos de *C. albiceps* foram coletados nos arredores do Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP, utilizando como isca, matéria orgânica em decomposição (carcaça de peixe). Os exemplares coletados foram identificados até espécie e mantidos em gaiolas teladas, em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% de umidade relativa e fotofase de 12 horas, sendo ministrados água, açúcar e fígado *ad libitum*.

Arenas circulares (fig. 1) foram montadas sobre o piso de uma sala do laboratório iluminada de forma homogênea (a fim de evitar tendências na dispersão das larvas), sendo forrada com vermiculita, tendo suas margens delimitadas por papelão e dividida em 72 setores de 5 graus cada. O desenvolvimento larval deu-se em carne moída bovina até o 3º ínstar, sendo este substrato então colocado no centro da arena circular forrada com vermiculita, para que as 274 larvas (média dos três experimentos, pois não houve diferença entre eles, ANOVA $p < 0,05$ e $F = 3,54$) abandonassem a mesma e irradiassem para empupar (fig. 1).

Foram realizadas para esse estudo da dispersão larval pós-alimentar três experimentos com arenas com 50 cm de diâmetro, e forrada com uma camada de 20 cm de vermiculita.

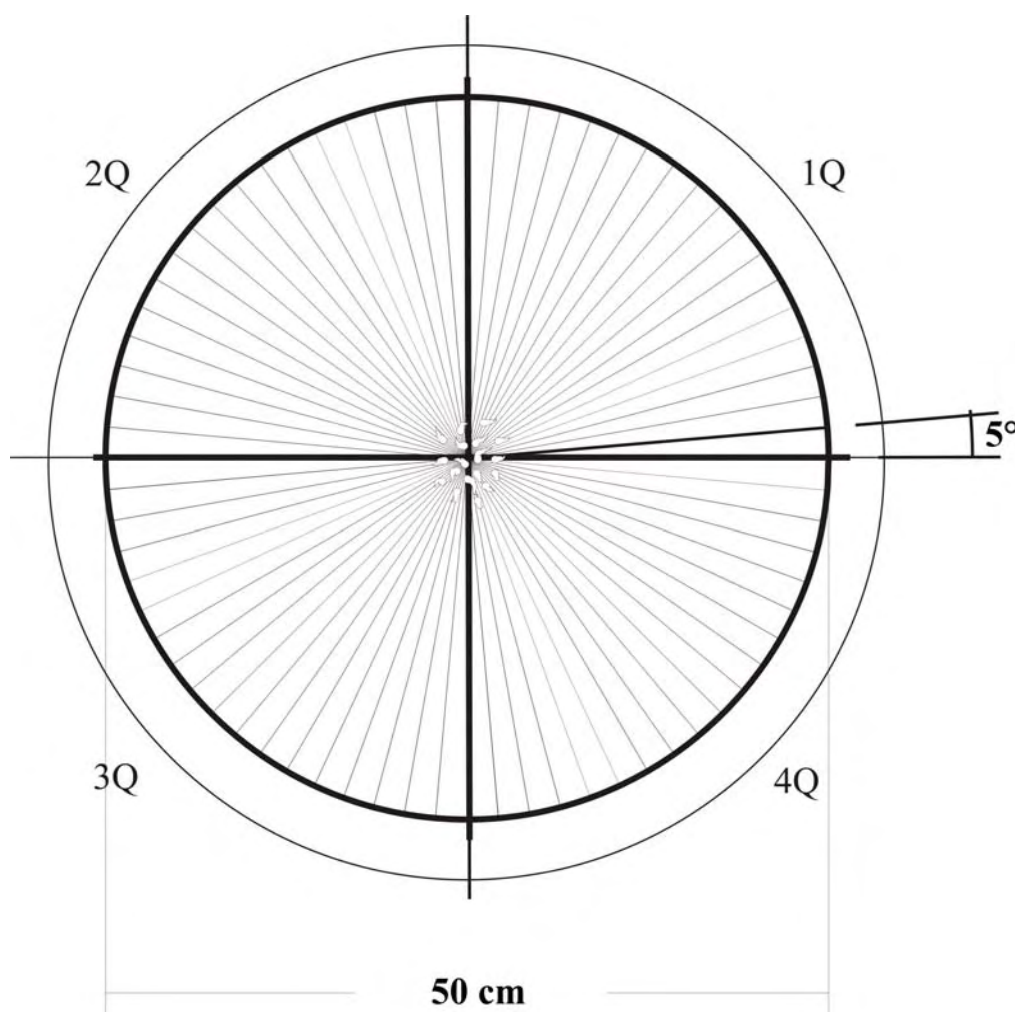


Fig.1: Esquema do protocolo experimental (no centro larvas iniciando a dispersão)

As pupas foram localizadas e retiradas da vermiculita, sendo determinadas as suas localizações por setor, e medidas, para cada uma, a distância e a profundidade do local de pupação, com o auxílio de régua ou trena. A coleta das pupas começou da periferia da arena para o centro. Cada pupa foi pesada em balança analítica e individualizada em frascos de plástico, antes que ocorresse a emergência do adulto. Os

indivíduos adultos foram sexados e o material testemunho foi depositado na coleção entomológica do Departamento de Zoologia da UNESP, Rio Claro.

Foram feitos testes estatísticos de regressão, correlação, qui-quadrado e igualdade de médias (ANOVA) a 95% de confiança, e análises direcionais para as variáveis estudadas (ZAR 1999).

RESULTADOS

É apresentado a seguir um gráfico de dispersão que mostra a distribuição da posição das pupas na arena (fig. 2). Se for feita uma analogia com o plano cartesiano, com x e y representando os eixos horizontal e vertical respectivamente, e se dividir a arena em 4 quadrantes, irá se notar bem claramente que o quarto quadrante (x positivo e y negativo) concentra uma porcentagem bem menor das pupas. Na verdade, esta concentração menor, ou distribuição mais esparsa das larvas, parece muito claramente ocorrer após mais ou menos o raio de 220 graus, no terceiro quadrante (x e y negativos), sendo que no total tem-se 274 larvas.

A distribuição das pupas no gráfico segue claramente uma forma de círculos concêntricos e cada vez maiores (fig. 2). Isso aparece devido ao arredondamento da distância medida para o centímetro mais próximo, bem como à colocação das larvas no raio central de cada setor. Isso provavelmente não tem grande influência nas análises, mas uma forma de corrigir seria medir simplesmente os valores das coordenadas X e Y do local de enterramento, ao invés da distância e do setor. A distribuição das larvas por quadrante foi: Primeiro (29%), Segundo (31%), terceiro (23%), Quarto (17%) (fig. 2).

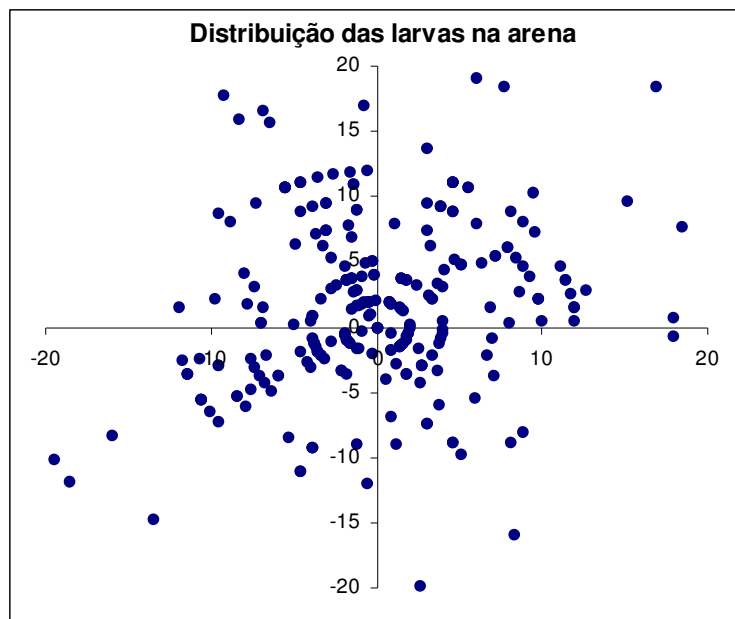


Fig. 2: distribuição das larvas de *C. albiceps* na arena

Continuando a análise descritiva, o gráfico de dispersão a seguir mostra a distribuição das larvas segundo o sexo das mesmas (fig. 3). Notou-se que não há nada que aparentemente evidencie qualquer diferença entre o comportamento de ambos os sexos.

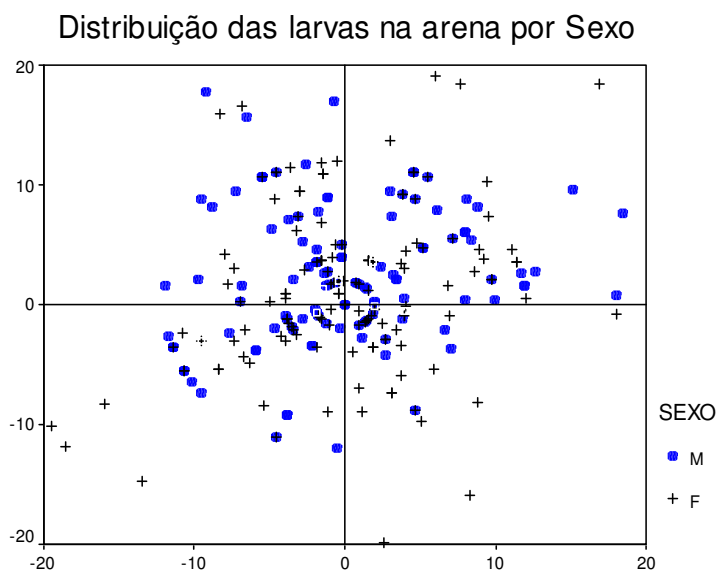


Fig. 3: distribuição das larvas de *C. albiceps* na arena de acordo com o sexo.

O histograma na seqüência mostra a distribuição da distância percorrida pelas larvas a partir do centro da arena (fig. 4). Esta distância foi de no máximo 25cm, pois a arena tinha 50 cm de diâmetro. Notou-se que a maior parte das larvas preferiram uma distância inferior a 15cm, sendo que menos de 10% delas foram além desta distância. A média da distância foi de 7,6 cm. Pelo histograma parece que as larvas pertencem a duas ou três populações distintas (fig. 4). Um grupo de larvas caminhou bem pouco, menos que 5 cm. Um segundo grupo caminhou entre 5 cm e 15 cm. Finalmente um terceiro grupo de poucas larvas caminhou mais de 15 cm.

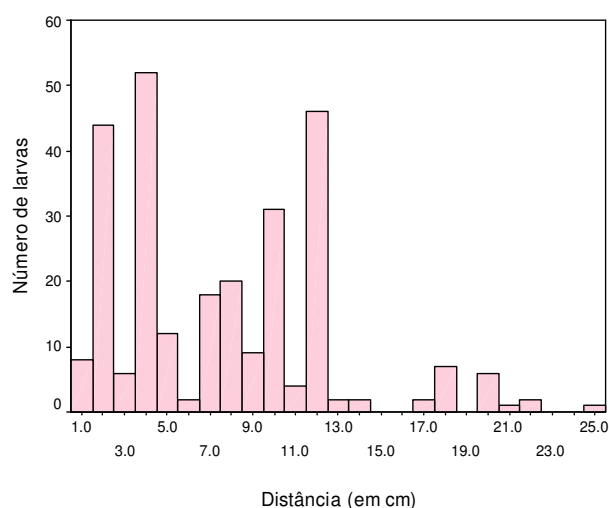


Fig. 4: distribuição das larvas de *C. albiceps* na arena de acordo com a distância (cm).

A seguir, mostrou-se a distribuição do peso das larvas, através de um histograma (fig. 5). A grande maioria das larvas tem peso entre 47 e 63 mg, sendo que menos de 10% das larvas pesam menos de 47 mg. Assim como no caso da distância mostrada no gráfico anterior (fig. 4), aqui parece também haver três populações diferentes de larvas, visto que a distribuição apresenta três "pontos de máximos, que foram chamados de "moda". Um grupo pequeno de larvas tem peso menor do que 47 mg, outro grupo pesa entre 47 e 56 mg e um grupo maior tem peso acima de 56 mg. O peso médio foi de 54,6 mg.

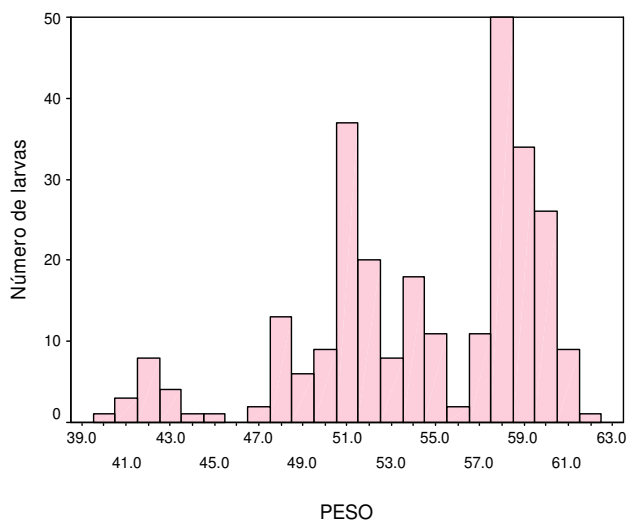


Fig. 5: distribuição das larvas de *C. albiceps* na arena de acordo com o peso (mg).

A Figura 6 representa a distribuição da profundidade em que as larvas (pupas) foram encontradas. Ao contrário da distância e peso, a profundidade não parece vir de mais de uma população. Notou-se que apenas duas larvas se enterraram a profundidades maiores que 15cm, as demais ficaram mais próximas à superfície. A profundidade média foi de 5,2 cm, e notou-se que as larvas se concentraram entre 2 e 12 cm e com picos em 2 e 4 cm.

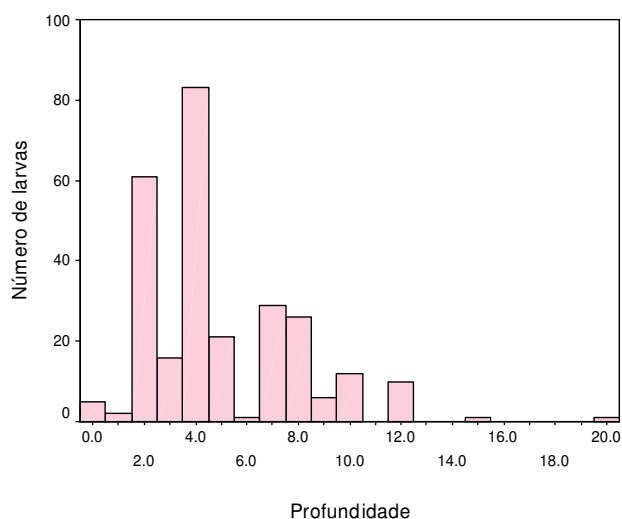


Fig. 6: distribuição das larvas de *C. albiceps* na arena de acordo com a profundidade de enterramento (cm).

Vê-se que tanto para a distância percorrida como para o peso das larvas, parece haver três populações distintas de larvas. Seria muita coincidência se isso acontecesse em ambas as variáveis e não houvesse qualquer relação entre elas. Assim, procurou-se analisar esta relação classificando o peso e a distância em três grupos, conforme evidenciado nos histogramas. Então, criou-se três categorias para a variável peso (leve, médio e pesado) e mais três para a variável distância (pequena, média e grande).

Para cada categoria de peso, contou-se separadamente a frequência de cada categoria da distância. O gráfico de barras (fig. 7) mostra os resultados. Pode-se ver que para peso leve, a maior parte das larvas (67%) caminharam uma maior distância. Para o peso médio, a maior parte das larvas (68%) caminharam uma distância média, e finalmente para os maiores pesos, a maior parte das larvas (67%) caminharam uma distância menor. Ficou bem evidente que quanto maior o peso, menor a distância caminhada (fig. 7 e 8).

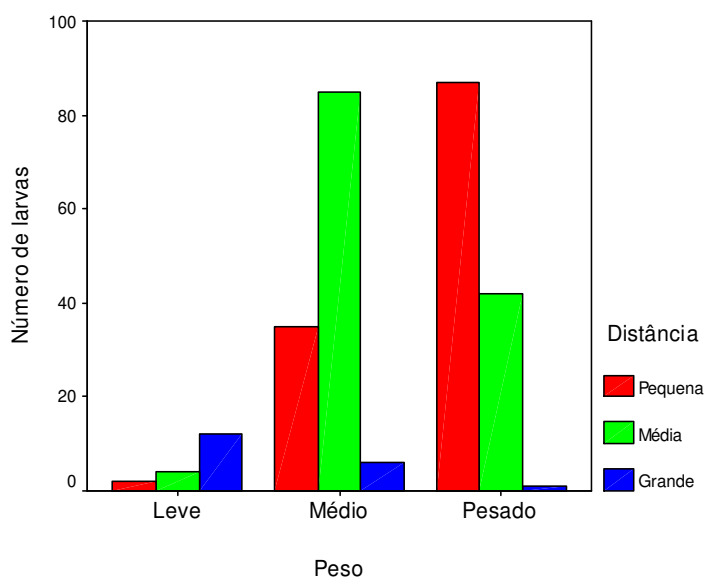


Fig.7: distribuição das larvas de *C. albiceps* de acordo com as faixas de distância (cm) por faixas de peso (mg).

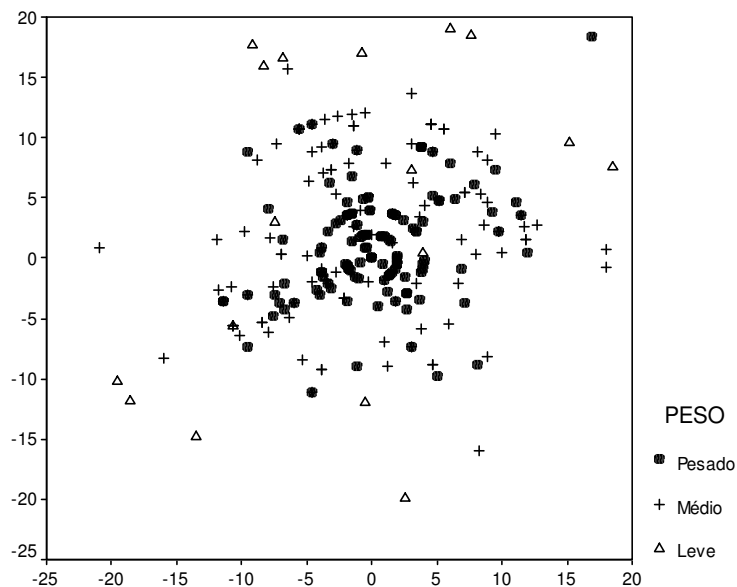


Fig. 8: distribuição das larvas de *C. albiceps* na arena de acordo com as faixas de peso (mg).

A seguir, observa-se na Tab. I (tabela de contingência) a distribuição conjunta do peso e da distância de enterramento. Pela tabela, já fica claro que peso e distância são bem relacionados (qui-quadrado= 3,21, $p= 0.89$), mas para provar isto formalmente foi feito um teste qui- quadrado, que resultou em um valor de 146,4, com apenas 4 graus de liberdade, o que é altamente significativo. Assim, têm-se evidências estatísticas muito fortes de que existe associação entre as duas variáveis peso e distância.

Tabela I: Correlação entre as faixas de peso (mg) e de distância (cm) das larvas de *C. albiceps*.

		Distância Pequena	Distância Média	Distância Grande	Total
Peso leve	Frequência	2	4	12	18
	% dentro de Peso	11.1%	22.2%	66.7%	100.0%
	% dentro de Distância	1.6%	3.1%	63.2%	6.6%
Peso médio	Frequência	35	85	6	126
	% dentro de Peso	27.8%	67.5%	4.8%	100.0%
	% dentro de Distância	28.2%	64.9%	31.6%	46.0%
Peso pesado	Frequência	87	42	1	130
	% dentro de Peso	66.9%	32.3%	.8%	100.0%
	% dentro de Distância	70.2%	32.1%	5.3%	47.4%
Total	Frequência	124	131	19	274
	% dentro de Peso	45.3%	47.8%	6.9%	100.0%
	% dentro de Distância	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%

O fato de já se ter observado anteriormente pelos histogramas, a possível existência de três populações (pelas faixas de peso) torna a análise com tabela de contingência feita anteriormente, mais adequada do que uma análise dos dados sem transformação, na forma contínua. Ainda assim fez-se um gráfico de dispersão entre estas duas variáveis, que encontra-se a seguir (Fig. 9). O fato de se ter muitas repetições de distância para o mesmo peso atrapalha a visualização do gráfico, mas ainda assim é possível perceber uma tendência decrescente nos dados - para pesos maiores as distâncias são menores. O coeficiente de correlação entre distância e peso foi de -0.51, o que é um valor significativamente alto e só não é maior por causa da grande variabilidade dos dados, como se vê no gráfico a seguir (Fig. 9).

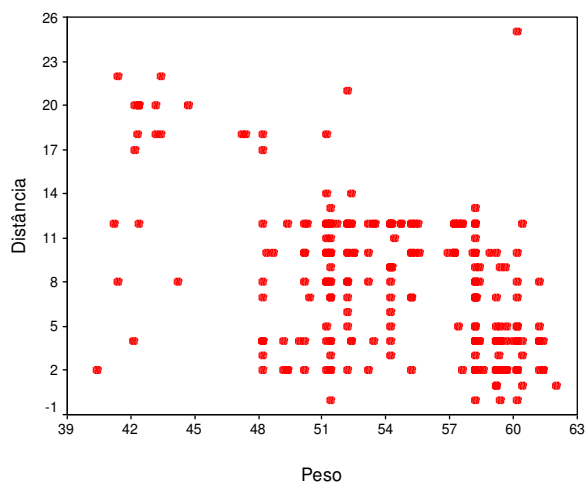


Fig. 9: relação entre as variáveis distância (cm) e peso (mg).

Para uma melhor visualização do gráfico de dispersão, aplicou-se nele uma técnica simples de suavização: sempre que havia mais de um ponto com o mesmo peso, substituiu-se as respectivas distâncias pela sua média. Assim, se tiver 2 larvas com 50 mg, e se uma caminhou 10 cm e a outra caminhou 20 cm, utilizou-se para o gráfico o peso 50 mg com a distância 15 cm, que é a média das duas distâncias. Isso faz o gráfico ficar muito mais "limpo" e fácil de visualizar. Vê-se agora na fig. 10 que realmente existe uma forte tendência de a distância diminuir à medida que o peso aumenta.

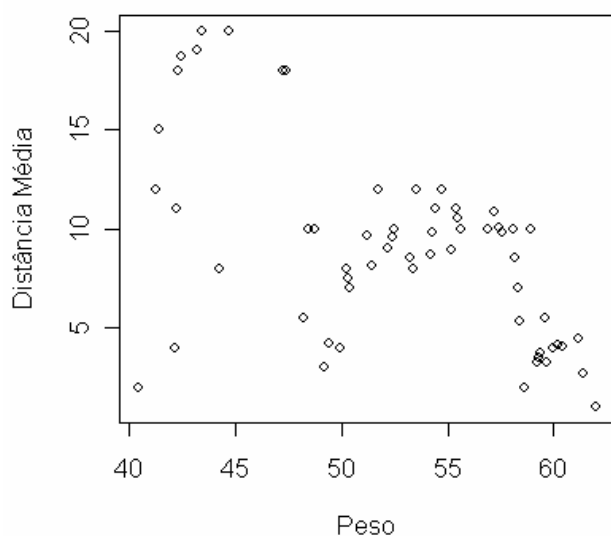


Fig. 10: relação entre as médias das distância (cm) e peso (mg).

O gráfico a seguir é um histograma circular, que mostra a distribuição da direção escolhida pelas larvas na arena (fig. 11a). Vê-se que não existe uma direção preferida; na verdade, as larvas se enterraram em todas as direções, sendo que em algumas direções houve uma certa concentração de larvas, com poucas após os 90 e 180 graus (fig. 11a). A direção média foi de 96 graus, o que é compreensível pois existe um grupo de larvas pouco após os 180 graus que é contrabalanceado por uma outra concentração mais espalhada no lado oposto da circunferência, enquanto que o grupo de larvas após os 90 graus não é contrabalanceado. O fato de que existem concentrações de larvas em várias direções não permite que uma delas seja predominante. Assim, o vetor média é pequeno, 0,196 (lembrando que este valor varia entre zero e 1). Ainda assim vários testes acusaram não uniformidade da direção escolhida pelas larvas. Isto provavelmente acontece porque existem alguns grupos de larvas e alguns setores vazios, e assim não se pode dizer que a distribuição da direção escolhida pelas larvas é uniforme.

A seguir, são mostrados os gráficos da distribuição das larvas com relação à direção escolhida, agora separados por sexo das larvas (fig. 11b e 11c). Vê-se que o padrão de distribuição é muito parecido, ou seja, a direção escolhida não depende do sexo.

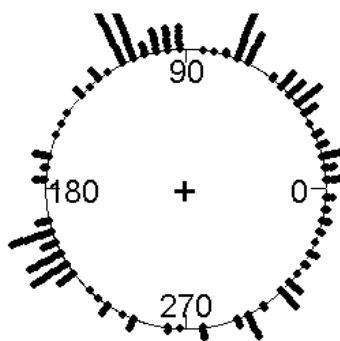


Fig. 11a: distribuição das larvas de *C. albiceps* de acordo com a direção escolhida.

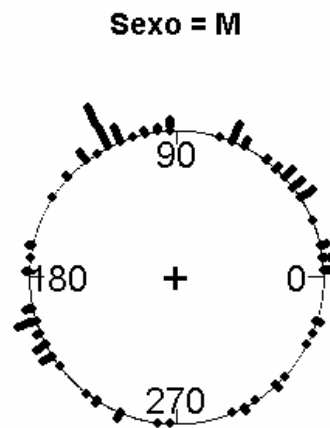


Fig. 11b: distribuição das larvas do sexo masculino de *C. albiceps* de acordo com a direção escolhida.

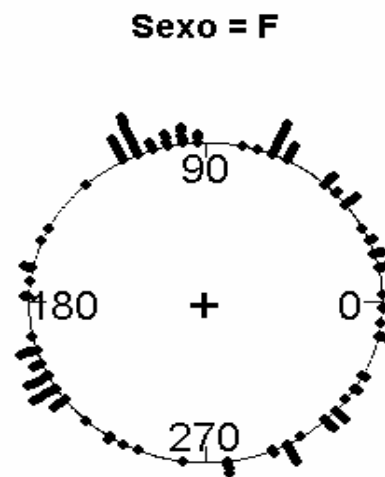


Fig. 11c: distribuição das larvas do sexo feminino de *C. albiceps* de acordo com a direção escolhida.

Tanto a distância como o peso têm correlação com a profundidade. Quanto maior a distância, maior a profundidade média de enterramento das larvas, como pode se ver na fig. 12. Ao contrário da distância, o peso tem correlação negativa com a profundidade. Com o aumento do peso, a profundidade média tende a diminuir. Isso é mostrado na fig. 13.

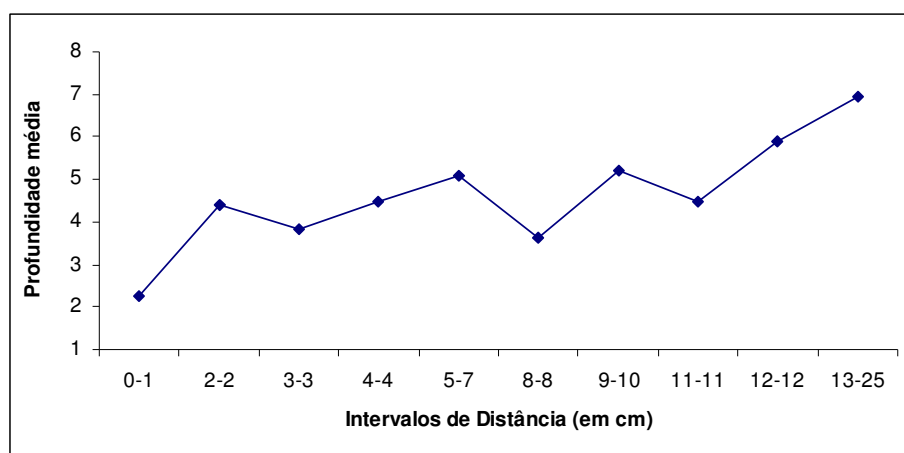


Fig. 12: distribuição da profundidade média (cm) de acordo com os intervalos de distância (cm) das larvas de *C. albiceps*.

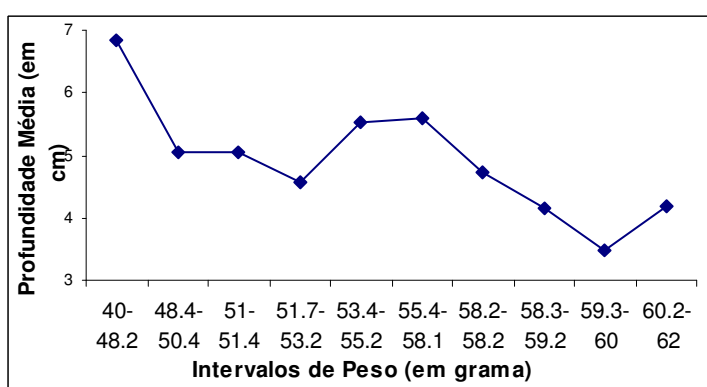


Fig. 13: distribuição da profundidade média (cm) de acordo com os intervalos de peso (mg) das larvas de *C. albiceps*.

A Tab. II a seguir demonstra as variáveis analisadas seguidas de suas médias e desvios- padrões, para pupas de *C. albiceps* coletadas na arena.

Tabela II: médias e desvios-padrões das pupas coletadas de *C. albiceps* na arena, considerando os três experimentos.

	SEXO	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Nº de Pupas
PESO	Não Identificado	56,17	4,38	48,2	61,2	14
	Fêmea	54,97	5,04	41,4	62	142
	Macho	54,02	5,01	40,4	61,4	118
	Total	54,63	5,01	40,4	62	274
DISTÂNCIA	Não Identificado	6,53	3,52	2	12	14
	Fêmea	7,66	5,23	0	25	142
	Macho	7,64	4,76	0	21	118
	Total	7,59	4,95	0	25	274
PROFUNDIDADE	Não Identificado	5,27	3,13	2	12	14
	Fêmea	5,39	3,18	0	20	142
	Macho	4,39	2,60	0	15	118
	Total	4,96	2,97	0	20	274

Uma idéia interessante seria tentar prever a profundidade de enterramento de uma pupa, dado o seu peso, seu sexo e a distância que caminhou. Para isso foi feito um modelo de regressão, e estas três variáveis foram consideradas no modelo. A equação final foi:

$$\text{Profundidade} = 10.023 + 0.119 * \text{Distância} - 1.097 * \text{Sexo M} - 0.101 * \text{Peso}.$$

Embora o sexo das larvas não tenha influência significativa na profundidade de forma isolada, como mostrado na tab. II, conjuntamente, com as outras variáveis em um modelo de regressão, o sexo é importante. Se forem fixadas a distância e o peso, a profundidade média para o sexo M (masculino) é 1 cm menor do que para o sexo F (feminino). Veja que isso vale apenas para uma mesma distância e peso; a profundidade média para ambos os sexos não tem diferença significativa se forem considerados os dados de uma forma geral, como na tab. II. O R^2 do modelo é baixo, 0,364, o que indica que o modelo, se usado para fins de predição, não é muito eficiente.

Embora a diferença nas médias das variáveis analisadas das pupas entre os experimentos não tenham sido significativas, deve se levar em conta que se teve uma amostra razoavelmente grande, o que faz com que o teste estatístico tenha bastante poder para detectar até diferenças bem pequenas de média (ANOVA, $0 < p < 1$ a 5 % de significância)

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou aspectos gerais sobre o processo de dispersão em uma arena circular, e confirmou resultados anteriores (GOMES & VON ZUBEN, 2005) utilizando arenas com mesmo diâmetro e mesma profundidade, porém com serragem, em que as larvas de *C. albiceps* com peso menor são as que têm tendência de se deslocar mais, talvez por estarem à procura de nova fonte alimentar, e não estarem buscando distâncias maiores para se enterrarem para empupar (GOMES & VON ZUBEN 2003; GOMES *et al.*, 2002, 2003). No presente estudo, observou-se uma correlação negativa entre distância e peso das pupas, sendo que isto confere com o outro experimento em serragem (GOMES & VON ZUBEN, 2003) onde observou-se que o peso diminui com a distância.

A maior concentração de pupas foi observada nas profundidades entre 4 cm e 8 cm e apenas 2 larvas chegaram a atingir a profundidade máxima possível a partir da superfície (20 cm). Aparentemente, o que mais limitou a movimentação das larvas no presente estudo foi, além da profundidade para enterramento a partir do centro, a granulometria maior da vermiculita comparada com a serragem.

Com relação a esse experimento que foi realizado, pode-se dizer que as larvas percorreram menores profundidades de enterramento (média de 4,96 cm) comparado ao estudo de GOMES & VON ZUBEN 2005 (10,93 cm), porém, pode-se dizer que o tipo de substrato de uma maneira geral não interfere marcadamente no comportamento de dispersão das larvas de *C. albiceps*, uma vez que elas se distribuíram aleatoriamente e nas mesmas distâncias médias (7,59 cm) próximas às observadas por GOMES & Von Zuben 2005 (8,21 cm), apenas confirmando um comportamento esperado que, na presença de obstáculos para enterrarem para empupar, as larvas se enterram menos profundamente.

Um fato curioso é que não houve uniformidade na distribuição das larvas na arena, como ocorreu em estudo anterior (GOMES & VON ZUBEN, 2005). Não há uma relação entre as variáveis estudadas e o sexo das larvas, ou seja, não se pode dizer que existe uma correlação significativa entre o sexo das moscas e as variáveis de análise.

O fato de se usar arenas em experimentos de dispersão radial larval pós-alimentar de moscas-varejeiras é vantajoso, pois a arena é a melhor figura espacial que representa o ambiente, já que a região que as larvas têm para escolher e se dispersarem em ambiente natural é uma circunferência, no caso a arena (GOMES *et al.*, 2002 e 2003; GOMES & VON ZUBEN, 2005).

A arena circular permite uma dispersão radial das larvas a partir do substrato alimentar localizado no centro, e não simplesmente uma dispersão numa única direção e apenas dois sentidos, como no caso de uma calha (ULLYETT, 1950). Estudos anteriores tinham considerado para o processo de dispersão larval, uma calha de 3 m de comprimento por 30 cm de largura, que permitia a locomoção das larvas em apenas uma direção e dois sentido (GODOY *et al.*, 1995, 1996; BASSANEZI *et al.*, 1997). O presente estudo, ao considerar uma arena circular, reflete melhor as condições de ambiente natural que as larvas vão enfrentar ao abandonar o substrato alimentar em busca de um sítio para pupação.

GODOY *et al.* (1995, 1996) observaram tanto para *C. megacephala* (F.) como para *C. putoria* (Wied.) uma oscilação na frequência de pupas em função da distância a partir do substrato alimentar. Segundo BOLDRINI *et al.* (1997), estas oscilações seriam uma conseqüência da formação de agregações larvais em determinado local do substrato de pupação. Acredita-se que as larvas dispersantes seriam capazes de perceber a densidade de larvas já enterradas em um determinado ponto do substrato, sendo que aglomerações de larvas num determinado ponto induziriam aquelas que ainda estavam caminhando, a procurar sítios de pupação mais distantes.

O comportamento de dispersão larval pós-alimentar e o conseqüente padrão de distribuição espacial das pupas nos sítios de pupação podem ter implicações na maior ou menor susceptibilidade das mesmas ao ataque de predadores e parasitóides, em populações de ambientes naturais (LEGNER 1977; PESCHKE *et al.* 1987).

É interessante citar que esses estudos de dispersão podem ter importantes implicações para investigações médico-criminais, isto porque a presença de larvas e

pupas nas circunvizinhanças de ou em cadáveres humanos pode auxiliar na estimativa do intervalo de tempo entre a morte e a descoberta do cadáver, referido como intervalo pós-morte (IPM). Essa estimativa constitui-se em aspectos fundamentais em estudos de medicina legal (SMITH 1986), sendo que a mesma pode ser seriamente prejudicada, levando a uma subestimativa do IPM, caso não sejam consideradas as larvas dispersantes que se enterraram mais longe do cadáver (VON ZUBEN *et al.*, 1998; GOMES & VON ZUBEN, 2004, 2005).

AGRADECIMENTOS

Os autores do presente trabalho agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização desses estudos (Processo 03/00540-3) e à Iracema Monteiro da Silva pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASSANEZI, R. C.; LEITE, M. B. F.; GODOY, W. A. C.; VON ZUBEN, C. J.; VON ZUBEN, F. J. & REIS, S. F. 1997. Diffusion model applied to postfeeding larval dispersion in blowflies (Diptera: Calliphoridae). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 92(2): 281-286.
- BOLDRINI, J. L.; BASSANEZI, R. C.; MORETTI, A. C.; VON ZUBEN, C. J.; GODOY, W. A. C. ; VON ZUBEN, F. J. & REIS, S. F. 1997. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. Journal of Theoretical Biology, London, 185: 523-531,.
- FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. C.; HÁRSI, C. M.; BURALLI, G. M. & ISHIHATA, G.K. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. Revista de Microbiologia, São Paulo, 15(3): 170-174,.
- GODOY, W. A.C.; FOWLER, H. G.; VON ZUBEN, C. J.; ZITI, L. & RIBEIRO, O. B. 1995. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). Journal of Applied Entomology, Berlin, 119: 263-266.
- GODOY, W. A.C.; REIS, S. F. & VON ZUBEN, C. J. 1996. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera:

- Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior.). Journal of Applied Entomology, Berlin, 120 (4): 423-426.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C. J. GOVONE, J. S. 2002. Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. 2002. Entomologia y Vectores, Rio de Janeiro, 9(01): 115 - 132.
- GOMES, L. & VON ZUBEN, C. J. 2003. Distribuição larval radial pós- alimentar em *Chrysomya albiceps* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae): profundidade, distância e peso de enterramento para pupação. Entomologia y Vectores, Rio de Janeiro, 10: 211- 222.
- GOMES, L; VON ZUBEN, C. J. & SANCHES, M. R. 2003. Estudo da dispersão larval radial pós- alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Revista Brasileira de Entomologia, Curitiba, 47 (2): 229- 234.
- GOMES, L. & VON ZUBEN, C. J. 2004. Insetos ajudando a desvendar crimes: Entomologia forense. Ciência Hoje, Rio de Janeiro, 208: 28- 31.
- GOMES, L. & VON ZUBEN, C. J. 2005. Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology. Forensic Science International, Ireland. (in press).
- GREENBERG, B.1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera). Annals of Entomological Society of America, Maryland, 83: 1210-1214.
- GUIMARÃES, J.H.; PRADO, A. P. & LINHARES, A. X. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, 22 (1): 53-60.
- GUIMARÃES, J.H.; PRADO, A. P. & BURALLI, G. M. 1979. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). Revista Brasileira de Entomologia, São Paulo, 23 (4): 245-255.
- GUIMARÃES, J. H.; PAPAVERO, N. & PRADO, A. P. 1983. As míases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). Revista Brasileira de Zoologia, São Paulo, 1 (4) : 239-416.

- HANSKI, I. 1987. Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence.. *Ecological Entomology*, Oxford, 12, p. 257-266.
- HENGEVELD, R. 1989. *Dynamics of biological invasions*. New York: Chapman & Hall, 160 p..
- IMBIRIBA, A. S.; IZUTANI, D. T.; MILHORETO, I. T. & LUZ, E. 1977. Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, Curitiba, 20: 35-39.
- LEGNER, E. F. 1977. Temperature, humidity and depth of habitat influencing host destruction and fecundity of muscoid fly parasites. *Entomophaga*, Paris, 22: 199-206.
- LEVOT, G.W., BROWN, K. R. & SHIPP, E. 1979. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. *Bulletin of Entomological Research*, Walingford, 69: 469-475.
- PESCHKE, K.; KRAPF, D. & FULDNER, D. 1987. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. *Zoological Jb. System*, London, 114: 241-265,.
- REIS, S. F.; STANGENHAUS, G.; GODOY, W. A. C.; VON ZUBEN, C. J. & RIBEIRO, O. B. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacepala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia*, São Paulo, 38(1): 33-34.
- SMITH, K. G. V. 1986. *A Manual of Forensic Entomology*. Ithaca : Cornell University Press.
- ULLYETT, G. C. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. 1950. *Philosophical Transactions of Royal Society of London*, London, B 234: 77-174.
- VON ZUBEN, C. J.; BASSANEZI, R. C.; REIS, S. F.; GODOY, W. A. C. & VON ZUBEN, F. J. 1996. Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, 120 (3): 379-382.
- VON ZUBEN, C. J. 1998. 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, São Paulo, 4: 525-533.
- WELLS, J. D. & GREENBERG, B. 1992. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. Bulletin of Entomological Research, Walingford, 82: 133-137.
- ZAR, J. H. 1999. Biostatistical Analysis, Prentice Hall, New Jersey, 666 p..
- ZUMPT, F. 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. London: Butterworths, 267 p.

CAPÍTULO 6

DISPERSAL AND BURIAL BEHAVIOR IN LARVAE OF *CHRYSOMYA*
MEGACEPHALA AND *CHRYSOMYA ALBICEPS* (DIPTERA, CALLIPHORIDAE)

Journal of Insect Behavior 18 (2) 281- 292. 2005.

Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae)

Abstract

Blowflies use discrete and ephemeral substrates to feed their larva. After they run out of food, the larvae begin to disperse in order to find adequate places for pupation or additional food sources, a process named post-feeding larval dispersal. Briefly state the aspects and why they are important were studied in a circular arena of 25 cm in diameter and covered with wood shavings to a height of 40 cm allowing post-feeding dispersal from the center of the arena. Larvae of both *Chrysomya albiceps* and *C. megacephala* were used in 5 experiments for each species. For each pupa location,- determined as distance from the center and,- the depth, and -weight were evaluated. Statistical tests were done to verify the relation between weight, depth and distance for pupation and for larvae of two species shows that the media distance is significantly different for two species and for *C. megacephala* this distance is greater than the distance of *C. albiceps*. The depth is too different for each species being that larvae of *C. megacephala* buries deeper than *C. albiceps*. With relation of weight, there is no statistic evidence that have any difference between weight for pupation for each species.

Key words. Blowflies, Calliphoridae, Dispersal, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* and larval dispersal.

Introduction

Dipterans belonging to the Calliphoridae family present a great ecological diversity and occupy various types of habitat. They develop in various substrates, from decomposing organic matter to living animal tissues (Zumpt, 1965). Flies of the genus *Chrysomya*, from the Calliphoridae family, originated from Africa and Australasia

were probably introduced into the American continent by ships (Guimarães *et al.*, 1978; 1979). In 1975, 20 years after the accidental escape of African bees in southeast Brazil, three species of *Chrysomya*, *C. megacephala* (Fabricius), *C. albiceps* (Wiedemann) and *C. putoria* (Wiedemann) were discovered in the same region (Imbiriba *et al.*, 1977; Guimarães *et al.*, 1978).

Flies from this genus have great medico-sanitary importance as they carry enteropathogens such as viruses, bacteria and helminths (Furlanetto *et al.*, 1984; Lima & Luz, 1991) and they may cause myiasis to animals and men (Zumt, 1965; Guimarães *et al.*, 1983). They are also of fundamental importance in forensic entomology studies, as they can be indicators of the decomposition time of human cadavers (Greenberg, 1990; Von Zuben *et al.*, 1996).

Chrysomya flies have drawn attention for being an exotic species and for their impact on the native community of necrophagous dipterans (Wells & Greenberg, 1992). The impact caused by the introduction of exotic species is interesting for both to ecologists and evolutionists who study the process of these invasions, which include competition, predation and dispersal as well as stability and extinction of local populations (Hengeveld, 1989). The understanding of the phenomena involved in this invasion process depends on the study of certain population parameters and the space-time environmental structure in which these phenomena occur (Wiens, 1976; Hengeveld, 1989). In addition there are phenomena that occur on a small spatial scale such as the dispersal of immature stages of the invading organisms. In this context and in the specific case of the necrophagous flies, the post-feeding larval dispersal in search of a pupation site are ecologically interesting.

The substrates in which blowflies develop are discrete and ephemeral (Backer, 1961, 1969; Atkinson & Shorrocks, 1981; Ives, 1989, 1991). Normally these substrates are saturated with insects of one or more species, involving an intense competition for resources (Hanski, 1987).

The larval stage is the main period when blowflies limited food resources. The competition for these resources is generally of the exploitative type (Levot *et al.*, 1979; Reis *et al.*, 1994), where each larva attempts to feed as much as possible before the complete exhaustion of resources (Ullyett, 1950; Backer, 1961; 1969; De Jong, 1976; Levot *et al.*, 1979; Lomnicki, 1988).

Following this competition, the larvae begin to search for a pupation site in the habitat or for another source of food if they do not have enough weight for pupation. This process is called post-feeding larval dispersal (Greenberg, 1990).

Some experimental studies on calliphorid larval dispersal have already been done (Greenberg 1990; Kocarek, 2001) and models on post-feeding larval dispersal restricted to one direction based on diffusion equations have been developed (Bassanezi *et al.*, 1997), on statistical analyses of spatial distribution (Godoy *et al.*, 1995; 1996; Von Zuben *et al.*, 1996), and on non-local interactions (Boldrini *et al.*, 1997). All of these are a basis for future experimental studies simulating the natural environment, as proposed in this study.

With the use of a circular arena, this study reflects better the conditions of the natural environment the larvae will face when they abandon their feeding substrate in search of a site to pupate (Ullyett, 1950). A circular arena allows a radial dispersal from a central feeding substrate unlike the dispersal in only one direction allowed by a trough.

The objective of this study is to investigate frequency distribution patterns and the burial and dispersal behavior in larvae of *C. megacephala* and *C. albiceps* to evaluate if these two species have a different pattern in this kind of behavior and compare with previous studies (Gomes & Von Zuben, 2002, 2003; Gomes *et al.* 2002, 2003).

Material and Methods

Specimens of *C. albiceps* and *C. megacephala* were collected in the vicinities of the Campus of Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil. Adults were maintained in laboratory conditions, in cages (30 x 30 x 30 cm) covered with nylon at $25 \pm 1^{\circ}$ C and were fed water and sugar *ad libitum*. Adult females were fed fresh beef liver to permit the complete development of the gonotrophic cycle (Linhares, 1988). Newly hatched larvae of *C. albiceps* and *C. megacephala* were obtained from adult flies kept at constant temperature (25°C) and 70% relative humidity, and raised in vials containing 50 g of ground beef. After the larvae developed, the meat was placed in the center of a circular arena totally illuminated (to avoid tendencies) for them to move

out of it. Arenas were 25 cm in diameter, covered with 40 cm of wood shavings. Fifty (50) larvae were used in five replications for each species.

After the larvae pupated, they were located and removed from the wood shavings. The depth of the pupation site and its distance from the center of the arena were measured with rulers and measuring tapes and the counting was done from the periphery to the center.

Each pupa was individualized in plastic flasks and weighed on an Ohaus analytical scale before the adults emerged. Pupal weight was measured in milligrams, with a precision of 0.01 mg at the same time that pupae were located. After they were weighted, each pupae was returned to its individual flask for identification of sex of adults after emergence.

Statistical analysis

The Pearson correlation were performed to analyze the correlation among variables and ANOVA test to check the difference among five experiments and groups (Zar, 1999).

Results

Average, standard deviation and sample size (N) for burial depth, distance from the arena center and weight of the pupae of *C. albiceps* and *C. megacephala* are represented on Table I.

Table I: Distance, depth and weight of larvae of *C. albiceps* and *C. megacephala* considering five experiments.

Variable	Specie	N	Mean	Std. Deviation
Distance (cm)	<i>C. albiceps</i>	249	3,22	1,721
	<i>C. megacephala</i>	250	4,68	2,874
	Total	499	3,95	2,478
Depth (cm)	<i>C. albiceps</i>	249	9,76	5,033
	<i>C. megacephala</i>	250	10,98	8,686
	Total	499	10,37	7,121
Weight (mg)	<i>C. albiceps</i>	249	57,697	3,5402
	<i>C. megacephala</i>	250	57,489	4,4771
	Total	499	57,593	4,0342

No significant difference among replications was found for both species and thus the data were pooled. The ANOVA test for five replications for *C. albiceps* showed that distance ($F= 1,5$ and $0,20$ significantly), depth ($F= 1,5$ and $0,20$ significantly) and weight ($F= 1,5$ and $0,28$ significantly) between and within groups were not different. The ANOVA test for five replications for *C. megacephala* showed that distance ($F= 3,7$ and $0,54$ significantly), depth ($F= 6,5$ and $0,65$ significantly) and weight ($F= 2,8$ and $0,47$ significantly) between and within groups were not different.

The Table II of ANOVA for pupae of two species shows that the media distance is significantly different for two species and for *C. megacephala* this distance is greater than the distance of *C. albiceps*. The depth is too different for each species being that larvae of *C. megacephala* buries deeper than *C. albiceps*. With relation of weight, there is no statistic evidence that have any difference between weight for pupation for each species. Thus, at 5 % of significance only distance and depth are different between species.

Table II: ANOVA test comparing the two species in relation to the variables analyzed.

Variable		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Distance (cm)	Between Groups	267,789	1	267,789	47,681	0,000
	Within Groups	2.791,258	497	5,616		
	Total	3.059,047	498			
Depth (cm)	Between Groups	122,508	1	122,508	2,758	0,097
	Within Groups	22.029,076	496	44,413		
	Total	22.151,584	497			
Weight (mg)	Between Groups	5,417	1	5,417	0,332	0,564
	Within Groups	8.099,237	497	16,296		
	Total	8.104,654	498			

With respect to the depth of pupation, *C. albiceps* pupated at an average of 9,8 cm (Fig. 1a) and *C. megacephala* at an average of 11,0 cm (Fig. 1b), these means are significantly different. It is interesting that the maximum depth for pupation in *C. albiceps* was 23 cm and in *C. megacephala* was 32cm.

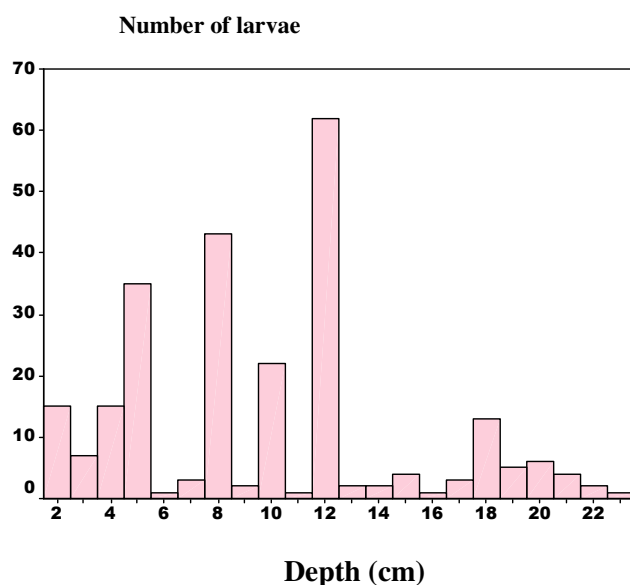


Figure 1a: Number of larvae per burial depth of *C. albiceps* in the arena.

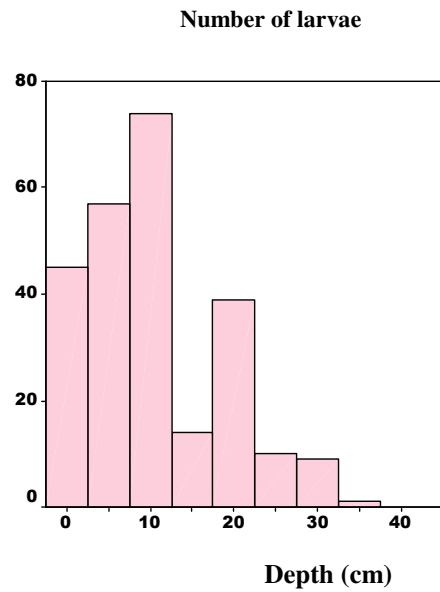


Figure 1b: Number of larvae per burial depth (cm) of *C. megacephala* in the arena.

With respect to distance from the center of the arena, *C. albiceps* preferred to pupate on average 3,2 cm from the center (Fig. 2a) and *C. megacephala* was on average 4,7cm from the center (Fig. 2b). Only six larvae of *C. albiceps* reached a distance greater than 8 cm when compared with three of the 50 larvae of *C. megacephala*, emphasizing that the larvae of *C. megacephala* move greater distances in this process when compared with *C. albiceps* (Gomes *et al.*, 2003).

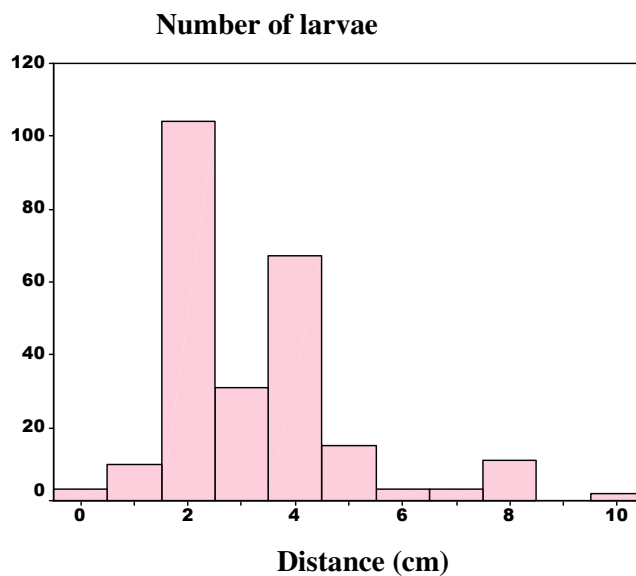


Figure 2a: Number of larvae per distance (cm) of *C. albiceps*.

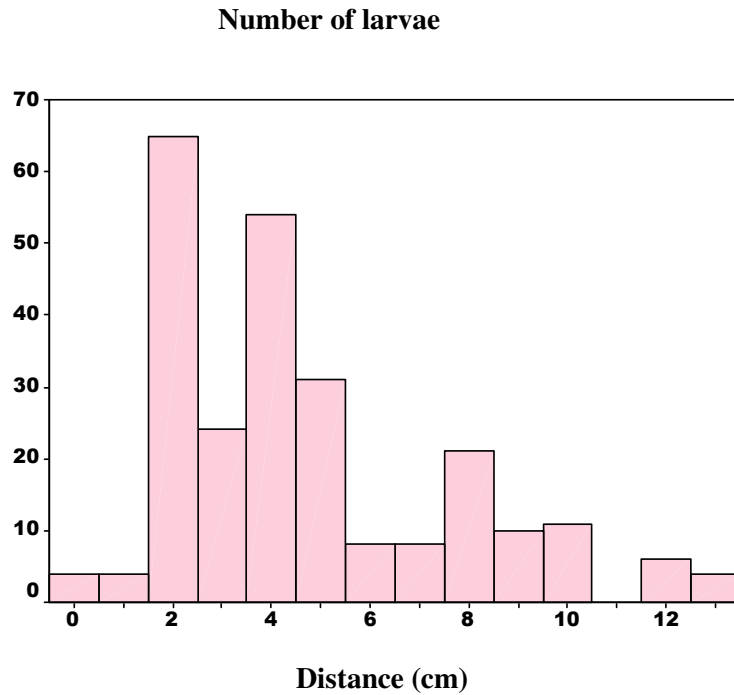


Figure 2b: Number of larvae per distance (cm) of *C. megacephala*.

Finally, analyzing the larval weight distribution, the average of weight of pupation for *C. albiceps* was 57,7 mg (Fig. 3a) and for *C. megacephala* was 57,5 mg (Fig. 3b).

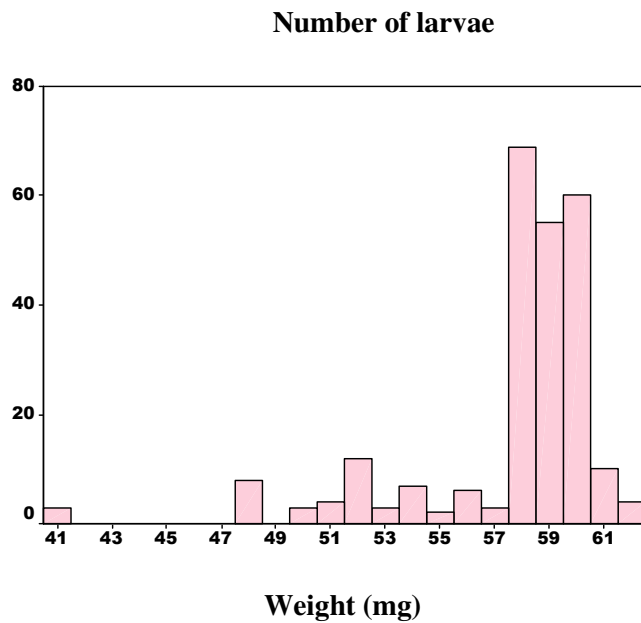


Figure 3a: Number of larvae per weight (mg) of pupation of *C. albiceps*.

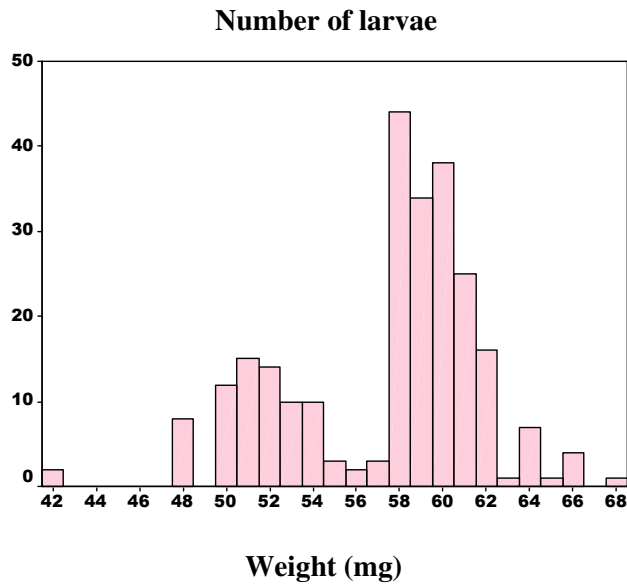


Figure 3b: Number of larvae per weight (mg) of pupation of *C. megacephala*.

A Pearson correlation was performed to analyze the correlation between variables in *C. albiceps* and *C. megacephala* (Table III).

Table III: Pearson correlations to the variables of larvae of *C. albiceps* and *C. megacephala*.

<i>C. albiceps</i> <i>C. megacephala</i>	Distance	Depth	Weight
Distance	1,000	-0,057	-0,401
Depth	-0,057	1,000	0,180
Weight	-0,401	0,180	1,000
	1,000	-0,110	-0,590
	-0,110	1,000	-0,120
	-0,590	-0,120	1,000

For *C. megacephala* only the negative correlation between weight and distance was significant (Table III), in *C. albiceps* the positive correlation between weight and depth was significant and weight and distance showed a significant negative correlation (Table III). This suggests the larvae of *C. albiceps* have a different behavior compared with *C. megacephala* during the process of postfeeding searching for sites for pupation.

Discussion

Dispersal is one of the most significant aspects in the life history of insects. The complexity of dispersal is further enhanced by the spatial scale in which it occurs, which may vary from centimeters to hundreds of kilometers (Gaines and Bertness, 1993).

This study demonstrated some general aspects on the dispersal process of larvae in a circular arena and confirmed former results using deeper arenas of bigger diameter. The lightest larvae tend to move longer distances, maybe to search new sources of food, not of a site to pupate (Gomes & Von Zuben, 2002, 2003; Gomes *et al.* 2002, 2003).

The greatest concentration of pupae was found in depths greater than 10 cm (Figure 3a and 3b) and two larvae of *C. megacephala* reached the depth of 32 cm from surface. It could indicate that in natural environment the larvae of this species reach deeper depths when compared with former studies (Gomes & Von Zuben, 2003; Gomes *et al.*, 2003).

Apparently, what limited larval movement the most in this study was the distance, not depth for burial, when compared with natural environments. The use of an arena with 25 cm in diameter and 40 cm of depth allowed the larvae to bury deeper depths than other recent studies where the arena had 50 cm in diameter and 20 cm depth (Gomes *et al.* 2003) and 2m of diameter and 5 cm of depth Gomes & Von Zuben, 2002, 2003). Larval movement probably took place mainly to find a pupation site, even though the possibility that some pupae were searching for an additional source of food cannot be discarded (Gomes *et al.* 2002).

Former studies had considered a trough 3 m long and 30 cm wide for the larval dispersal process. This trough allowed larval movements in only one direction (Godoy *et al.* 1995, 1996; Bassanezi *et al.* 1997). With the use of a circular arena, this study reflects better the conditions of the natural environment the larvae will face when they abandon their feeding substrate in search of a site to pupate, in spite of the limitation of the distance (Ullyett, 1950). A circular arena allows a radial dispersal from a central feeding substrate unlike the dispersal in only one direction allowed by a trough.

Godoy *et al.* (1995, 1996) observed an oscillation in pupal frequency as a function of distance from the feeding substrate for *C. megacephala* as well as for *C. putoria*. According to Boldrini *et al.* (1997), these oscillations would be a consequence of the creation of larval aggregations in certain sites of the pupation substrate. It is believed that the dispersing larvae can somehow sense the density of other larvae already buried in a certain area of the substrate, and that would cause those larvae to search for more distant pupation sites.

The postfeeding larval dispersal behavior and the consequent pattern of spatial distribution of pupae in pupation sites could have implications on greater or lesser larval susceptibility to predator or parasitoid attacks on natural environment populations (Peschke *et al.*, 1987; Legner, 1977). *Chrysomya albiceps* larvae prey on *C. megacephala* larvae during larval dispersal. The latter, by dispersing farther and deep may escape predation (Wells & Greenberg, 1992; Hanski, 1987; Faria *et al.*, 1999; Faria & Godoy, 2001).

The analysis of postfeeding larval dispersal of blowflies could have important implications for medico-criminal investigations considering forensic entomology, since the presence of larvae and pupae in the vicinities or under human corpses can aid in estimating their postmortem intervals (PMI). (Smith, 1986; Gomes & Von Zuben, 2002, 2003; Gomes *et al.* 2002, 2003)

ACKNOWLEDGMENTS

Leonardo Gomes has been supported by fellowships from FAPESP (98/09939-6, 03/00540-3) and Cláudio José Von Zuben by research fellowships from CNPq. To Iracema Monteiro da Silva and Guilherme Gomes collecting the data. To referees by the comments to improve this manuscript.

References

- Atkinson, W.D., & Shorrocks, B. (1981) Competition on a divided and ephemeral resource: a simulation model. *J. Anim. Ecol.* 50: 461-471.
- Backer, K. (1961) An analysis of factors which determine success in competition for food among larvae of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Neerl. Zool.* 14: 200-281.
- Backer, K. (1969) Selection for rate of growth and its influence on competitive ability of larvae of *Drosophila melanogaster*. *Neth. J. Zool.* 19: 541-595.
- Bassanezi, R. C., Leite M. B. F., Godoy, W. A. C., Von Zuben C. J., Von Zuben, F. J. & Reis, S. F. (1997). Diffusion model applied to postfeeding larval dispersal in blowflies (Diptera: Calliphoridae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92: 281-286.
- Boldrini J. L., Bassanezi, R. C., Moretti, A. C., Von Zuben, C. J., Godoy, W. A. C., Von Zuben, F. J. & Reis, S. F. (1997). Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. *J. Theor. Biol.* 185: 523-531.
- de Jong, G. (1976) A model of competition for food. I. Frequency-dependent viabilities. *Amer. Nat.* 110:1013-1027.
- De Jong, G. (1979). The influence of distribution of juveniles over patches of food on the dynamics of a population. *Neth. J. Zool.*, 29: 33-51.
- Faria, L. D. B., Orsi, L., Trinca, L. A. & Godoy, W. A. C. (1999) Larval predation by *Chrysomya albiceps* on *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria*. *Entomol. Exp Appl.* 90: 149-155.
- Faria, L. D. B. & Godoy, W. A. C. (2001) Prey choice by facultative predator larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 875-878.

- Furlanetto, S. M. P., Campos, M. L. C., Hársi, C. M., Buralli, G. M. & Ishihata, G. K. (1984) Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Rev. Microb.* 15: 170-174.
- Gaines, S. D. and Bertness (1993). The dynamics of juvenile dispersal: why field ecologists must integrate. *Ecology*, 74: 2430-2435
- Godoy, W. A.C., Fowler, H. G., Von Zuben, C. J., Ziti, L. & Ribeiro, O. B. (1995) Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J. Appl. Entomol.* 119: 263-266.
- Godoy, W. A. C., Reis, S. F. & Von Zuben, C. J. (1996) Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. *J. Appl. Entomol.* 120: 423-426.
- Gomes, L., Von Zuben, C. J. & Govone, J. S. (2002) Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. *Entomol. Vect.* 9: 115 - 132.
- Gomes, L. & Von Zuben, C. J. 2003. Distribuição larval radial pós- alimentar em *Chrysomya albiceps* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae): profundidade, distância e peso de enterramento para pupação. *Entomol. Vect.* 10: 211- 222.
- Gomes, L. & Von Zuben, C. J. (2003) Dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Profundidade, Distância e Peso de enterramento para pupariação. *Biosc. Jour.* 18: 67-76.
- Gomes, L., Von Zuben, C. J., Sanches, M. R. 2003: Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). *Revsta Bras. Entomol.* 47: 229-234.
- Greenberg, B. (1990) Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and a muscid (Diptera). *Ann. Entomol. Soc. America* 83: 1210-1214.
- Guimarães, J. H., Prado, A. P. & Linhares, A. X. (1978) Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 22: 53-60.
- Guimarães, J. H., Prado, A. P. & Buralli, G. M. (1979) Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomol.* 23: 245-255.

- Guimarães, J. H., Papavero, N. & Prado, A. P. (1983) As míases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). *Rev. Bras. Zool.* 1: 239-416.
- Hanski, I. (1987) Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. *Ecol. Entomol.* 12: 257-266.
- Hengeveld, R. (1989) *Dynamics of biological invasions*. Chapman & Hall, New York.
- Imbiriba, A. S., Izutani, D. T., Milhoreto, I T. & Luz, E. (1977) Introdução da *Chrysomya chloropyga* (Wiedemann, 1818) na região Neotropical (Diptera: Calliphoridae). *Arq. Biol. Tecnol.* 20: 35-39.
- Ives, A. R. (1989). The optimal clutch size of insects when many females oviposit per patch. *Am. Nat.*, 133: 671-687.
- Ives, A. R. (1991). Aggregation and coexistence in a carrion fly community. *Ecol. Mon.*, 61: 75-94.
- Kocarek, P. (2001) Diurnal patterns of postfeeding larval dispersal in carrion blowflies (Diptera, Calliphoridae). *Europ. Jour. Entomol.* 98: 117-119
- Legner, E. F. (1977) Temperature, humidity and depth of habitat influencing host destruction and fecundity of muscoid fly parasites. *Entomophaga*, 22, 199-206.
- Levot, G.W., Brown, K. R. & Shipp, E. (1979) Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. *Bull. Entomol. Res.* 69: 469-475.
- Lima, M. L. P. S., Luz, E. (1991) Espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) como veiculadoras de enterobactérias patogênicas em Curitiba, Paraná, Brasil. *Acta Biol. Paraná.* 20: 61-83.
- Linhares, A. X. (1988) The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. *Rev. Bras. Ent.* 32: 383- 392.
- Lomnicki, A. (1988) *Population ecology of individuals*. Princeton: Princeton Press, 233 p.
- Peschke, K., Krapf, D. & Fuldner, D. (1987) Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. *Zool. Jb. Sys.* 114: 241-265.
- Reis, S. F., Stangenhuis, G., Godoy, W. A C., Von Zuben, C. J. & Ribeiro, O. B. (1994) Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Rev. Bras. Entomo.* 38: 33-34.

- K. G. V. Smith. *A manual of forensic entomology*. Ithaca : Cornell University Press, 475p, 1986.
- Ullyett, G. C. (1950) Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. 1950. *Philos. Trans. Royal Soc. of London* B234: 77-174.
- Von Zuben, C. J., Bassanezi, R. C., Reis, S. F., Godoy, W. A. C. & Zuben, F. J. V. (1996) Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal. *J. Appl. Entomol.* 120: 379-382.
- Wells, J. D. & Greenberg, B. (1992) Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. *Bull. Entomol. Res.* 82: 133-137.
- Wiens, J. A. (1976) Population responses to patchy environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 7: 81-120 .
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- Zumpt, F. 1965. *Myiasis in man and animals in the Old World*. Butterworths, London.

CAPÍTULO 7**COMPORTAMENTO DA DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR:
CHRYSOMYA MEGACEPHALA, *CHRYSOMYA ALBICEPS* E *COCHLIOMYIA*
MACELLARIA (DIPTERA, CALLIPHORIDAE).**

Enviado para Neotropical Entomology

Comportamento da dispersão larval pós-alimentar: *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya albiceps* e *Cochliomyia macellaria* (Diptera, Calliphoridae)

ABSTRACT - Blowflies use discrete and ephemeral substrates to feed their larvae. After they run out of food, the larvae begin to disperse in order to find adequate places for pupation or additional food sources, a process named post-feeding larval dispersal. Some important aspects of this process were studied in a circular arena allowing the joint radial post-feeding dispersal of three species from the center of the arena with *C. albiceps*, *C. megacephala* and *Cochliomyia macellaria* larvae. To determine the location of each pupa the arena was divided in four quadrants. The distance from the center, the depth and weight of each pupa were evaluated. Statistical tests were done to verify the relation between weight, depth and distance for pupation. From the total of 300 larvae released, 262 were collected considering the three experiments. It showed that 79% of larvae that are in the center are of the species *C. albiceps*; *Chrysomya megacephala* was concentrated so much in the first quadrant and *Cochliomyia macellaria* was more concentrated in the first quadrant and in the third. It demonstrates that *C. albiceps* really affects the pattern of dispersion of other larvae species.

KEY WORDS: Blowflies, Calliphoridae, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* and larval dispersal.

RESUMO - As moscas-varejeiras utilizam-se de substratos discretos e efêmeros para alimentar suas larvas. Após saírem desses substratos, as larvas começam a dispersar em busca de locais adequados para pupação e fontes adicionais de alimento, um processo denominado dispersão larval pós-alimentar. Alguns aspectos importantes desse processo

foram estudados em uma arena permitindo a dispersão radial simultânea a partir do centro, de larvas de *C. megacephala*, *C. albiceps* e *Cochliomyia macellaria*. Para determinar a localização de cada pupa, a arena foi dividida em quatro quadrantes. A distância a partir do centro, a profundidade e o peso de cada pupa foram determinados. Testes estatísticos foram feitos para verificar a relação entre peso, profundidade e distância para pupação. De um total de 300 larvas soltas, 262 foram coletadas considerando os três experimentos, demonstrando que 79% das larvas que estão no centro são de *C. albiceps*, o que parece indicar uma forte preferência desta espécie pelo centro; *Chrysomya megacephala* ficou bastante concentrada no primeiro quadrante e *Cochliomyia macellaria* ficou mais concentrada no primeiro e terceiro quadrantes. Isso demonstra a provável interferência das larvas de *C. albiceps* no padrão de dispersão das larvas das outras duas espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Moscas-varejeiras, Calliphoridae, *Cochliomyia macellaria*, *Chrysomya albiceps*, *Chrysomya megacephala* e dispersão larval.

As moscas do gênero *Chrysomya* e *Cochliomyia* têm grande importância médico-veterinária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (Furlanetto *et al.* 1984), podendo causar também miíases nos animais e no homem (Zumpt 1965, Guimarães *et al.* 1983). São de fundamental importância também em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (Wells & Greenberg 1992, Von Zuben *et al.* 1996, Gome *et al.* 2005).

Além disso, nessas moscas pode-se observar a utilização de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos e alimentação das larvas (Hanski 1987, Peschke *et al.* 1987) sendo o estágio larval o principal período em que ocorre limitação de recursos alimentares, em que a competição por recursos é, geralmente, do tipo exploratório (Reis *et al.* 1994), implicando na necessidade de ingestão do máximo de alimento possível, antes da completa exaustão dos recursos (Ullyett 1950). Após essa competição, as larvas começam a procurar por um sítio para pupação, ou por mais fontes de alimento

adicional, caso ainda não tenham obtido o peso mínimo para a pupação, processo esse denominado de dispersão larval pós-alimentar (Greenberg 1990).

Alguns estudos com dispersão larval pós-alimentar em *C. megacephala* e *C. albiceps* já foram feitos, com a intenção de se observar padrões de distribuição, bem como analisar as variáveis peso, distância e profundidade em estudo, após o comportamento de busca por substratos para pupação ou por novas fontes de alimento (Gomes & Von Zuben 2003, Gomes *et al.* 2002, 2003). Porém, uma das questões levantadas nesses estudos foi se a dispersão considerando conjuntamente duas ou mais espécies influenciaria o processo de dispersão como um todo e o padrão final de enterramento para pupação das diferentes espécies.

O objetivo desse trabalho foi então, estudar, sob condições experimentais, em simulação de ambiente natural, a dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala*, *C. albiceps* e *Cochliomyia macellaria* em arena com vermiculita e estabelecer comparação com outros estudos (Gomes *et al.* 2002, 2003, Gomes & Von Zuben 2003) com espécies isoladas, além de analisar a relação entre as variáveis peso, distância e profundidade de enterramento em arena que permitisse às larvas deslocamento em todas as direções.

Material e Métodos

Assim, exemplares adultos de *C. megacephala*, *C. albiceps* e *C. macellaria* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP (22°24'41''S e 47°33'41''W), utilizando-se como isca carcaça de peixe. Os exemplares coletados foram identificados até espécie e mantidos em gaiolas teladas, em sala com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 60% de umidade relativa e fotofase de 12 horas, recebendo água, açúcar e fígado *ad libitum*.

Foram utilizados para esse estudo três experimentos dispostos em arena com 30 cm de diâmetro e forrada com uma camada de 20 cm de vermiculita, com suas margens delimitadas por papelão. A camada de vermiculita serviu para investigar profundidade máxima em que as larvas se enterravam para empupar (Gomes *et al.* 2002, 2003, Gomes & Von Zuben 2003). Além disso, foram utilizadas 100 larvas por espécie para cada experimento, totalizando 300.

Cada arena circular foi montada sobre o piso de uma sala do laboratório iluminada de forma homogênea (a fim de evitar tendências na dispersão das larvas) e

dividida em quatro quadrantes com faixas de distância (a cada 3 cm) e faixas de profundidade (a cada 4 cm). O desenvolvimento larval deu-se em 100 g carne moída bovina até o 3º ínstar larval por experimento, sendo o substrato colocado no centro da arena circular, permitindo às larvas o abandono e emigração para empupar.

As pupas foram retiradas da vermiculita, sendo localizadas por quadrante. Medições foram feitas para cada pupa visando a estimativa da distância em relação ao centro e profundidade do local de pupação, com o auxílio de régua e trena. A coleta das pupas começou da periferia da arena para o centro. Cada pupa foi pesada em balança analítica e individualizada em frascos de plástico, antes que ocorresse a emergência do adulto. Os indivíduos adultos foram então sexados após a emergência.

Foram feitos testes estatísticos tais como ANOVA, qui-quadrado e correlação de Pearson com 95% de intervalo de confiança (Zar 1999).

Resultados e Discussão

É importante salientar que nestes experimentos têm-se apenas quatro indicações diferentes para a direção de enterramento, mais o centro. Por isso, ao contrário do que foi feito nos experimentos anteriores (Gomes *et al.* 2002, 2003, Gomes & Von Zuben 2003), aqui não se pode estudar o comportamento das larvas com relação a direção de enterramento, a qual está muito pouco detalhada, mas este procedimento é indicativo de uma nova maneira de se coletar dados em experimentos desse tipo, de forma a otimizar a coleta e se aumentar a amostragem, em comparação com estudos anteriores (Gomes *et al.* 2002, 2003, Gomes & Von Zuben 2003). Considerando cada setor como um quadrante, mais o centro, e estudando as variações na distribuição das larvas nestes cinco locais das arenas, bem como a profundidade, chegou-se aos valores de percentual de pupas das três espécies nas três arenas (Tab. 1).

Tabela 1: Percentual do total de pupas das três espécies coletadas nas três arenas do estudo.

	Arena 1	Arena 2	Arena 3	Total
Centro	23	12	15	16
Quadrante 1	21	20	25	21
Quadrante 2	23	22	23	23
Quadrante 3	24	37	21	29
Quadrante 4	9	9	16	11
Total	100	100	100	100

Após a coleta de dados, pôde-se constatar que o teste qui-quadrado (valor de 11,284, $p=0,1863$ e $GL=6$) mostrou que não se tem evidências para dizer que as larvas se distribuíram de forma heterogênea nas arenas, e por isso os três experimentos foram agrupados durante as análises, como se fossem um único experimento com 262 larvas estudadas.

A hipótese a ser testada foi se as larvas apresentavam distribuição uniforme nos quadrantes. A Tabela 2 compara a distribuição observada das larvas nos quadrantes, com a distribuição uniforme.

Tabela 2: distribuição observada e esperada das larvas na arena (qui-quadrado= 2,3)

	Observada	Esperada	N	Residual
	N			
Centro	42	52		-10
Q1	56	52		4
Q2	59	52		7
Q3	77	52		25
Q4	28	52		-24
Total	262			

Na Fig. 1 a seguir, nota-se que embora os quadrantes 1 e 2 tenham quantidades de larvas próximas à média, nos quadrantes 3, 4 e no centro observa-se um desvio significativo em relação à distribuição uniforme.

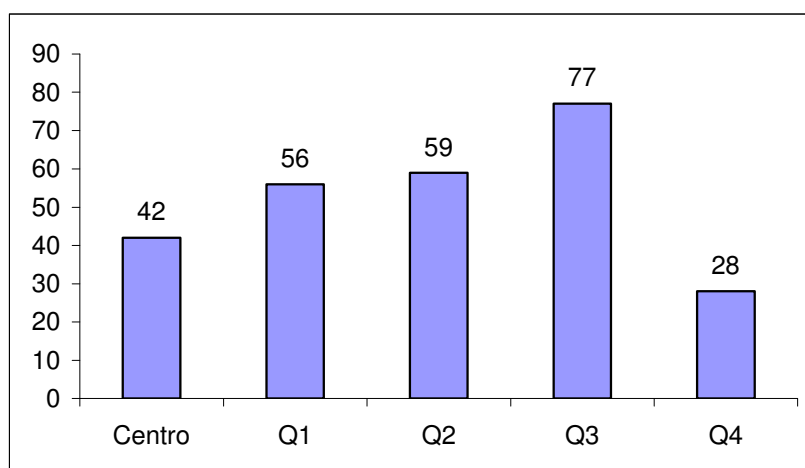


Figura 1: distribuição das pupas das três coletadas por quadrante

É importante notar que o teste estatístico foi aplicado pressupondo que a distribuição esperada das larvas seria uniforme (Gomes *et al.* 2002, 2003, Gomes & Von Zuben 2003). Como não se detectou diferença na distribuição das larvas entre os quadrantes 3 e 4 para as diferentes arenas (qui-quadrado= 26,0534, GL= 4 e $p= 0,0001$), foi feito um teste de associação entre espécie e o quadrante em que ela se enterrou.

A Tabela 3 mostra o percentual de cada espécie que se enterrou em cada quadrante, indicando que 79% das larvas que estão no centro são da espécie *C. albiceps*, o que parece indicar preferência da espécie pelo centro. *Chrysomya megacephala* ficou concentrada no primeiro quadrante. *Cochliomyia macellaria* ficou mais concentrada no primeiro e no terceiro quadrantes. O segundo quadrante ficou com maior proporção do que a média de larvas de espécie indeterminada. No quarto quadrante, todas as espécies foram encontradas.

Tabela 3: Percentual da preferência das larvas nos diferentes setores da arena de acordo com a espécie

Espécie	SETOR					
	Centro	Q1	Q2	Q3	Q4	Total
Indeterminada	7	13	24	6	11	12
<i>C. albiceps</i>	79	11	19	19	21	27
<i>C. megacephala</i>	5	41	32	36	36	31
<i>Co. macellaria</i>	10	36	25	38	32	29
Total	100	100	100	100	100	100

O teste de associação qui-quadrado, mostrou-se altamente significativo (valor de 80,118, $p= 3,9 \times 10^{-12}$ e GL= 12), sugerindo a existência de associação forte entre a espécie e o quadrante, indicando que as espécies não se distribuíram uniformemente, ou ao acaso entre os quadrantes, mas preferencialmente em quadrantes específicos. Embora não se conheça a razão da preferência, é provável que a imigração de *C. albiceps* para os quadrantes específicos seja em função da disponibilidade de presas (Gomes *et al.* 2002, 2003, Gomes & Von Zuben 2003). Outros fatores como competição ou simples interação entre as larvas na mesma arena, ou comportamento específico, podem ter sido responsáveis por estes resultados. Por exemplo, pode ser que a espécie *C. albiceps*, independente de estar ou não competindo com outras espécies, tende a deslocar-se muito menos do que a média e por isso, as pupas se concentraram no centro (Gomes *et al.* 2002, 2003, Gomes & Von Zuben 2003). Além disso, o efeito da predação das larvas de *C. albiceps* pode ter causado uma distribuição das larvas de *C. megacephala* e *Co. macellaria*, com enterramento em distâncias bem maiores que o esperado.

Além disso, pôde-se observar que existe uma diferença significativa do peso ($F= 9,7545$ e $p= 0,000004$), da distância ($F= 37,865$ e $p= 3 \times 10^{-20}$) e profundidade ($F= 4,0304$ e $p= 0,0008$) de acordo com a espécie através do teste de ANOVA a 5%, sugerindo que a existência de mais de uma espécie nesse processo altera as médias dos valores dessas variáveis quando comparado com estudos anteriores (Gomes *et al.*, 2003) e que apenas a correlação entre peso e distância percorrida foi negativa e significativa

para *C. megacephala* (-0,31 e $p=0,0012$), *C. albiceps* (-0,12 e $p=0,0032$) e *C. macellaria* (-0,47 e $p=0,00013$).

O presente estudo demonstrou aspectos gerais sobre o processo de dispersão em uma arena circular, e não confirmou resultados anteriores (Gomes & Von Zuben 2003, Gomes *et al.* 2003), em que a migração de espécies isoladas produzia distribuição uniforme. Isso se deve provavelmente à interação larval interespecífica, resultante do delineamento proposto.

De acordo com a Tab 4, pode-se dizer que maior concentração de pupas de *C. albiceps* foi observada nas profundidades em torno de 6,3cm, (exceto para 13 larvas que chegaram a atingir a distância máxima possível a partir do centro (15 cm)). Para larvas de *C. megacephala*, foi obtida a maior média de distância percorrida a partir do centro (13,1 cm) confirmando resultados anteriores em que as larvas da espécie dispersaram mais que *C. albiceps* (Gomes & Von Zuben 2003, Gomes *et al.* 2003). É interessante notar que as larvas de *C. macellaria* também obtiveram médias de distância (12,1 cm) e profundidades altas (8,0 cm), o que talvez indique que as larvas dessa espécie também sejam influenciadas por larvas de outras espécies durante o processo de dispersão.

Tabela 4: Relação entre as variáveis estudadas e as espécies.

		Número de pupas coletadas	Média	Desvio-padrão
PESO (mg)	Indeterminado	32	34,2	11,6
	<i>C. albiceps</i>	71	28,1	10,8
	<i>C. megacephala</i>	82	38,2	11,9
	<i>Co. macellaria</i>	77	35,0	12,1
	Total	262	34,0	12,2
Distância (cm)	Indeterminado	32	12,4	4,6
	<i>C. albiceps</i>	71	6,1	6,0
	<i>C. megacephala</i>	82	13,1	3,1
	<i>Co. macellaria</i>	77	12,1	3,8
	Total	262	10,8	5,3
Profundidade (cm)	Indeterminado	32	6,3	3,1
	<i>C. albiceps</i>	71	6,3	2,8
	<i>C. megacephala</i>	82	8,0	4,6
	<i>Co. macellaria</i>	77	8,0	4,2
	Total	262	7,3	4,0

Aparentemente, o que mais limitou a movimentação das larvas foi a distância do centro e não a profundidade, embora a utilização de arena com as dimensões aqui estabelecidas tenha possibilitado análise em profundidades maiores que a de estudos anteriores (Gomes *et al.* 2002, Gomes & Von Zuben 2003). A movimentação das larvas na arena provavelmente ocorreu principalmente em função da busca de sítios para pupação, embora não se possa descartar a possibilidade de alguns indivíduos estarem se movimentando à procura de uma fonte adicional de alimento (Gomes *et al.* 2002).

Não houve uniformidade na distribuição das larvas na arena nos três experimentos realizados, e nem relação entre as variáveis estudadas e o sexo das larvas, ou seja, não foi encontrada uma correlação significativa entre o sexo das moscas e as variáveis de análise. Além disso, não houve correlação forte entre as variáveis analisadas para as três espécies (exceto o peso e a distância para as larvas de *C. albiceps*), não confirmando estudos anteriores que quanto maior o peso menor será a distância percorrida pelas larvas na arena, por exemplo (Gomes *et al.* 2003, Gomes & Von Zuben 2003, Gomes *et al.* 2005).

Godoy *et al.* (1995, 1996) observaram tanto para *C. megacephala* (F.) como para *C. putoria* (Wied.) uma oscilação na frequência de pupas em função da distância do ponto de liberação. Segundo Boldrini *et al.* (1997), as oscilações são decorrentes da formação de agregados larvais em determinados locais do substrato de pupação. Acredita-se que as larvas dispersantes são capazes de perceber a densidade de larvas já enterradas, alterando assim a decisão de enterramento inicial para a busca de novos sítios de pupação em um determinado ponto do substrato, sendo que aglomerações de larvas num determinado ponto induziriam aquelas que ainda estavam caminhando, a procurar sítios de pupação mais distantes.

Tais estudos de dispersão podem ter importantes implicações para investigações médico-criminais, já que a presença de larvas e pupas nas circunvizinhanças de cadáveres humanos pode auxiliar na estimativa do intervalo pós-morte (IPM), e a compreensão dos comportamentos das larvas durante esse processo pode auxiliar bastante nas conclusões advindas dos dados coletados em tais situações.

Assim, pode-se concluir com esse trabalho que a existência de várias espécies de larvas em um local, durante esse processo de dispersão, altera o padrão de distribuição das mesmas que irão se enterrar para empupar, além de confirmar, como em estudos

anteriores (Gomes *et al.* 2002, 2003), que as larvas de *C. albiceps* possuem uma tendência em se enterrarem mais próximas ao centro de dispersão.

Por isso, apesar de ser um trabalho experimental, pode-se concluir que há a necessidade de serem realizados estudos em escalas maiores e principalmente em ambientes naturais, para possível confirmação dessas conclusões com relação à existência de mais de duas espécies em um mesmo local para se empupar, como foi realizado nesse trabalho em escala espacial menor.

Agradecimentos. Os autores do presente trabalho agradecem à FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização desses estudos (Processo 03/00540-3) e à Iracema Monteiro da Silva pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Literatura citada

- Boldrini, J. L., R.C. Bassanezi, A.C. Moretti, C.J. Von Zuben, W.A. C. Godoy, F.J. Von Zuben & S.F. Reis. 1997. Non- local interactions and the dynamics of dispersal in immature insects. *J. Theor. Biol.* 185: 523-531,.
- Furlanetto, S.M.P., M.L.C. Campos, C.M. Hársi, G. M. Buralli & G.K. Ishihata. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Rev. Microb.* 15(3): 170-174,.
- Godoy, W.A.C., H.G. Fowler, C.J. Von Zuben, L. Ziti & O.B. Ribeiro. 1995. Larval dispersion in *Chrysomya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *J. Appl. Entomol.* 119: 263-266.
- Godoy, W.A.C., S.F. Reis & C.J. Von Zuben. 1996. Larval dispersal in *Chrysomya megacephala*, *Chrysomya putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): Ecological implications of aggregation behavior. *J. Appl. Entomol.* 120 (4): 423-426.
- Gomes, L., C.J. Von Zuben & J. S. Govone. 2002. Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera:

- Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. 2002. Entomol. Vect. 9(01): 115 - 132.
- Gomes, L., C.J. Von Zuben & M.R. Sanches.2003. Estudo da dispersão larval radial pós- alimentar em *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). Rev. Bras. Ent. 47 (2): 229- 234.
- Gomes, L. & C.J. Von Zuben. 2003. Distribuição larval radial pós- alimentar em *Chrysomya albiceps* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae): profundidade, distância e peso de enterramento para pupação. Entomol. Vect. 10: 211- 222.
- Gomes, L. & C.J. Von Zuben, C.J.2003. Dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Profundidade, Distância e Peso de enterramento para pupariação. Bio. Jour. 18: 67-76.
- Gomes, L., M.R. Sanches & C.J. Von Zuben, C. J.2005. Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). J. Ins. Beh. 18: 281-292.
- Greenberg, B.1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera). Ann. Entom. Soc. America 83: 1210-1214.
- Guimarães, J. H., N. Papavero & A. P. Prado. 1983. As míases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). Rev. Bras. Zool. 1 (4) : 239-416.
- Hanski, I. 1987. Carrion fly community dynamics:patchiness, seasonality and coexistence. Ecol. Entomol. 12: 257-266.
- Legner, E. F. 1977. Temperature, humidity and depth of habitat influencing host destruction and fecundity of muscoid fly parasites. Entomophaga 22: 199-206.
- Levot, G.W., K.R. Brown & E. Shipp.1979. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. Bull. Entom. Res. 69: 469-475.
- Peschke, K.; D. Krapf & D. Fuldner.1987. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. Zool. Jb. Syst. 114: 241-265,.
- Reis, S.F.; G. Stangenhuis, W.A.C. Godoy, C.J. Von Zuben & O.B. Ribeiro.1994. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). Rev. Bras. Ent. 38(1): 33-34.

- Smith, K. G. V. 1986. A Manual of Forensic Entomology. Ithaca : Cornell University Press.
- Ullyett, G. C.1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. Philip. Trans. Royal Soc. London B234: 77-174.
- 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. Appl. Entomol. 120 (3): 379-382.
- Von Zuben, C.J. 1998. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). An. Soc. Ent. Brasil 4: 525-533.
- Wells, J.D. & B. Greenberg.1992. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of an invasion. Bull. Entomol. Res. 82: 133-137.
- ZAR, J. H. 1999. Biostatistical Analysis, Prentice Hall, New Jersey, 666 p..
- Zumpt, F. 1965. Myiasis in man and animals in the Old World. London: Butterworths, 267 p.

CAPÍTULO 8

EFEITO DA TEMPERATURA NA PROFUNDIDADE DE ENTERRAMENTO DE LARVAS DE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS.

Entomologia y Vectores 11: 551-557.2004.

Efeito da temperatura na profundidade de enterramento de larvas de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) sob condições controladas.

EFFECT OF THE TEMPERATURE IN BURYAL DEPTH OF LARVAE OF *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) UNDER CONTROLLED CONDITIONS
Blowflies utilize discrete and ephemeral breeding sites for larval nutrition. After the exhaustion of food, larvae begin dispersal searching for sites to pupariate or for additional food source, process referred as post feeding larval dispersal. Some of the most important aspects of this process were investigated in blowfly of the species *Chrysomya megacephala* in 40 tubes covered with vermiculita at 15 °C, 20 °C, 25 °C and 30 °C. For each pupa the weight, depth and sex were determined. Statistical tests were performed to verify the relation among depth and temperature of burying for pupation. The study of this process of dispersion can be utilized in postmortem interval (PMI) estimation of human corpses in medicocriminal investigations.

Key-words: *Chrysomya megacephala*, Calliphoridae, larval dispersal, temperature, forensic entomology

Resumo- As moscas- varejeiras utilizam-se de substratos discretos e efêmeros para nutrição larval. Após a exaustão do alimento, as larvas começam a dispersar na procura de locais para pupariação ou fonte adicional de alimento, processo denominado de dispersão larval pós-alimentar. Alguns dos mais importantes aspectos desse processo foram investigados em moscas- varejeiras da espécie *Chrysomya megacephala* em 40 tubos cobertos com vermiculita a 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C. Para cada pupa foi determinado o peso, a profundidade e o sexo. Testes estatísticos foram realizados para verificar a relação entre a profundidade e a temperatura de enterramento para

pupariação. O estudo desse processo de dispersão pode ser utilizado na estimativa do intervalo pós- morte (IPM) de cadáveres humanos em investigações medico- criminais.

Palavras-chaves: *Chrysomya megacephala*, Calliphoridae, dispersão larval, temperatura, entomologia forense.

As moscas-varejeiras utilizam-se de substratos discretos e efêmeros para posturas dos ovos 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, e a competição por esses recursos é, geralmente, do tipo exploratório (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 um sítio para pupação ou locais com mais fontes de alimento adicional, no caso daquelas larvas que não obtiveram o peso mínimo para a pupação. Tal processo é denominado dispersão larval pós-alimentar (Greenberg, 1990).

Chrysomya megacephala (Fabricius, 1794), originária da África e Australásia, foi introduzida acidentalmente no Continente Americano, provavelmente através de navios (Guimarães *et al.*, 1978; 1979). Em 1975, esta espécie foi descoberta no Sudeste do Brasil juntamente com *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) e *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Guimarães *et al.*, 1978).

As moscas do gênero *Chrysomya* têm grande importância médico- veterinária por serem veiculadoras de enteropatógenos tais como vírus, bactérias e helmintos (Furlanetto *et al.*, 1984), podendo causar também miíases nos animais e no homem (ZUMPT, 1965; Guimarães *et al.*, 1983). São de fundamental importância em entomologia forense por serem indicadoras de tempo de decomposição de cadáveres humanos (Wells & Greenberg, 1992; Von Zuben *et al.*, 1996). O impacto causado com a introdução de espécies exóticas tem despertado o interesse de pesquisadores para a compreensão de diversos fenômenos biológicos envolvidos neste processo tais como: competição por recursos alimentares e/ou sítios de pupação e dispersão de estágios imaturos (Hengeveld, 1989). No caso deste estudo, pode ser citada a dispersão larval pós-alimentar de *C. megacephala* em busca de um sítio para pupação.

O objetivo desse trabalho foi estudar sob condições experimentais, em simulação de ambiente natural, a dispersão larval pós-alimentar em *C. megacephala* e tentar estabelecer uma relação entre a temperatura e a profundidade de enterramento.

Material e Métodos

Exemplares de *C. megacephala* foram coletados no Instituto de Biociências da UNESP, em Rio Claro, SP. Foi utilizada como isca, matéria orgânica em decomposição (carcaça de peixe) e os exemplares coletados foram identificados até espécie e mantidos em gaiolas teladas em sala com temperatura de 25 ± 1 °C, $60\% \pm 10\%$ de umidade relativa (U. R.) e fotofase de 12 horas, sendo administrados água, açúcar e fígado bovino *ad libitum*.

O desenvolvimento larval deu-se em carne moída até o 3^o ínstar, com posturas do mesmo dia num total de 160 larvas (40 larvas para cada situação em estudo), sendo essas larvas colocadas em 40 tubos de ensaio de 20 cm de comprimento e 1,5 cm de diâmetro, forrados com vermiculita em quatro situações em BOD's reguladas a 60% de umidade relativa e fotofase de 12 horas: a 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C, para que as larvas pudessem se enterrar e empupar. Tal situação foi estabelecida de modo que as larvas só pudessem se movimentar para se enterrar nos tubos.

Após as larvas empuparem, as pupas foram localizadas e retiradas da vermiculita, sendo determinada a profundidade de enterramento com uso de régua. Cada pupa foi pesada em balança analítica e individualizada em frasco de plástico *Eppendorf*, antes que ocorresse a emergência do adulto, após o que o sexo foi determinado.

Foram feitos testes estatísticos para comparações múltiplas entre médias (Teste de Tukey HSD $P < 0,05$) a 95% de confiança para as variáveis estudadas Zar 1999).

Resultados

Os valores de média e desvio-padrão para profundidade de enterramento e peso para as 160 pupas nas quatro situações estão representados na Tabela I.

Tabela I- Efeito da temperatura na profundidade de enterramento e no peso de pupas de *Chrysomya megacephala*, sob condições controladas.

Temperatura (BOD'S)	Profundidade de enterramento	Peso de pupa (mg)
	(cm)	Média ± Desvio Padrão
	Média ± Desvio Padrão	
15 °C	6,23 ± 1,28 a	55,80 ± 2,10 A
20 °C	5,74 ± 1,33 a	53,40 ± 1,40 B
25 °C	3,38 ± 1,26 c	48,90 ± 2,40 C
30 °C	3,27 ± 1,14 d	47,20 ± 3,20 D

As letras iguais que se seguem aos valores acima significam que as médias não diferem entre si através do Teste de Tukey HSD (P< 0,05)

Com relação às médias de profundidade para as quatro situações, utilizando-se o Teste de Tukey, houve rejeição da igualdade entre as quatro situações, tanto para a variável peso quanto para a temperatura, ou seja, os pesos das pupas e profundidades de enterramento diferem significativamente entre os tratamentos.

A Tabela II mostra a posição de enterramento e peso de cada larva de acordo com o sexo. É bom ressaltar que nasceram 15 machos e 25 fêmeas a 15°C, 18 machos e 22 fêmeas a 20 °C, 17 machos e 23 fêmeas a 25 °C e finalmente 12 machos e 28 fêmeas a 30 °C.

Tabela II- Efeito da temperatura na profundidade de enterramento e no peso de pupas de *Chrysomya megacephala* de acordo com o sexo, sob condições controladas.

Temperatura (BOD'S)	MACHOS		FÊMEAS	
	Profundidade de enterramento da pupa Média ± Desvio Padrão	Peso da pupa (mg) Média ± Desvio Padrão	Profundidade de enterramento da pupa Média ± Desvio Padrão	Peso da pupa (mg) Média ± Desvio Padrão
15 °C	6,12 ± 2,13 a	53,20 ± 1,32 A	6,58 ± 2,23 a	56,20 ± 2,10 A
20 °C	4,32 ± 2,97 b	49,20 ± 1,20 B	5,94 ± 1,54 b	56,30 ± 3,40 B
25 °C	2,98 ± 2,21 c	45,40 ± 2,40 C	3,43 ± 1,01 c	54,90 ± 4,20 C
30 °C	3,02 ± 1,28 c	46,40 ± 2,00 C	3,32 ± 1,42 d	49,20 ± 1,80 D

As letras iguais que se seguem aos valores acima significam que as médias não diferem entre si através do Teste de Tukey HSD ($P < 0,05$)

Neste caso, comparando as médias para as quatro situações, pôde-se constatar que a 15° C, a profundidade de enterramento (6,23 cm) e de peso (55,80 mg) foram maiores e diferentes estatisticamente (a 5%) comparando-se com a situação em que as larvas estiveram a 15 °C, 20 °C e a 25 °C. O mesmo vale quando se compara os sexos, ou seja, houve diferença estatística entre as médias de profundidade de enterramento e peso para machos e fêmeas nas quatro situações. O fato parece dar indício que os machos em média se enterram menos profundamente que as fêmeas em ambiente natural quando submetidos a extremos de temperatura. Esses dados concordam com os estudos de Gomes *et al.* (2003), em que os machos se enterraram menos que as fêmeas em situações a 25 °C.

Pode-se dizer que a temperatura influencia o desenvolvimento das larvas (Grassberger & Reiter, 2003), levando a prováveis alterações em seu comportamento de enterramento para pupação. Isso provavelmente ocorre porque, sob temperaturas mais baixas, as larvas têm seu metabolismo desacelerado, o que faz com que elas percam menos energia se movimentando e obtenham maiores pesos (Feng *et al.*, 2002; Grassberger & Reiter, 2003) e tentem escapar das baixas temperaturas se enterrando mais profundamente.

É interessante citar que esses estudos de dispersão podem ter importantes implicações para investigações médico-criminais, porque a presença de larvas e pupas em cadáveres humanos ou circunvizinhanças pode auxiliar na estimativa do intervalo de tempo entre a morte e a descoberta do cadáver, referido como intervalo pós-morte (IPM). Essa estimativa constitui-se em um dos aspectos mais fundamentais em estudos de medicina legal (Smith, 1986), sendo que a mesma pode ser seriamente prejudicada pela não consideração da dispersão pós-alimentar (Von Zuben *et al.*, 1998; Gomes & Von Zuben 2002; Gomes *et al.*, 2003) e dos fatores ambientais envolvidos nessa dispersão, tais como a temperatura (Feng *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2002; Grassberger & Reiter, 2003).

Portanto, estudos utilizando-se de maiores faixas de variação de temperatura e com maior número de larvas, em locais maiores para pupação tais como arenas (Gomes & Von Zuben, 2002; Gomes *et al.*, 2003), além da confecção de um maior número de repetições desses estudos, podem responder algumas dúvidas: Como as espécies de larvas de *Chrysomya* se comportam quando submetidas a diferentes faixas de temperatura para empupar? Como elas se comportam nessas situações quando colocadas juntas? Qual o efeito disso na estimativa do IPM? Essas e muitas outras perguntas podem ser respondidas se mais estudos forem feitos, considerando essas e outras questões ambientais.

Referências Bibliográficas

- Feng, W.C.; Cui, H; Chuan, C.Y.; Xiong, M.J.; Tao, L. J.; Wang, J.F.; Hu, C.; Chen, Y.C.; Min, J. X. & Li, J.T., 2001. Chronology of development within puparium of *Chrysomya megecephala* in different constant temperature and its application in postmortem interval. *Acta Paras. Med. Entomol. Sin.* 8:232-236.
- Feng, W.C.; Cui, H; Chuan, C.Y.; Xiong, M.J.; Tao, L.J.; Wang, J.F.; Hu, C.; Chen, Y.C.; Min, J. X. & Li, J.T., 2002. Effect of temperature over the body-length change of *Chrysomya megacephala* (Fabrius). *Acta Paras. Med. Entomol. Sin.* 9:100-105.

- Furlanetto, S. M. P.; Campos, M. L. C.; Hársi, C. M.; Buralli, G. M. & Ishihata, G. H., 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. Rev. Microbiol. 15:170-174.
- Gomes, L. & Von Zuben, C.J., 2002. Dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Profundidade, Distância e Peso de enterramento para pupariação. Biosci. J. 18: 67-76.
- Gomes, L.; Von Zuben, C.J. & Sanches, M. R., 2003. Estudo da dispersão larval radial pós- alimentar em *Chrysomya Megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae). Rev. Bras. Entomol. 47: 229- 234.
- Grassberger, M & Reiter, C. 2003. Effect of temperature on development of the forensically important holartic blowfly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). Forensic Sci. Int.128:177- 182.
- Greenberg, B., 1990. Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera). Ann. Entomol. Soc. Am.83:1210-1214.
- Guimarães, J.H.; Prado, A.P. & Linhares, A.X., 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). Rev. Bras. Entomol. 22: 53-60.
- GUIMARÃES, J.H., PAPAVERO, N. & PRADO, A.P. 1983. As mííases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). Revta. Bras. Zool. 1 :239-416.
- Hanski, I.1987. Carrion fly community dynamics:patchiness, seasonality and coexistence. Ecol. Entomol. 12:257-266.
- Hengeveld, R.1989. Dynamics of biological invasions. New York: Chapman & Hall, 160 p.
- Peschke, K.; Krapf, D. & Fuldner, D., 1987. Ecological separation, functional relationships, and limiting resources in a carrion insect community. Zool. Jb. Syst. 114: 241-265.
- REIS, S.F.; STANGENHAUS, G., GODOY, W.A.C., VON ZUBEN, C. J. & RIBEIRO, O.B. 1994. Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacepala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae). Rev. Bras. Entomol. 38: 33-34.
- Smith, K.G.V. 1986., A manual of forensic entomology. Ithaca : Cornell University Press. 475 p.

- Ullyett, G.C. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 234: 77-174.
- Von Zuben, C.J. 1996. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). *An. Soc. Entomol. Bras.* 4: 525-533.
- Wells, J.D. & Greenberg, B. 1992. Interaction between *Chrysomya rufifacies* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae): the possible consequences of na invasion. *Bull. Entomol. Res.* 82:133-137.
- Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*, New Jersey : Prentice Hall. 666 p.
- Zumpt, F., 1965. *Myiasis in man and animals in the old world*. London: Butterworths, 267 p.

CAPÍTULO 9**THE INFLUENCE OF TEMPERATURE ON BODY WEIGHT AND DEPTH OF
BURROWING IN LARVAE OF *CHRYSOMYA ALBICEPS* (WIEDEMANN,
1819) AND *LUCILIA CUPRINA* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE) UNDER CONTROLLED CONDITIONS**

Aceito mediante modificações Neotropical Entomology

The influence of temperature on body weight and depth of burrowing in larvae of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) and *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) under controlled conditions

A influência da temperatura no peso corpóreo e na profundidade de enterramento em larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) e *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) em condições controladas.

RESUMO- Moscas-varejeiras utilizam de substratos discretos e efêmeros para nutrição larval. Após a exaustão do suprimento de alimento, as larvas começam a dispersar em buscas de locais para se enterrarem para empupar ou por fontes adicionais de alimento, processo esse conhecido como dispersão larval pós-alimentar. Nesse estudo, alguns dos mais importantes aspectos desse processo foram investigados em 800 larvas de moscas-varejeiras *Chrysomya albiceps* e *Lucilia cuprina* expostas e incubadas em tubos cobertos com vermiculita a 15 °C, 20 °C, 25 °C e 30 °C. Para cada pupa coletada, o peso corpóreo, o sexo e a profundidade de enterramento foram determinados. Testes estatísticos foram utilizados para examinar a relação entre a profundidade de enterramento e o peso corpóreo com a temperatura a que cada enterramento ocorreu. Portanto, a temperatura teve efeito essencialmente oposto na profundidade, i.e., larvas de *L. cuprina* se enterraram mais profundamente a baixas e altas temperaturas enquanto as de *C. albiceps* se enterraram menos em temperaturas extremas, particularmente a baixas temperaturas. Além disso, a temperatura teve efeito significativo no peso corpóreo em ambas as espécies. Em *L. cuprina*, houve uma queda progressiva nesse peso à medida que a temperatura aumentava, por outro lado, em *C. albiceps* o peso aumentou até 25° C e caiu abruptamente em temperaturas superiores. Assim como a profundidade de enterramento, o peso corpóreo foi diferentemente afetado nas duas

espécies, embora em ambos os casos existiu uma temperatura em que o peso foi máximo.

PALAVRAS-CHAVE: entomologia forense, dispersão larval, moscas-varejeiras.

ABSTRACT- Blowflies use discrete, ephemeral breeding sites for larval nutrition. After exhaustion of the food supply, the larvae disperse in search of sites to burrow to pupate or to seek other sources of food in a process known as post-feeding larval dispersal. In this study, some of the most important aspects of this process were investigated in 800 larvae of the blowflies *Chrysomya albiceps* and *Lucilia cuprina* exposed and incubated in tubes covered with vermiculite at 15°C, 20°C, 25°C and 30°C. For each pupa, the body weight, sex and depth of burrowing were determined. Statistical tests were used to examine the relationship of depth of burrowing and body weight to the temperature at which burrowing occurred. Thus, temperature had essentially opposite effects on this depth, i.e., *L. cuprina* larvae burrowed deeper at lower and higher temperatures while *C. albiceps* larvae burrowed less at extreme temperatures, particularly at low temperature. Besides, the temperature had a significant effect on body weight in both species. In *L. cuprina* larvae, there was a progressive decrease in body weight with increasing temperature, whereas for *C. albiceps* larvae, body weight increased up to 25°C and then decreased abruptly at a higher temperature. As with the depth of burrowing, body weight appeared to be differentially affected in the two species, although in both cases there was a temperature at which body weight was maximal.

KEY WORDS: blowflies, forensic entomology, larval dispersal.

Blowflies of the genera *Chrysomya* and *Lucilia* are of considerable medical and sanitary importance, since they carry enteropathogens such as viruses, bacteria and helminths (Lima & Luz, 1991) and may cause myiasis in animals and men (Zumpt, 1965; Guimarães *et al.*, 1983). These flies are also important in forensic entomology since they can be used to determine the decomposition time of human cadavers (Ullyet, 1950; Smith, 1986; Greenberg, 1990; Von Zuben *et al.*, 1996; Gomes *et al.* 2002; 2003, 2004, 2005).

The substrates in which blowflies develop are discrete and ephemeral (Atkinson & Shorrocks, 1981; Ives, 1989, 1991), so that the larval stage is the main period in which blowflies face limited food resources. Since these substrates are normally saturated with insects of one or more species, there is often intense competition for resources (Hanski, 1987). Following this competition, the larvae leave to search for a place to pupate, or for another source of food if they are not heavy enough to pupate. This process is known as post-feeding larval dispersal (Greenberg, 1990; Gomes *et al.* 2002,2005). During this dispersal, the larvae have to deal with various climatic factors, the most important being temperature and photoperiod.

Several laboratory studies have investigated post-feeding larval dispersion in blowflies (Greenberg, 1990; Gomes *et al.*, 2002, 2003; Gomes & Von Zuben, 2003; Gomes & Von Zuben, 2004; Gomes *et al.*, 2005). Although some field studies have also been reported (Greenberg, 1990; Grassberger & Reiter, 2003), most have suffered from the inability to control environmental variables as easily as in the laboratory. This is a critical consideration since one of the most important questions is how climatic conditions can affect post-feeding larval dispersal and the subsequent burrowing of the larvae prior to pupation. To address this question, in this study, we examined the burrowing capacity of *C. albiceps* and *L. cuprina* larvae and determine the relationship between the depth of burrowing and temperature.

Material and Methods

Specimens of *C. albiceps* and *L. cuprina* were collected close to the campus of the Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, Brazil. Adult blowflies were maintained in the laboratory at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ in cages (30 x 30 x 30 cm) covered with nylon and were fed water and sugar *ad libitum*. Adult females were fed fresh beef liver to allow complete development of the gonotrophic cycle (Linhares, 1988). Newly hatched larvae of both species were obtained from adult flies kept at 25°C and 70% relative humidity, and were raised in vials containing 50 g of ground beef.

Four hundred third instar (L_3) larvae of each species were used for these experiments. All of the larvae of a given species were similar in weight, although the mean body weights of the two species differed (25.34 mg and 33.57 mg for *C. albiceps* and *L. cuprina* larvae, respectively, at the start of the experiment). The larvae (100 per

treatment group) were placed individually in test tubes (30 cm x 2 cm) containing vermiculite and incubated at 60% relative humidity on a 12 h photoperiod at 15°C, 20°C, 25°C and 30°C to allow them to burrow and pupate. These conditions, including tube size, were used to ensure that any movement of the larvae was directed towards burrowing. Previous work (Gomes *et al.*, 2005) demonstrated that, regardless of the type of substrate available for pupation, the larvae did not bury themselves deeper than an average of 15 cm.

After they had pupated, the larvae were located and removed from the vermiculite. The depth of the pupation site was measured with a ruler. Each pupa was then placed separately in a plastic flask and weighed on an Ohaus analytical balance before emerging as an adult. Pupal weight was measured in milligrams, with a precision of 0.01 mg, as soon as the pupae were located. After weighing, each pupa was returned to its flask for sexing following emergence of the adult.

The results were expressed as the mean \pm standard deviation (S.D.). The ANOVA test was used to compare the means of variables and linear regression was used to determine the relationships among the variables (Zar, 1999) and a value of $p < 0.05$ indicated significance.

Results and Discussion

Tables I and II show the mean body weight and depth of burrowing for 800 pupae of *C. albiceps* and *L. cuprina*, respectively, at the four temperatures studied. For *C. albiceps*, both parameters varied considerably with temperature, whereas for *L. cuprina*, an increase in temperature caused a greater decrease in body weight than in *C. albiceps*.

Table I: Body weight and depth of burrowing for *C. albiceps* pupae at different temperatures.

Parameter	Temperature(°C)	N	Mean	S.D.
Depth of burrowing (cm)	15	100	2.00	1.02
	20	100	4.10	1.83
	25	100	3.10	1.12
	30	100	2.00	1.40
	Total	400	2.80	1.63
Weight (mg)	15	100	18.50	4.80
	20	100	20.70	4.48
	25	100	21.80	4.96
	30	100	13.10	3.77
	Total	400	18.50	5.60

Table II: Body weight and depth of burrowing for *L. cuprina* pupae at different temperatures.

Parameter	Temperature (°C)	N	Mean	S. D.
Depth of burrowing (cm)	15	100	4,10	3,73
	20	100	2,51	1,56
	25	100	3,58	3,13
	30	100	3,52	3,22
	Total	400	3,43	3,05
Weight (mg)	15	100	20,47	5,45
	20	100	20,06	3,34
	25	100	18,67	2,48
	30	100	17,53	3,04
	Total	400	19,18	3,89

For *C. albiceps* pupae, there appeared to be an optimal temperature for maximum burrowing (20°C), with less burrowing at less favorable lower and higher temperatures. Similarly, weight increased up to 25°C but decreased thereafter. The ANOVA test showed that there were significant differences in the mean values of depth of burrowing ($p= 2 \times 10^{-2}$, $F=21,89$) in relation to temperature.

In contrast, the ANOVA test for *L. cuprina* pupae, the depth of burrowing did not vary significantly with temperature ($p= 0,126$, $F= 1,93$), but there was a significant progressive decrease in body weight with increasing temperature ($p= 0,002$, $F= 5,13$).

Linear regression showed that there was a significant relationship between the increase in temperature and the decrease in body weight for *L. cuprina* pupae (Body weight = $23.78 - 0.20 * \text{Temperature}$ ($F= 14.941$; $p= 0.000162$)).

Therefore, temperature had essentially opposite effects on this parameter, i.e., *L. cuprina* larvae burrowed deeper at lower and higher temperatures while *C. albiceps* larvae burrowed less at extreme temperatures, particularly at low temperature. In the latter species, the deepest burrowing occurred at 20°C. In contrast, in the case of *L. cuprina*, although temperature had no significant effect on the depth of burrowing, there was nevertheless a trend towards shallower burrowing at 20°C. These findings suggested that *C. albiceps* had an optimal burrowing temperature of 20° C, whereas for *L. cuprina* the optimal temperatures for burrowing occurred at the extremes. Hence, the two species showed opposite behaviors, with *C. albiceps* larvae burrowing deeper at the optimal temperature while *L. cuprina* larvae burrowed more at the optimal temperatures. A greater sensitivity of *C. albiceps* larvae to extreme temperatures could have prevented deeper burrowing at low and high temperatures. In addition, some of this variation in depth of burrowing could also be related to a tendency of *L. cuprina* larvae to burrow less deeply than *C. albiceps* larvae under normal conditions.

Temperature had a significant effect on body weight in both species. In *L. cuprina* larvae, there was a progressive decrease in body weight with increasing temperature, whereas for *C. albiceps* larvae, body weight increased up to 25°C and then decreased abruptly at a higher temperature. As with the depth of burrowing, body weight appeared to be differentially affected in the two species, although in both cases there was a temperature at which body weight was maximal. Initially, this appeared to

be related to feeding since temperature can affect the amount of energy spent on accelerated metabolism, and this can in turn affect body weight.

Assuming that *C. albiceps* larvae feed more when conditions are most favorable, one may infer that the most favorable temperature for this species was between 20° and 25°C, for which the greatest body weight and greatest depth of burrowing were recorded. However, in fed larvae such as those used here, an increase in temperature will increase the rate of metabolism and reduce body weight because of the additional energy consumption. In the case of *L. cuprina* larvae, the findings that the greatest body weight was attained below 20°C, and possibly even below 15°C, and that the deepest burrowing occurred at 15°C, indicated that the most favorable temperature for this species was considerably lower than for *C. albiceps*.

The observation that *L. cuprina* larvae lost weight above 15°C but that this loss was less than that for *C. albiceps* larvae above 25°C suggested that the latter species was more sensitive to high temperatures than *L. cuprina*. This difference could explain why *C. albiceps* larvae burrowed less deeply than *L. cuprina* larvae at high temperatures.

Thus, as known, temperature influences the development of calliphorid larvae (Grassberger & Reiter, 2003), and may alter their burrowing behavior prior to pupation. At low temperatures, the metabolic rate may be markedly reduced and this could result in greater body weight and a tendency to burrow deeper in order to escape low temperatures. This kind of study proposed here can help to understand the dispersal process of these and other larvae species of blowflies during searching for new resources and mainly in sites for burrowing for pupation, influenced by environmental conditions .

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are supported by a fellowship from FAPESP (03/00540-3) and CNPq.

References

Atkinson, W.D. & B. Shorrocks.1981.Competition on a divided and ephemeral resource: a simulation model. J. An Ecol. 50: 461-471.

- Gomes, L. & C.J. Von Zuben.2003.Distribuição larval radial pós-alimentar em *Chrysomya albiceps* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae): profundidade, distância e peso de enterramento para pupação. Entomol. Vect. 10: 211-222.
- Gomes, L. & C.J. Von Zuben.2003.Dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): profundidade, distância e peso de enterramento para pupariação. Biosc. J. 18: 67-76.
- Gomes, L. & C.J. Von Zuben.2004.Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação. Iheringia, Série Zoologia 94: 135-138.
- Gomes, L. & C.J. Von Zuben.2004.Efeito da temperatura na profundidade de enterramento de larvas de *Chrysomya megacephala* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae). Entomol. Vect. 11: 551-557.
- Gomes, L. & C.J.Von Zuben.2004.Insetos ajudando a desvendar crimes: entomologia forense. Ciência Hoje 208: 28-31.
- Gomes, L., C.J.Von Zuben & J.S. Govone.2002.Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae): busca por novas fontes de alimento. Entomol. Vect. 9: 115-132.
- Gomes, L., C.J.Von Zuben & M.R. Sanches.2003.Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae). Rev. Bras. Entomol. 47: 229-234.
- Gomes, L., M.R. Sanches & C.J. Von Zuben.2005.Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae). J. Ins. Beh. 18: 281-292.
- Grassberger, M. & C.Reiter.2003.Effect of temperature on development of the forensically important holartic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). For. Sci. International 128: 177-182.
- Greenberg, B.1990.Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera). Ann. Entomol. Soc. America 83: 1210-1214.
- Guimarães, J. H., N.Papavero & A.P. Prado.1983.As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia). Rev. Bras. Zool.1: 239-416.
- Hanski, I.1987.Carrion fly community dynamics: patchiness, seasonality and coexistence. Ecol. Entomol. 12: 257-266.

- Hastings, M. H. 2001. Adaptation to seasonal change: photoperiodism and its mechanism. *J. Biol. Rhythms* 16: 283-430.
- Ives, A.R. 1989. The optimal clutch size of insects when many females oviposit per patch. *Am. Nat.* 133: 671-687.
- Ives, A. R. 1991. Aggregation and coexistence in a carrion fly community. *Ecol. Mon.* 61: 75-94.
- Lima, M.L.P.S. & E. Luz. 1991. Espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) como veiculadoras de enterobactérias patogênicas em Curitiba, Paraná, Brasil. *Acta Biol. Paraná* 20: 61-83.
- Linhares, A.X. 1988. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. *Rev. Bras. Ent.* 32: 383-392.
- Smith, K.G.V. 1986. A manual of forensic entomology. Ithaca: Cornell University Press, 475 p.
- Ulyett, G.C. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Philos. Trans. Royal Soc. London B* 234: 77-174.
- Von Zuben, C.J. 1996. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações de *Chrysomya megacephala* (F.). *An. Soc. Entomol. Brasil* 4: 525-533.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice Hall, 666 p.
- Zumpt, F. 1965. *Myiasis in man and animals in the old world*. London: Butterworths, 267 p.

CAPÍTULO 10
**ESTUDO DA DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR DE MOSCAS-
VAREJEIRAS EM CAMPO E ANÁLISE DA ENTOMOFAUNA VISITANTE DA
CARÇA DE *SUS SCROFA* (PORCO)**

Introdução

Com o objetivo de se comparar com todos os estudos já realizados em laboratório, foi proposto e realizado um estudo de dispersão larval pós-alimentar em campo (condições naturais) para verificar se o comportamento das larvas segue o mesmo padrão do observado em laboratório (Gomes *et al.* 2002, 2003, 2005; Gomes & Von Zuben 2003).

Materiais e métodos

Durante os meses de janeiro a março de 2005, foi feito um estudo no Instituto de Biociências da UNESP- Campus de Rio Claro, com um cadáver de porco de 11,200 kg. Tal animal foi colocado no centro de uma área de 900 m² (30 x 30 m) em um local composto por terra roxa (Figura 1).



Figura 2: local utilizado para estudo com dispersão larval

No centro desse local foi colocado esse porco dentro de uma gaiola gigante, a fim de evitar que vertebrados pudessem interferir no estudo (Figura 13)



Figura 3: porco dentro da gaiola gigante.

Durante os intervalos de 5:00 h a 8:00 h da manhã, 14:00 h a 18:00 h e 19:30 a 21:30 h, foram feitas análises do estado do porco (fases de decomposição), insetos que estavam sobre o mesmo, bem como uma coleta dos mesmos com frascos e/ou puçares.

Os insetos coletados foram colocados em álcool 70% e identificados de acordo com o dia, local de coleta até a espécie, quando possível.

Além disso, foram anotadas a temperatura e umidade do local, do porco e da estação meteorológica mais próxima (Figura 4).



Figura 4: estação meteorológica da UNESP- CENA.

Como o objetivo era analisar a dispersão pós-alimentar larval, durante o estudo foram coletadas as larvas que saíam primeiro para dispersar e que estavam se enterrando sob o porco (Figura 5), com o auxílio de uma pá. A terra coletada foi colocada em sacos plásticos que foram etiquetados com um número relacionado ao dia e à distância da terra coletada, em relação à localização do cadáver do porco.



Figura 5: coleta das larvas que se enterravam sob o porco.

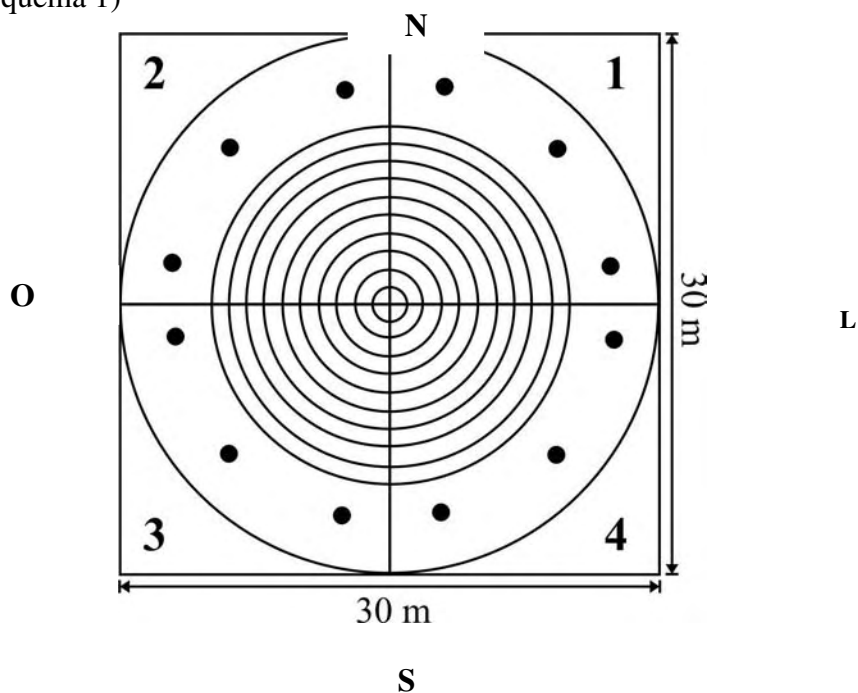
Com o passar do tempo, foram fotografadas e filmadas as fases de decomposição (Figura 6) que o porco sofria.



Figura 6: exemplo de uma fase de decomposição (fase de inchaço do porco após 4 dias).

Após 10 dias, foi feita a coleta das pupas que se enterraram no solo. A metodologia utilizada foi a seguinte:

- o local foi dividido em quatro quadrantes de acordo com a orientação dos pontos cardeais (Esquema 1)



Esquema 1: organização do local onde foi realizado o experimento.

- Foi cavada em cada quadrante, uma distância de um metro a partir do centro e até 30 cm de profundidade. A terra coletada (Figuras 7 e 8) foi colocada nos sacos plásticos, da mesma maneira que a terra coletada com as pupas que estavam sob o porco.



Figura 7: coleta das pupas que estavam no solo por quadrantes.



Figura 8: local cavado de acordo com os quadrantes

- os setores de 1m foram cavados todos por quadrantes até a distância de 5m (Figura 9);



Figura 9: coleta das pupas na terra até 5 m de distância;

- nas distâncias entre 5m e 10m, foram sorteados quadrantes (um par e outro ímpar) em conjunto de dois, sendo os mesmos cavados da mesma maneira, atentando-se ao fato de não se repetir os mesmos pares ao longo de uma reta até os 10m;
- após os 10 m, foram enterradas garrafas PET (pitfall, sempre 4 por quadrante e até 15m) para coleta de alguma larva que dispersou-se além dessa distância (Figura 10);



Figura 10: garrafa pet (pitfall) colocada no solo em distâncias maiores que 10 m e menores do que 15m;

- as coletas de substrato foram então realizadas, como se pode ver nas Figuras 11 e 12;



Figura 11: coleta da terra em sacos plásticos



Figura 12: coleta da terra em sacos plásticos

- feito a coleta da terra, os sacos foram transportados com auxílio de mini-trator e picape (Figura 13 e 14:



Figura 13: picape utilizada para coleta dos sacos



Figura 14: mini-trator utilizado para coleta

- Finalmente, os sacos foram acondicionados em salas climatizadas (Figura 15) com a temperatura próxima do ambiente natural. Após alguns dias, foram coletadas e identificadas todas as moscas que eclodiram das pupas. Tal identificação foi cruzada com os dados de distância e com isso foram feitas as análises de dispersão larval.



Figura 15: sala climatizada contendo os sacos com terra coletada do local.

Resultados

A distribuição de espécies por dia permite ver como é a evolução da presença de cada espécie. Por exemplo, *C. megacephala* está presente desde o primeiro dia (7/01), aumenta rápido a sua quantidade, atingindo o pico de concentração entre o terceiro e quarto dias e depois diminui consideravelmente sua presença.

Vê-se pela Tabela I, a quantidade de espécies coletadas durante o experimento em campo. A identificação dos exemplares foi feita até a menor categoria taxonômica possível.

Tabela I: Lista de espécies coletadas durante o experimento em campo, com o número de exemplares correspondentes a cada espécie, gênero, sub-família, família, ordem e classe.

Identificação	Ordem	Total
<i>Megaselia scallaris</i>	Diptera	473
<i>C. megacephala</i>	Diptera	387
<i>C. albiceps</i>	Díptera	373
<i>Dermestes maculatus</i>	Coleóptera	186
<i>Necrobia rufipes</i>	Díptera	137
<i>Musca domestica</i>	Díptera	73
<i>Sarcophaga ruficornis</i>	Díptera	64
<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	Hymenoptera	62
<i>Scaptotrigona postica</i>	Hymenoptera	59
Staphylinidae	Coleóptera	25
<i>Pachycondyla obscuricornis</i>	Hymenoptera	23
<i>Mesembrinella bellardiana</i>	Díptera	22
<i>L. cuprina</i>	Díptera	20
<i>Ontherus sp</i>	Coleóptera	18
<i>Nezara viridicula</i>	Hemíptera	16
<i>Apis mellifera</i>	Hymenoptera	13
<i>Saprinus azureus</i>	Hemíptera	5
<i>Cochliomyia macellaria</i>	Díptera	3
<i>Hermetia illuscens</i>	Díptera	3
<i>Polybia paulista</i>	Hymenoptera	3
Blattaria	Dyctioptera	2
<i>Dichraplus sp</i>	Hemíptera	2
<i>Eulissus sp</i>	Hemíptera	2
Pirallidae	Coleóptera	2
Elateridae	Coleóptera	2
Acridinae	Coleóptera	1
<i>Doru luteipes</i>	Dermaptera	1
Dermaptera		1
<i>Gryllus sp</i>	Orthoptera	1
<i>Edessa meditabunda</i>	Hemíptera	1
<i>Oxyletrum sp</i>	Coleóptera	1
<i>Phanaeus sp</i>	Coleóptera	1
<i>Pseudonannolene</i>	Diplopoda	1
Chilopoda		1
Total geral		1984

A Tabela II, a seguir, mostra a distribuição de cada espécie por horário, dentro de cada dia. No dia 7/01, as espécies pareceram preferir os horários, das 19h as 22h. No dia seguinte, o total de espécies neste período foi maior, mas algumas espécies parecem não ter preferência por horário, como *Agelaia pallipes pallipes* e *C. albiceps*. *Scaptotrigona postica* só aparece no período das 19-22h.

No terceiro dia, *C. albiceps* se concentra fortemente das 19-22h e *Scaptotrigona postica* se concentra mais das 5h às 8h. No quarto dia, *C. albiceps* se concentra muito mais das 5 às 8h, ou seja, parece não haver um padrão de comportamento de visita à carcaça em estudo.

Tabela II: relação das espécies coletadas no porco ao longo dos dias

dia	Soma de quantidade e Gênero	Hora								Total geral
		14-16h	19-22h	22-23h	2-3h	24-1 h	4-5h	5-8h	(vazio)	
07/01/2005	<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	4	9							13
	<i>C. albiceps</i>	3	10							13
	<i>C. megacephala</i>	2	3							5
	<i>L. cuprina</i>		1							1
	<i>Musca domestica</i>		1							1
	<i>Sarcophaga ruficornis</i>		2							2
7/1/2005 Total		9	26							35
08/01/2005	<i>Acridinae</i>	1								1
	<i>Agelaia pallipes pallipes</i>	13	9					2		24
	<i>Apis mellifera</i>							2		2
	<i>C. albiceps</i>	25	22					4		51
	<i>C. megacephala</i>	20	50							70
	<i>Co. macellaria</i>	1								1
	<i>Dichraplus sp</i>	2								2
	<i>Megaselia scallaris</i>							12		12
	<i>Mesembrinella bellardiana</i>							2		2
	<i>Musca domestica</i>	4								4
	<i>Pachycondyla obscuricornis</i>		2					4		6

	<i>Sarcophaga</i>	5	15		20
	<i>ruficornis</i>				
	<i>Scaptotrigona</i>		20		20
	<i>postica</i>				
8/1/2005 Total		71	118	26	215
09/01/2005	<i>Agelaiia pallipes</i>	12	2		14
	<i>Apis mellifera</i>				2
	<i>Blattaria</i>		1		1
	<i>C. albiceps</i>	37	72		109
	<i>C. megacephala</i>	52	67		119
	<i>Co. macellaria</i>	1			1
	<i>Eulissus</i>	1	1		2
	<i>Gryllus</i>				1
	<i>Edessa</i>	1	2		3
	<i>meditabunda</i>				
	<i>Hermetia</i>	1			1
	<i>illuscens</i>				
	<i>L. cuprina</i>		2		2
	<i>Megaselia</i>	30	20		50
	<i>scallaris</i>				
	<i>Mesembrinella</i>	6			6
	<i>bellardiana</i>				
	<i>Musca domestica</i>	15	11		26
	<i>Onterhus sp</i>		1		1
	<i>Oxyletrum</i>				1
	<i>Polybia paulista</i>	1			1
	<i>Sarcophaga</i>	8		5	13
	<i>ruficornis</i>				
	<i>Scaptotrigona</i>	15	1	22	38
	<i>postica</i>				
9/1/2005 Total		174	180		471
10/01/2005	<i>Agelaiia pallipes</i>	1		4	5
	<i>pallipes</i>				
	<i>Apis mellifera</i>			3	3
	<i>C. albiceps</i>	20	20	71	111
	<i>C. megacephala</i>	22	30	85	137
	<i>Co. macellaria</i>	1			1
	<i>Dermestes</i>	15			15
	<i>maculatus</i>				
	<i>Eulissus sp</i>	1			1
	<i>Megaselia</i>			86	86
	<i>scallaris</i>				
	<i>Mesembrinella</i>			10	10
	<i>Musca domestica</i>		7	10	17
	<i>Necrobia rufipes</i>			1	1
	<i>Onterhus sp</i>	15		1	16

	<i>Pseudonannolene</i>				1		1
	<i>Saprinus</i>				1		1
	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	10	2			2	14
	Staphylinidae					1	1
10/1/2005 Total		85	59			276	420
11/01/2005	<i>C. albiceps</i>	7	15			17	39
	<i>C. megacephala</i>	5	7			13	25
	<i>Dermestes maculatus</i>	15					15
	<i>Edessa meditabunda</i>				1	1	2
	<i>Hermetia illuscens</i>	1					1
	<i>L. cuprina</i>			8			8
	<i>Megaselia scallaris</i>					72	72
	<i>Musca domestica</i>		3				3
	<i>Necrobia rufipes</i>	3			7		10
	<i>Ontherus sp</i>				1		1
	<i>Polybia paulista</i>					1	1
	Pyrallidae				1		1
	Chilopoda				1		1
	<i>Saprinus</i>					4	4
	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	3					3
	Staphylinidae					1	1
	Pyrallidae					1	1
11/1/2005 Total		34	25	8		12	109
12/01/2005	<i>Apis mellifera</i>	1	1			1	3
	<i>C. albiceps</i>	5	7				12
	<i>C. megacephala</i>		3				3
	<i>Dermaptera</i>					1	1
	<i>Dermestes maculatus</i>	8	4		4		16
	<i>Nezara viridicula</i>				1	1	1
	<i>L. cuprina</i>	3					3
	<i>Megaselia scallaris</i>		15			61	76
	<i>Mesembrinella belardiana</i>					3	3
	<i>Musca domestica</i>	9	5				14
	<i>Necrobia rufipes</i>	3	6		5	7	8
	<i>Pachycondyla obscuricornis</i>	2					2
	<i>Phanaeus sp</i>					1	1

	Pirallidae			1			1
	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	5	2				7
	Staphylinidae		3				3
12/1/2005 Total		36	46	11	10	74	177
13/01/2005	<i>Apis mellifera</i>	1				1	2
	<i>C. albiceps</i>	2	1				3
	<i>C. megacephala</i>	1	2				3
	<i>Dermestes maculatus</i>	15	20				35
	<i>Nezara viridicula</i>	1					1
	<i>Hermetia illuscens</i>	1					1
	<i>L. cuprina</i>		5				5
	<i>Megaselia scallaris</i>		20			20	40
	<i>Musca domestica</i>	3					3
	<i>Necrobia rufipes</i>	10	10			4	24
	<i>Polybia paulista</i>	1					1
13/1/2005 Total		35	58			25	118
14/01/2005	Blattaria					1	1
	<i>Dermestes maculatus</i>		30			15	45
	<i>Megaselia scallaris</i>		10			30	40
	<i>Mesembrinella belardiana</i>					1	1
	<i>Musca domestica</i>		3				3
	<i>Necrobia rufipes</i>		15			4	19
	Pirallidae					1	1
14/1/2005 Total			58			52	110
15/01/2005	<i>Agelaius pallipes pallipes</i>					1	1
	<i>C. albiceps</i>	1					1
	<i>Megaselia scallaris</i>					82	82
	<i>Necrobia rufipes</i>					12	12
	<i>Pachycondyla obscuricornis</i>					15	15
15/1/2005 Total		1				110	111
16/01/2005	<i>C. albiceps</i>		1				1
	<i>Dermestes maculatus</i>		5				5
	<i>Ontherus sp</i>					1	1
	<i>Musca domestica</i>					2	2
	<i>Sarcophaga</i>		1			4	5

	<i>ruficornis</i>								
16/1/2005 Total		7				7			14
18/01/2005	<i>Dermaptera</i>	1							1
	<i>Dermestes</i>	10				10			20
	<i>maculatus</i>								
	<i>Necrobia rufipes</i>	12				15			27
	<i>Scaptotrigona</i>					1			1
	<i>postica</i>								
	Staphylinidae	10							10
18/1/2005 Total		33				26			59
19/01/2005	<i>Dermestes</i>	3							3
	<i>maculatus</i>								
	<i>Nezara viridicula</i>	1							1
19/1/2005 Total		4							4
20/01/2005	<i>Apis mellifera</i>	1							1
	<i>Nezara viridicula</i>	4							4
20/1/2005 Total		5							5
21/01/2005	<i>Dermestes</i>					32			32
	<i>maculatus</i>								
	<i>Necrobia</i>					15			15
	<i>Staphylinidae</i>					10			10
21/1/2005 Total						57			57
(vazio)	(vazio)								
(vazio) Total									
Total geral		478	586	8	11	12	10	762	1984

Inicialmente, foi feita uma análise de consistência para as variáveis envolvidas. A Tabela III, a seguir, mostra a distribuição de sexo dentro de cada espécie de mosca-varejeira, desconsiderando a distância e o quadrante escolhido. Notou-se que para as duas primeiras espécies, há uma distribuição uniforme, enquanto que para as demais, há uma concentração um pouco maior no número de indivíduos do sexo Feminino.

Vê-se também nesta tabela a concentração das diversas espécies. *C. albiceps* e *C. megacephala* são as mais abundantes e *L. eximia* e *L. cuprina* são as menos abundantes.

Tabela III: porcentagem de sexo dos adultos que emergiram das pupas coletadas após a dispersão.

espécie coletada	Sexo		Total	F	M
	F	M			
<i>C. albiceps</i>	1063	1064	2127	50%	50%
<i>C. megacephala</i>	1108	1119	2227	50%	50%
<i>Co. macellaria</i>	916	820	1736	53%	47%
<i>L. eximia</i>	362	308	670	54%	46%
<i>L. cuprina</i>	416	328	744	56%	44%
<i>Sarcophaga ruficornis</i>	809	710	1519	53%	47%
Grand Total	4674	4349	9023		

A tabela IV, a seguir, mostra a distribuição das larvas com relação à distância. Na primeira coluna está a distância, na segunda o número de pupas naquela distância e na terceira este número de pupas multiplicando por 4 (em distâncias superiores a 5 m, como se estivessem nos quatro quadrantes), pois até esta distância todas as pupas foram contadas, e a partir daí apenas um quarto delas foi contado. Pode-se verificar que a concentração cai bastante conforme aumenta a distância.

Tabela IV: Número de pupas de moscas coletadas por intervalos das distâncias a partir do centro.

Distância	Nº pupa	padronizado	(%)
sob o porco	1116	1116	11%
de 0 a 1 m	2457	2457	25%
de 1 a 2 m	1990	1990	20%
de 2 a 3 m	1671	1671	17%
de 3 a 4 m	939	939	9%
de 4 a 5 m	531	531	5%
de 5 a 6 m	108	432	4%
de 6 a 7 m	70	280	3%
de 7 a 8 m	43	172	2%
de 8 a 9 m	37	148	1%
de 9 a 10 m	61	244	2%
Total	9023	9980	

Nas três tabelas a seguir, pode-se estudar a distribuição das espécies conforme a distância. Na tabela V, tem-se a contagem original. Na tabela VI, tem-se uma tabela padronizada, onde multiplicou-se o número de pupas por 4 para as distâncias superiores a 5 metros. Na tabela VII, tem-se os percentuais de animais em cada distância. Percebe-se, então, que existem algumas diferenças interessantes entre as espécies.

- 1) *Chrysomya albiceps* se concentra principalmente entre 0 e 1 metro de distância do porco, sendo que boa parte fica sob o porco e 87% não passam dos 3m.
- 2) *Chrysomya megacephala* parece preferir distâncias entre 1 e 2m, onde estão concentrados 30% das pupas dessa espécie coletadas e 81% não passam dos 3 m.
- 3) *Cochliomyia macellaria* quase não fica sob o porco, diferentemente do que acontece com as duas espécies anteriores. Elas se concentram principalmente entre 1 e 3 m. Cerca de 20% dessa espécie atingem mais que 5 metros.
- 4) *Lucilia eximia* tem um comportamento bem diferente das demais, preferindo distâncias maiores. Apenas cerca de 20% delas dispersam menos de 2m. O pico de concentração está entre 5 e 6m, mas a distribuição de uma forma geral não é concentrada, é espalhada.
- 5) *L. cuprina* dispersa menos, se concentrando entre 0 e 4 m e 73% delas estão nesta faixa.
- 6) *Sarcophaga ruficornis* é a espécie que mais se concentrou sob o porco, sendo que 20% de suas pupas foram coletadas nesse ponto e 85% delas não dispersaram mais que 3m.

Tabela V: Número de pupas coletadas por intervalo de distância a partir do centro em relação à espécie.

Distância	<i>C. albiceps</i>	<i>C. megacephala</i>	<i>Co. macellari</i>	<i>L. eximia</i>	<i>L. cuprina</i>	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	Total
sob o porco	350	270	75	23	73	325	1116
de 0 a 1 m	1031	468	287	74	198	399	2457
de 1 a 2 m	372	698	421	77	116	306	1990
de 2 a 3 m	179	457	407	134	194	300	1671
de 3 a 4 m	122	209	288	113	82	125	939
de 4 a 5 m	44	92	160	130	58	47	531
de 5 a 6 m	5	14	25	40	14	10	108
de 6 a 7 m	3	6	29	29	0	3	70
de 7 a 8 m	7	5	14	8	6	3	43
de 8 a 9 m	9	5	10	10	3	0	37
de 9 a 10 m	5	3	20	32	0	1	61
Grand Total	2127	2227	1736	670	744	1519	9023

Tabela VI: Número de pupas coletadas padronizadas por intervalo de distância a partir do centro em relação à espécie.

Tabela padronizada							
Distância	<i>C. albiceps</i>	<i>C. megacephala</i>	<i>Co. macellari</i>	<i>L. eximia</i>	<i>L. cuprina</i>	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	Total
sob o porco	350	270	75	23	73	325	1116
de 0 a 1 m	1031	468	287	74	198	399	2457
de 1 a 2 m	372	698	421	77	116	306	1990
de 2 a 3 m	179	457	407	134	194	300	1671
de 3 a 4 m	122	209	288	113	82	125	939
de 4 a 5 m	44	92	160	130	58	47	531
de 5 a 6 m	20	56	100	160	56	40	432
de 6 a 7 m	12	24	116	116	0	12	280
de 7 a 8 m	28	20	56	32	24	12	172
de 8 a 9 m	36	20	40	40	12	0	148
de 9 a 10 m	20	12	80	128	0	4	244
Grand Total	2214	2326	2030	1027	813	1570	9980

Tabela VII: Número de pupas coletadas (percentuais) por intervalo de distância a partir do centro em relação à espécie.

Percentual							
Distância	<i>C. albiceps</i>	<i>C. megacephala</i>	<i>Co. macellari</i>	<i>L. eximia</i>	<i>L. cuprina</i>	<i>Sarcophaga ruficornis</i>	Total
sob o porco	16%	12%	4%	2%	9%	21%	11%
de 0 a 1 m	47%	20%	14%	7%	24%	25%	25%
de 1 a 2 m	17%	30%	21%	7%	14%	19%	20%
de 2 a 3 m	8%	20%	20%	13%	24%	19%	17%
de 3 a 4 m	6%	9%	14%	11%	10%	8%	9%
de 4 a 5 m	2%	4%	8%	13%	7%	3%	5%
de 5 a 6 m	1%	2%	5%	16%	7%	3%	4%
de 6 a 7 m	1%	1%	6%	11%	0%	1%	3%
de 7 a 8 m	1%	1%	3%	3%	3%	1%	2%
de 8 a 9 m	2%	1%	2%	4%	1%	0%	1%
de 9 a 10 m	1%	1%	4%	12%	0%	0%	2%
Grand Total	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Na Tabela VIII a seguir, tentou-se verificar se as larvas preferem algum quadrante, desconsiderando a espécie, mas considerando a distância. As distâncias sob o porco e maiores que 5 metros não são analisáveis, pois nelas houve apenas 1 quadrante coletado. Quando a larva foi encontrada sob o porco, denominou-se o quadrante de quadrante Zero.

Tabela VIII: Número de pupas coletadas por quadrante de acordo com a distância cavada a partir do centro.

Distribuição original						
Distância	Quadrante				Total	
	Q0	Q1	Q2	Q3		
sob o porco	1116					1116
de 0 a 1 m		644	545	590	678	2457
de 1 a 2 m		600	520	418	452	1990
de 2 a 3 m		412	430	419	410	1671
de 3 a 4 m		253	291	215	180	939
de 4 a 5 m		105	147	124	155	531
de 5 a 6 m				108		108
de 6 a 7 m					70	70
de 7 a 8 m			43			43
de 8 a 9 m			37			37
de 9 a 10 m		61				61
Grand Total	1116	2075	2013	1874	1945	9023

Na tabela IX, pode-se verificar os percentuais de larvas em cada quadrante, para cada distância. Notaram-se algumas concentrações, mas não muito grandes. Por exemplo, para a distância entre 0 e 1 metro, há um pouco mais de larvas nos quadrantes 4 e 1. O mesmo acontece para as demais distâncias, com exceção de 2 a 3m, onde as larvas se espalharam bem uniformemente entre os 4 quadrantes. Quando se atentar à última linha, a da soma total, nota-se que a distribuição entre os quadrantes 1 a 4 é mais ou menos uniforme.

Tabela IX: Número de pupas coletadas (percentuais) por quadrante de acordo com a distância cavada a partir do centro.

Percentual em cada quadrante						
Distância	Quadrante					Total
	Q0	Q1	Q2	Q3	Q4	
sob o porco	100%	0%	0%	0%	0%	100%
de 0 a 1 m	0%	26%	22%	24%	28%	100%
de 1 a 2 m	0%	30%	26%	21%	23%	100%
de 2 a 3 m	0%	25%	26%	25%	25%	100%
de 3 a 4 m	0%	27%	31%	23%	19%	100%
de 4 a 5 m	0%	20%	28%	23%	29%	100%
de 5 a 6 m	0%	0%	0%	100%	0%	100%
de 6 a 7 m	0%	0%	0%	0%	100%	100%
de 7 a 8 m	0%	0%	100%	0%	0%	100%
de 8 a 9 m	0%	0%	100%	0%	0%	100%
de 9 a 10 m	0%	100%	0%	0%	0%	100%
Grand Total	12%	23%	22%	21%	22%	100%

As tabelas X e XI apresentam a distribuição das espécies nos quadrantes (números e porcentagens, respectivamente). Pode-se desconsiderar o quadrante zero pois ele significa sob o porco, que já foi estudado com relação à distância. Na tabela X, nota-se que *Co. macellaria* se distribui mais ou menos de forma uniforme, se concentrando um pouco mais no segundo quadrante, mas não de forma significativa. *Lucilia eximia* se concentra nos quadrantes 2, 3 e 4, e bem menos no primeiro quadrante, *L. cuprina* está concentrada mais no quarto quadrante e *Sarcophaga ruficomis* se distribui mais ou menos uniformemente.

Tabela X: Distribuição das pupas coletadas por espécie de acordo com os quadrantes.

espécie coletada	Quadrante					Total
	Q0	Q1	Q2	Q3	Q4	
<i>C. albiceps</i>	350	531	434	410	402	2127
<i>C. megacephala</i>	270	561	486	474	436	2227
<i>Co. macellaria</i>	75	413	430	394	424	1736
<i>L. eximia</i>	23	89	169	214	175	670
<i>L.cuprina</i>	73	166	160	122	223	744
<i>Sarcophaga ruficornis</i>	325	315	334	260	285	1519
Grand Total	1116	2075	2013	1874	1945	9023

Tabela XI: Distribuição percentual das pupas coletadas por espécie de acordo com os quadrantes.

Percentuais em cada quadrante						
espécie coletada	Quadrante					Total
	Q0	Q1	Q2	Q3	Q4	
<i>C. alb</i>	16%	25%	20%	19%	19%	100%
<i>C. meg</i>	12%	25%	22%	21%	20%	100%
<i>Co. macellaria</i>	4%	24%	25%	23%	24%	100%
<i>L. eximia</i>	3%	13%	25%	32%	26%	100%
<i>L.cuprina</i>	10%	22%	22%	16%	30%	100%
<i>Sarcophaga ruficornis</i>	21%	21%	22%	17%	19%	100%
Grand Total	12%	23%	22%	21%	22%	100%

Na tabela XII, tentou-se verificar se o fato de as pupas pertencerem a determinado sexo influenciam na distância caminhada. Nota-se que os percentuais para ambos os sexos são muito semelhantes. Neste caso, não é necessário fazer a padronização das distâncias, pois os valores para ambos os sexos são muito parecidos e os resultados não mudaram.

Tabela XII: Percentuais de pupas coletadas de acordo com o sexo por distâncias

Distância	Sexo		Total	Percentuais		
	F	M		F	M	Total
sob o porco	578	538	1116	12%	12%	12%
de 0 a 1 m	1281	1176	2457	27%	27%	27%
de 1 a 2 m	1038	952	1990	22%	22%	22%
de 2 a 3 m	857	814	1671	18%	19%	19%
de 3 a 4 m	472	467	939	10%	11%	10%
de 4 a 5 m	284	247	531	6%	6%	6%
de 5 a 6 m	41	67	108	1%	2%	1%
de 6 a 7 m	38	32	70	1%	1%	1%
de 7 a 8 m	25	18	43	1%	0%	0%
de 8 a 9 m	18	19	37	0%	0%	0%
de 9 a 10 m	42	19	61	1%	0%	1%
Grand Total	4674	4349	9023	100%	100%	100%

A tabela XIII a seguir, apresenta uma análise de variância dos dados tendo como variável dependente o número de pupas, e os demais parâmetros como variável independente. Como o experimento é muito desbalanceado, isto é, não tem todos os quadrantes depois dos 5 metros, e a distância zero também não tem quadrante (embaixo do porco):

1) Todos os efeitos principais, com exceção do sexo são significantes. Isto quer dizer que o número de pupas (variável dependente considerada) depende da espécie, da distância e do quadrante. A espécie e a distância têm bastante influência no número de larvas encontradas no local de estudo. Já se viu que algumas espécies aparecem muito mais que outras e que têm muito mais pupas em distâncias curtas que longas. Se for verificado na Tabela XI, que cruza espécie por quadrante, pode-se notar que a última linha mostra muito menos pupas no quadrante zero.

2) A interação entre espécie e distância quer dizer que o número de pupas depende dessas duas variáveis ao mesmo tempo. Não é difícil verificar que isso é verdade na Tabela XII que cruza estas duas informações. As espécies não se concentram igualmente nas diversas distâncias, e a forma com que elas se concentram depende muito da espécie.

3) A interação entre espécie e quadrante se dá pelo mesmo motivo. Da forma como foi feito o experimento, o quadrante acaba refletindo em certo grau a distância. Na distância zero, só se tem o quadrante chamado de zero. Na distância de 9 a 10 metros, que é a maior, só se tem um quadrante, que terá evidentemente mais larvas da espécie que prefere caminhar mais.

4) Finalmente, tem-se o efeito da interação entre distância e quadrante. O efeito deve existir provavelmente porque há uma relação entre a distância e o quadrante, ou seja, que o quadrante escolhido pelas larvas para empupar irá influenciar na distância da mesma e a larva irá caminhar menos de acordo com o quadrante escolhido.

Tabela XIII: Análise de variância dos dados, tendo como variável dependente o número de larvas e os demais parâmetros como variável independente

Testes entre os efeitos das variáveis					
Variável dependente: Número de larvas					
Tipo	Tipo III Soma	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	Significância
Modelo corrigido	315033	114	2763,444	43,6553	0,00
Intercepto	191365	1	191365	3023,07	0,00
ESPÉCIE	30844,5	5	6168,905	97,4528	0,00
DISTÂNCIA	83828,7	9	9314,303	147,142	0,00
QUADRANTE	543,833	3	181,2778	2,86372	0,04
SEXO	189,786	1	189,7863	2,99814	0,08
ESPÉCIE * DISTÂNCIA	87661,4	45	1948,031	30,7739	0,00
ESPÉCIE * QUADRANTE	3360,52	15	224,0344	3,53917	0,00
ESPÉCIE * SEXO	234,516	5	46,90321	0,74095	0,59
DISTÂNCIA * QUADRANTE	2657	12	221,4167	3,49781	0,00
DISTÂNCIA * SEXO	266,282	9	29,58686	0,4674	0,90
QUADRANTE * SEXO	4,5	3	1,5	0,0237	1,00
Erro	12470,4	197	63,30144		
Total	588447	312			
Total corrigido	327503	311			
$R^2 = ,962$ (Ajuste do $R^2 = ,940$)					

Conclusão geral desse estudo

O mais importante do estudo em campo sobre a dispersão larval pós-alimentar e da entomofauna visitante da carcaça de *Sus scrofa* (porco), é que realmente não existe uma uniformidade de distribuição das larvas para se enterrarem em ambiente natural, da mesma forma que na maioria dos estudos em laboratório (GOMES *et al.*, 2002, 2003; GOMES & VON ZUBEN, 2005).

Além disso, da mesma forma que nesses estudos, as larvas de *C. albiceps* têm uma tendência de se enterrarem de forma agregada e mais próximas ao substrato de alimentação, nesse caso o porco. Apesar do estudo ter constatado a existência de outras espécies que participaram do processo de dispersão (espécies que foram trabalhadas em outros estudos, tais como: *Sarcophaga ruficornis* e *L. eximia*), as larvas de *C. albiceps* mantiveram seu comportamento de agregação fazendo com que as larvas de *C. megacephala*, principalmente, se dispersassem e se enterrassem mais longe do centro da mesma forma que resultados de estudos anteriores (GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2004; GOMES & VON ZUBEN, 2005).

CAPÍTULO 11

**MODELAGEM E AUTÔMATO-CELULAR ASSOCIADO AO ESTUDO DE
DISPERSÃO LARVAL PÓS-ALIMENTAR DE MOSCAS-VAREJEIRAS
(DIPTERA, CALLIPHORIDAE) EM LABORATÓRIO E NO CAMPO.**

Introdução

A computação evolutiva surgiu por volta dos anos 50; nessa época, o único objetivo era simular em computador a evolução de espécies através de algoritmos baseados na teoria evolutiva de Darwin. Naquela época, ainda não se imaginava o poder que esta ferramenta apresenta em problemas de otimização.

Um termo muito utilizado na computação evolutiva é o “fitness”. Fitness é uma função que indica o quanto um indivíduo está próximo da solução, ou seja, quanto maior for o *fitness* de um indivíduo maior será o seu grau de evolução (indivíduos com *fitness* maiores estão mais perto da solução e portanto são mais evoluídos).

Assim como na teoria evolutiva de Darwin, a computação evolutiva se baseia em uma população de indivíduos que se reproduzem, sofrem variações aleatórias e são selecionados por algum tipo de critério (*fitness*), de forma que somente os melhores indivíduos vão formar as próximas gerações. Porém, a computação evolutiva apresenta algumas peculiaridades que não podem ser observadas na natureza, como a reprodução entre três ou mais indivíduos ou a sobrevivência de um indivíduo por várias gerações.

Com o passar do tempo, a computação evolutiva, além de ser utilizada para simular a natureza, passou a ser empregada na busca da solução de problemas que geralmente não apresentam soluções factíveis por métodos convencionais.

O principio básico de qualquer algoritmo evolutivo é criar um conjunto de indivíduos que evoluem, ou seja, a cada iteração pelo menos um indivíduo (o melhor indivíduo) chega mais próximo da solução desejada, de forma que depois de um certo

número de iterações, a solução é alcançada com o grau de precisão desejado. Com o passar do tempo, surgiram três tipos básicos de algoritmos para computação evolutiva, todos baseados na teoria evolutiva de Darwin:

- Algoritmos genéticos
- Programação evolutiva
- Estratégia evolutiva

Assim, a Estratégia Evolutiva (ES) visa solucionar problemas de otimização de parâmetros tanto discretos como contínuos, que têm uma solução de alto custo ou que não podem ser resolvidos pelos métodos convencionais como, por exemplo, o Método do Gradiente. Geralmente, emprega-se a estratégia evolutiva para resolver problemas que apresentam certas características como a ausência de diferenciabilidade do critério de otimização ou a multimodalidade, que tornam esses problemas muito complexos para a aplicação de métodos convencionais.

A Estratégia Evolutiva surgiu na Universidade de Berlin e foi fundada por Rechenberg e Schwefel em meados dos anos 60. No início, a ES era baseada somente em dois princípios básicos:

- 1) Promover mutação das características do indivíduo de forma aleatória e simultânea.
- 2) Caso esse novo indivíduo gerado for melhor que o antigo, ele sobrevive; caso contrário, o mesmo é descartado.

Adotando-se a nomenclatura,

μ = número de pais.

λ = número de filhos.

pode-se notar que essas regras utilizam somente um “pai” e um “filho” por geração, isso sendo, na verdade, a característica de uma ES do tipo (1+1)-ES, também conhecida como ES de dois membros (*two membered ES*).

O problema era que a (1+1)-ES, às vezes não conseguia explorar todas as soluções e ficava travada em certos pontos, pois todos os pontos vizinhos eram piores (com *fitness* menor).

Para solucionar esse problema, Rechenberg propôs em 1971 a estratégia evolutiva ($\mu+1$)-ES (*steady-state*). Essa ES apresenta μ “pais” e somente 1 “filho” por

geração, de forma que sempre são selecionados 2 pais aleatoriamente para gerar um filho. O filho sofre mutação e compete com os pais. O pior dos três indivíduos (2 pais e 1 filho) é descartado.

Mais tarde, Schwefel introduziu mais dois tipos de algoritmos de estratégia evolutiva:

O método $(\mu+\lambda)$ -ES, no qual a cada geração são gerados $\lambda > 1$ filhos, esses novos filhos competem com os μ pais e somente os melhores que estiverem dentro do número $\mu+\lambda$ sobrevivem. Isso ocorre para manter a população constante.

O outro método introduzido por Schwefel é o (μ,λ) -ES. Nesse método, também são gerados $\lambda > 1$ filhos, porém a seleção dos melhores indivíduos é feita somente entre os filhos, de forma que os pais são sempre descartados, não importando o seu grau de evolução. Neste caso, entre os λ filhos são selecionados os $\mu+\lambda$ melhores indivíduos para manter o tamanho da população constante. Portanto, o número de filhos é sempre maior que o número de pais $\lambda > \mu$.

Vale ressaltar que um dos operadores genéticos mais importantes na estratégia evolutiva é o operador de mutação. Muitos têm uma noção errônea de que mutação na ES é simplesmente um fenômeno aleatório que modifica parte da informação que compõe os indivíduos. Na verdade, a mutação empregada em ES é direcionada, ou seja, a mutação ocorre na direção da evolução, ou seja, um indivíduo que sofre mutação tende a melhorar o seu fitness.

Descrição de algoritmos básicos de estratégias evolutivas

Como já foi visto, os algoritmos de estratégia evolutiva (*evolution strategies* - ES) têm como meta otimizar funções objetivos, através da realização de uma busca estocástica. Os algoritmos básicos de ES, assim como em outras técnicas de computação evolutiva, são de simples entendimento. Neste item, será apresentada uma descrição das ES, destacando a notação utilizada e a estrutura dos algoritmos básicos.

Apesar de ser comum a associação de ES a problemas cujas variáveis (elementos da população) são reais, a primeira aplicação de uma ES se deu em espaço discreto. Essa associação, errônea de certa maneira, adveio do sucesso obtido por Rechenberg na análise de ES em espaços de buscas Euclidianos (BEYER AND SCHWEFEL, 2002).

Procura-se atentar, então, para uma descrição matemática do problema. A função objetivo a ser maximizada por uma ES é dada por:

$F(y)$ e $E Y$

Conforme destacado, além do conjunto real n -dimensional R^N , espaços de buscas inteiros Z^N e binários B^N são possibilidades para o conjunto Y . As ES atuam em uma população P constituída de n indivíduos (BEYER AND SCHWEFEL, 2002). Em essência, o k -ésimo indivíduo, denotado por α_k , contém, além de um conjunto de parâmetros representado por y_k , a “qualidade” desta solução dada por $F(y_k)$, conhecida como *fitness*, e também um conjunto de parâmetros s_k denominados parâmetros estratégicos que, como será visto mais adiante, são responsáveis pelo controle dos parâmetros utilizados no operador de mutação do algoritmo (SOLOMON, 1998). Frequentemente na literatura, o conjunto de parâmetros y_k é denominado de parâmetros objetivos, dado que, geralmente, a solução do problema de otimização é alcançada a partir da determinação desses parâmetros. Logo, um indivíduo da população é constituído de parâmetros objetivos, parâmetros estratégicos e *fitness*.

A heurística embutida na ES consiste, assim como em outras técnicas de computação evolutiva, na perturbação de uma população inicial gerando um conjunto de “filhos” que são comparados entre si e, em certos casos, com os “pais”. Feita esta comparação, os indivíduos que apresentarem melhor *fitness* são selecionados para compor a nova população que será submetida ao mesmo processo, até que um critério de parada seja atingido. Embora esta descrição apresentada seja um tanto quanto superficial, ela nos permite identificar dois aspectos importantes das ES. O primeiro deles é que as ES são algoritmos caracterizados por população, operadores de perturbação e operadores de seleção. Assim sendo, um estudo mais profundo das ES deve ser feito através de uma análise de cada um desses itens. Uma segunda nota é uma analogia entre estratégias evolutivas e métodos baseados em gradientes, visto que este método também realiza uma perturbação na solução atual. Esta tênue semelhança, em princípio, inspirou SOLOMON (1998) a realizar um comparativo entre estes dois métodos.

A seguir é apresentado o pseudo-código de um algoritmo básico de estratégia evolutiva:

```

Procedure ( $\mu / \rho + \text{ou} , \lambda$ ) – ES:
Begin
 $g = 0$ ; // Geração
initialize ( $P_p^{(0)} = \{ (y_m^{(0)}, s_m^{(0)}, F(y_m^{(0)})) , m = 1, \dots, \mu \}$ );
Repeat until termination condition
// determinação de uma nova geração
For  $k = 1$  to  $\lambda$ 
 $s_k = s\_recombination (P_p^{(g)}, \rho)$ ;
 $y_k = y\_recombination (\rho)$ ;
 $\hat{s}_k = s\_mutation (s_k)$ ;
 $\hat{y}_k = y\_mutation (y_k, \hat{s}_k)$ ;
 $F'_k = F(\hat{y}_k)$ ;
End
 $P_o^{(g)} = \{ (\hat{y}_k, \hat{s}_k, F'_k) , k = 1, \dots, \lambda \}$ ;
Case selection_type Of
( $\mu , \lambda$ ) :  $P_p^{(g+1)} = \text{selection} (P_o^{(g)}, \mu)$ ;
( $\mu + \lambda$ ) :  $P_p^{(g+1)} = \text{selection} (P_o^{(g)}, P_p^{(g)}, \mu)$ ;
End
 $g = g+1$ ;
End

```

Conjuntamente com a análise por partes da notação ($\mu / \rho +$ ou $, \lambda$), que indica como os filhos são gerados em uma ES, serão expostos os operadores de perturbação, seleção e o funcionamento do algoritmo.

O parâmetro μ corresponde à quantidade de indivíduos existentes na população de pais, denotada por $P_p^{(g)}$, em qualquer geração. A partir desta população de pais, o algoritmo gera uma população de filhos, denotada por $P_o^{(g)}$, que possui λ indivíduos. Como já mencionado, feita a geração de uma população de filhos, ocorre uma etapa de seleção para determinar os indivíduos que constituirão a população de pais da próxima geração. Geralmente esta escolha é feita a partir do *fitness* associado ao indivíduo. Quando temos o símbolo “ + ” na notação de ES, a seleção dos indivíduos para próxima geração é feita a partir da população de filhos e pais na geração atual. Portanto, um indivíduo com bom *fitness* pode perdurar por muitas gerações, conferindo memória ao processo de busca. A literatura sugere esta estratégia para espaços de busca discretos e finitos (BEYER & SCHWEFEL, 2002). Por outro lado, o símbolo “ , ” na notação de ES caracteriza uma seleção apenas entre a população de filhos, ou seja, os pais são sempre esquecidos, mesmo se eles forem melhores que os filhos. Esta maneira de seleção é recomendada para espaços de buscas não limitados (BEYER & SCHWEFEL, 2002) e também para problemas com superfícies de *fitness* variantes no tempo.

A geração de uma população de filhos é feita a partir de dois operadores de perturbação: recombinação e mutação. O processo de recombinação gera filhos a através da combinação de informações de um certo número de pais, dado pelo parâmetro ρ na notação ES. A mutação atua nesta população de filhos, gerada pela recombinação, inserindo uma perturbação. Dentre esses dois operadores, a mutação exerce papel fundamental nas ES.

Neste exemplo, devido ao desvio padrão da perturbação z_k ser igual em todas as direções, dado um indivíduo da população de pais, os possíveis filhos formarão linhas equiprováveis circulares (no caso bidimensional), centradas no indivíduo pai. De fato, em espaços de buscas com curvas de nível do *fitness* circulares (modelos esféricos), esta estratégia de mutação funciona bem, porém, quando estas curvas de nível apresentam distorção, a geometria circular da evolução não consegue se ajustar a essas curvas, impossibilitando a obtenção do mínimo global. Assim sendo, torna-se imperativa a

utilização de estratégias de mutação capazes de ajustar a evolução dos parâmetros à geometria do espaço de busca do problema. Donde concluímos que a estratégia de mutação a ser utilizada é dependente do problema. No item a seguir, será abordada com mais detalhes esta questão.

Uma outra questão relevante na estratégia evolutiva é a representação das variáveis de decisão do problema pelos indivíduos da população. Em alguns casos, o desenvolvimento desta representação constitui o problema mais premente a ser resolvido em uma abordagem evolutiva. Não adentraremos nesta questão, pois, nossa ferramenta computacional apresenta uma representação direta, ou seja, os indivíduos apresentam elementos que são os próprios parâmetros do problema.

Semelhanças e diferenças entre estratégias evolutivas e métodos baseados em gradiente

Um dos paradigmas mais consagrados em otimização é o método baseado em gradiente, também conhecido como *steepest descent* (*ascendent*), desenvolvido por Newton. Esse método opera da seguinte maneira:

$$\vec{x}_{t+1} = \vec{x}_t - \eta \nabla f(\vec{x}_t)$$

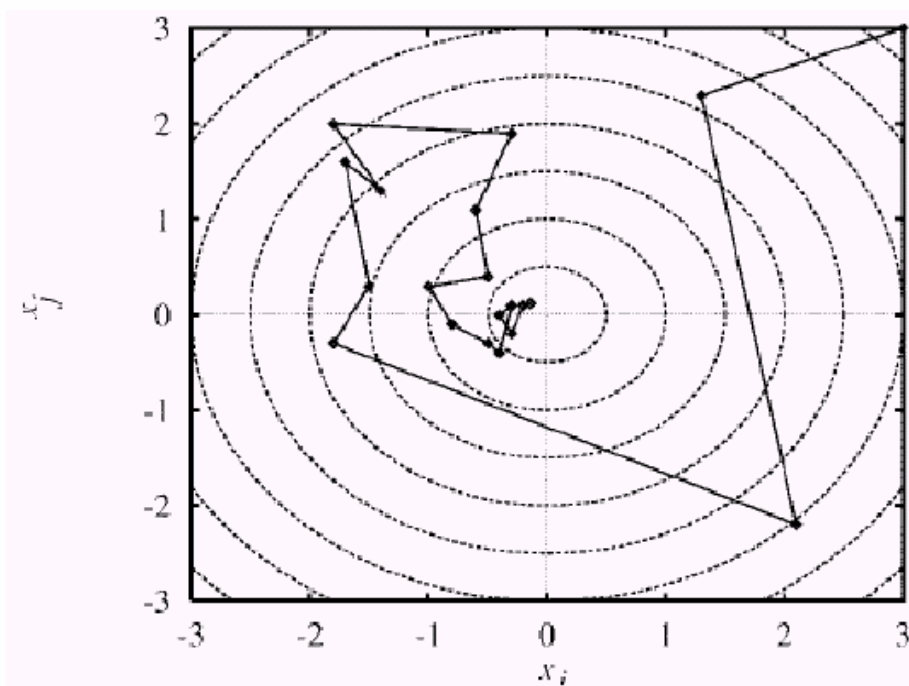
Esse método cujo vetor \vec{x}_{t+1} representa os parâmetros do problema de otimização, $f(.)$ é a função objetivo e η é o passo do algoritmo. A formulação apresentada serve para problemas de minimização, pois, a atualização dos parâmetros é feita na direção contrária do gradiente. Contudo, em um problema de maximização, se considerarmos a função objetivo $-f(.)$ esta representação pode ser utilizada sem problemas.

Pode-se dizer que atualização dos parâmetros é feita adicionando uma “perturbação” ao parâmetro antigo. Ora, de certa maneira, o modo de operação das duas técnicas em questão é o mesmo. Esta analogia motivou Solomon a investigar as similaridades e diferenças entre as duas técnicas. Analisa-se a seguir, as contribuições de seu trabalho (SOLOMON, 1998).

Uma diferença explícita entre o método de gradiente e as estratégias evolutivas é o tipo de busca realizado. Enquanto que o método de gradiente é uma estratégia de

busca pontual, as estratégias evolutivas realizam uma busca populacional. Esse contraste culmina em diferenças de desempenho nos dois algoritmos, dentre as quais destaca-se o grau à susceptibilidade a mínimos locais. Em contraste com os métodos baseados em gradiente que podem convergir para mínimos locais, a busca populacional feita nas ES confere a estes métodos a capacidade de escapar, no processo de busca, desses mínimos indesejados.

Na literatura encontra-se discórdia quanto à classificação das ES como métodos seguidores de caminho no espaço de busca. SOLOMON (1998) confronta essas duas abordagens, concluindo que ambas são coerentes dependendo do ponto de vista. Como exemplo, é apresentado um problema de otimização com n parâmetros. Através de um mapeamento do espaço n -dimensional do espaço de busca para uma de duas dimensões (ver Esquema 1 a seguir) são obtidos dois parâmetros y_1 e y_2 . Nota-se claramente que a evolução destes parâmetros segue, com alguns distúrbios, o caminho do gradiente.



Esquema 1: buscas de dois parâmetros para o problema de otimização.

Os experimentos realizados por Solomon indicaram que estratégias com parâmetros de dimensão pequena e grande número de filhos, apresentam evolução em conformidade, na maior parte do tempo, com o caminho do gradiente. A divergência entre a evolução e o caminho do gradiente ocorre quando o vetor de mutação apresenta norma maior do que a distância atual do ponto ótimo. Visto que esta situação é freqüente no caso de ES com adaptação do passo de mutação, a evolução neste método geralmente diverge do caminho do gradiente.

Paradigmas de mutação e adaptação dos parâmetros estratégicos

O foco dos pesquisadores de estratégias evolutivas vem sendo os parâmetros estratégicos que atuam no controle das mutações dos parâmetros objetivos. De fato, a importância conferida aos parâmetros estratégicos advém justamente do papel fundamental dos operadores de mutação nas estratégias evolutivas.

Através de uma interpretação geométrica, é possível analisar as diferenças entre as três abordagens para o operador de mutação. Como já mencionado, no primeiro caso,

a presença de apenas um parâmetro faz com que, dado um ponto, os lugares geométricos equiprováveis dos filhos sejam hiper-esferas com dimensão N .

No caso de mutação com parâmetros estratégicos locais (equação na seqüência) as regiões de igual probabilidade serão hiper-elipses de dimensão N com raios paralelos, respectivamente, aos diferentes eixos coordenados do espaço de busca.

Na última abordagem apresentada, a presença da matriz M proporciona a rotação das hiper-elipses em qualquer dimensão do espaço N -dimensional. Conforme a sofisticação da geração dos vetores de mutação aumenta, ocorre um aumento no número de parâmetros estratégicos que acarreta uma maior complexidade computacional. Portanto, é recomendado que a escolha do tipo de mutação utilizado em uma ES seja feita em conformidade com o problema. Isso evita, por exemplo, a utilização de uma ES com mutação correlacionada extremamente custosa computacionalmente, em problemas que poderiam ser tranqüilamente resolvidos por métodos mais simples. Feita uma breve introdução dos tipos de mutação utilizados em ES, é necessário analisar como são determinados os parâmetros estratégicos.

As primeiras estratégias evolutivas utilizadas tinham estrutura $(1 + 1)$. Neste contexto, na tentativa de utilizar parâmetro σ constante notou-se que, em alguns problemas, após um período de evolução promissor, a ES perdia diversidade culminando em uma performance final ruim. Uma explicação detalhada da limitação de utilizar este parâmetro estratégico constante pode ser vista em SOLOMON (1998).

A regra-1/5 (um quinto)

Rechenberg, motivado pela ineficiência das ES com parâmetro estratégico constante, propôs a primeira técnica adaptativa de controle deste parâmetro denominada regra-1/5.

Em uma ES $(1+1)$ dois parâmetros, descritos a seguir, são de extrema importância para a evolução: a probabilidade P_s de um geração de filhos substituir a geração de pais e taxa de progresso da evolução.

Uma outra distinção entre a evolução dos parâmetros objetivos estratégicos é que nesses últimos a mutação não pode ser aditiva, visto que estes parâmetros representam desvios padrões e não podem assumir valores negativos.

Assim sendo, uma possibilidade de mutação muito utilizada para este parâmetro é expressa:

$$\sigma_i = \tilde{\sigma}_i \exp(\tau \cdot N_i(0,1))$$

É desejado em uma estratégia evolutiva que a taxa de progresso seja maximizada. Uma análise cuidadosa permitiu Rechenberg estabelecer a probabilidade P_s que maximiza a taxa de progresso da evolução, no caso, $P_s \approx 0.184$ dando origem a regra-1/5. Esta regra é implementada a partir de uma medida amostral da probabilidade de substituição do vetor pai pelo vetor filho, ou seja, da probabilidade de um primogênito ser mais apto ao espaço de busca do que seu antecessor era. Caso esteja maior ou menor que 1/5, é necessário aumentar ou diminuir, respectivamente, σ .

Em BEYER & SCHWEFEL (2002), são mencionadas as limitações da regra 1/5. Dentre o conjunto citado, a limitação mais severa é a restrita possibilidade de aplicação em algoritmos (1 + 1)-ES.

Inserção dos parâmetros estratégicos na evolução

As limitações da regra-1/5 motivaram uma nova estratégia de adaptação dos parâmetros estratégicos. Os pesquisadores vislumbraram a seguinte possibilidade: Por que não inserir (explicitamente) os parâmetros estratégicos no processo de evolução? De fato a regra-1/5 evoluía, de certa forma, esses parâmetros, porém, esta “evolução” não sofre os efeitos de mutação característicos das ES.

No pseudo-código, a atualização dos parâmetros estratégicos é feita via evolução. Neste caso, a geração dos vetores filhos de parâmetros estratégicos deve ser feita antes da geração dos vetores filhos de parâmetros objetivos, pois, os primeiros são utilizados na construção do segundo.

Uma outra distinção entre a evolução dos parâmetros objetivos e estratégicos é que nesses últimos a mutação não pode ser aditiva, visto que estes parâmetros representam desvios padrões e não podem assumir valores negativos.

Abordagem desrandomizada de adaptação dos parâmetros estratégicos

Como já foi mencionado, o direcionamento da busca proporcionado pela mutação com parâmetros locais e locais correlacionados acarreta em uma velocidade de convergência maior. Para a obtenção de um direcionamento ainda maior da busca, dois pesquisadores alemães, HANSEN & OSTERMEIER (1994), desenvolveram uma técnica baseada na desrandomização dos parâmetros estratégicos e estenderam-na para vários casos. Analisemos as idéias básicas desta técnica.

Teoricamente, a probabilidade de seleção de um conjunto de parâmetros estratégicos é a probabilidade deste conjunto gerar parâmetros objetivos que serão selecionados na evolução. Portanto, um bom sistema de ajuste dos parâmetros estratégicos é aquele que maximiza a probabilidade de geração de passos de mutação que proporcionam bons parâmetros objetivos. Imaginemos a seguinte situação: dois conjuntos filhos de parâmetros estratégicos A e B são gerados e sabemos a priori que o conjunto A é uma melhor escolha na atual geração. Mesmo assim, é possível vislumbrar uma situação em que a evolução seleciona o conjunto B. Desta forma, a probabilidade de seleção do melhor conjunto de parâmetros estratégicos é diminuída.

Um outro ponto (HANSEN & OSTERMEIER, 1994) é a impossibilidade de definir o desvio padrão τ dos parâmetros estratégicos que otimize, simultaneamente, a taxa de mudança entre os parâmetros estratégicos σ de duas gerações consecutivas e a distinção dos parâmetros estratégicos no processo de seleção. Esta distinção é necessária, pois, se não ocorrer, a seleção é prejudicada, enquanto que, se a taxa de mudança for muito alta, podem ocorrer flutuações estocásticas indesejadas. As estratégias de desrandomização também tornam menos conectadas a taxa de variação e o parâmetro τ na tentativa de resolver o impasse explicado.

Resumidamente, o mérito principal deste mecanismo de desrandomização, é aumentar a robustez das ES. No entanto, através desse procedimento não é possível eliminar completamente as distorções existentes no processo de seleção dos parâmetros. Outro trabalho de HANSEN & OSTERMEIER (2001) introduziu um nível mais profundo de desrandomização, conhecido como segundo nível de desrandomização, capaz de superar plenamente este obstáculo.

Os métodos de desrandomização citados anteriormente foram desenvolvidos para ES com parâmetro estratégico global. HANSEN & OSTERMEIER (2001) desenvolveram uma técnica, fundamentada nas idéias de desrandomização, de ajuste dos parâmetros estratégicos no caso mais genérico, ou seja, com a presença da matriz covariância (HANSEN & OSTERMEIER, 1994). Esta técnica é conhecida como CMA (*Covariance Matriz Adaptation*). Em resumo, a desrandomização nesta técnica é expressa no sentido de que se realiza uma busca nos parâmetros estratégicos bem-sucedidos das gerações passadas para formar a nova distribuição das mutações.

Meta-ES aplicadas na adaptação dos parâmetros estratégicos

As Meta-ES são estratégias cujos parâmetros que compõem os pais e, conseqüentemente, os filhos também são estratégias evolutivas. Ou seja, existe uma estratégia evolutiva controlando uma outra estratégia evolutiva. As Meta-ES são representadas da seguinte maneira:

$$[(\mu' / \rho' + ou, \lambda')^\gamma (\mu / \rho + ou, \lambda)] - ES$$

No caso, existem μ' pais, sendo que cada um é uma população $(\mu / \rho + ou, \lambda)$; λ' populações $(\mu / \rho + ou, \lambda)$ filhas e o parâmetro γ é o número de gerações que as populações filhas evoluem sem nenhuma comunicação, ou seja, o tempo que cada um dos filhos tem para evoluir livremente. Uma possível aplicação das Meta-ES é a adaptação dos parâmetros estratégicos Solomon 1998.

Descrição da Implementação (Autômatos Celulares – Larvas)

Objetivo da Implementação:

Simular computacionalmente o comportamento de dispersão larval via autômatos celulares.

Justificativa das abordagens utilizadas:

Autômatos Celulares: Por permitir a modelagem espaço temporal de fenômenos ou problemas que lidam com estas variáveis.

Estratégias Evolutivas: Por ser uma técnica meta-heurística de busca e otimização de parâmetros, que tem mostrado bom desempenho perante problemas não tratáveis via técnicas de otimização chamadas de “fortes” e que se baseiam em informação de primeira ou segunda ordem.

Descrição geral da simulação

A funcionalidade do autômato celular depende basicamente dos coeficientes de dispersão relacionados ao tipo de vizinhança do modelo (Von Newman, Moore, etc); para o presente caso foi adotado o modelo de Von Newman (direita, embaixo, esquerda e acima). Estes coeficientes dispersarão a concentração do material existente em cada célula.

Uma iteração neste contexto significa a obtenção de uma nova lattice, com novos valores de concentração nas suas células. Para cumprir uma iteração precisa se percorrer cada célula e aplicar a função que determina a dinâmica do modelo; esta função é a seguinte:

$$ac(i, j) = (1 - a_1 - a_2 - a_3 - a_4) * ac(i, j) + b_1 * ac(i, j + 1) + b_2 * ac(i + 1, j) + b_3 * ac(i, j - 1) + b_4 * ac(i - 1, j)$$

O critério de parada convencional para este processo de obtenção de novas lattices é o valor da diferença entre os valores por célula da lattice atual comparada com a lattice da iteração anterior. Se este valor atinge um valor limiar, então é sinal de ter alcançado a convergência desejada.

Para o caso de modelagem da dispersão larval, consideramos um parâmetro adicional que representa a taxa de enterramento em cada célula da lattice, e indicará o número de indivíduos que não pertenceram mais à concentração de indivíduos na superfície e serão descontados, para pertencer agora à concentração de indivíduos enterrados nessa célula, porém o número de indivíduos enterrados nunca diminuirá.

O novo critério de parada para o modelo de larvas será:

- Parar o processo quando o número de indivíduos enterrados seja igual ao número de indivíduos iniciais na superfície da *lattice*.

A técnica de Estratégias Evolutivas (EEs) foi utilizada para encontrar os parâmetros da *lattice*, foram cinco parâmetros por cada célula do modelo, quatro que correspondem aos coeficientes de vizinhança ou de dispersão e o quinto parâmetro correspondente à taxa de enterramento dos indivíduos em cada célula. Uma das características de EEs é que sua codificação é com valores reais.

Optou-se pela sub-estratégia $(\mu+\lambda, \rho)$, o que quer dizer o seguinte: na próxima geração, λ filhos serão gerados a partir de μ pais. A outra variável ρ indica o número de pais que atuarão na criação de um novo filho (BEM-JACOB 2003).

Este problema de busca de parâmetros é modelado como problema de otimização com restrições, assim como a função a maximizar. As restrições serão detalhadas a seguir.

Descrição Detalhada da simulação:

1. Codificação do cromossomo

Cada indivíduo da população (cromossomo) está composto por valores reais (também chamados de atributos) que são os valores dos parâmetros a evoluir (cinco por célula).

Assim, o cromossomo para a *lattice* de 11x11 será de tamanho: $11 \times 11 \times 5 = 605$ valores reais.

Além desse cromossomo, EEs trabalham também com outro vetor de variâncias da mesma dimensão que o vetor de atributos, as variâncias também sofrerão recombinação e mutação e servem para indicar o passo em que os atributos irão mudar.

Nota: 605 representa também a dimensão do problema, quer dizer, será um processo de busca no espaço \mathcal{R}^{605} .

2. Operadores

a. Recombinação

Recombinação para gerar filhos. Em EEs, é possível gerar um filho a partir de mais do que dois pais, este número sendo indicado pela variável ρ e os ditos pais são escolhidos de forma aleatória dentre os pais.

Tradicionalmente, existem dois mecanismos para gerar os λ filhos; cada filho é gerado a partir dos ρ pais aleatórios. Assim, um deles é escolher aleatoriamente dentre os ρ um pai que será considerado como um filho para geração seguinte. O segundo mecanismo é obter a média aritmética dos valores dos ρ pais, sendo este resultado o filho para a geração seguinte.

Mas para o presente caso, modificou-se estes clássicos mecanismos a fim de obter maior diversidade, dado que a dimensão do problema é maior, então, cada uma das 605 posições do filho (alelos) serão herdadas de forma aleatória das respectivas posições dos ρ pais. Espera-se ter então um filho com alguma característica de cada um dos ρ pais. A recombinação é aplicada também ao vetor das variâncias.

b. Mutação

Foi utilizada a Mutação Local.

c. Seleção

A seleção consiste em ordenar a população com base em uma avaliação de todos os indivíduos da população, pais e filhos, logo os indivíduos com maior aptidão serão promovidos a ser pais da seguinte geração.

3. Função Fitness

A função fitness é a encarregada de dar uma nota ou avaliar cada indivíduo da população, baseada nos atributos dele, e assim premiar aqueles indivíduos que estão sendo melhor adaptados. Esta função fitness pode variar segundo a natureza do problema a resolver. Para nosso caso, a função fitness será a execução da dinâmica do autômato, dado que os valores do cromossomo são os 5 parâmetros por célula da lattice; assim, o valor que devolverá a função será o seguinte:

$$F = \frac{1}{1 - \sum_{i=1}^{11} \sum_{j=1}^{11} (l_{ij} - \hat{l}_{ij})^2}$$

onde:

l_{ij} representa a célula na linha i e coluna j da lattice desejada.

\hat{l}_{ij} representa a célula na linha i e coluna j da lattice aproximada (evoluindo).

O critério de parada da dinâmica do autômato é quando o número de larvas enterradas igualar-se ao número de larvas iniciais na superfície. Esse critério é aplicado e a função fitness tende a premiar mais aqueles indivíduos que gerem uma lattice com valores mais semelhantes à lattice desejada, e isto se consegue pela diferença ao quadrado dos valores célula a célula. Assim, quando esta diferença é nula, a função retornará a 1.

4. Restrições

O processo de otimização tem basicamente uma restrição, a somatória dos coeficientes de dispersão não poderá ser maior que a unidade. Assim, logo depois de criar um filho na população, este deverá passar por uma rotina que o tornará factível.

5. Valores das variáveis de entrada do modelo

Para a simulação foram estabelecidos os seguintes valores das variáveis de entrada do modelo.

Estratégia = $(\mu + \lambda, \rho)$

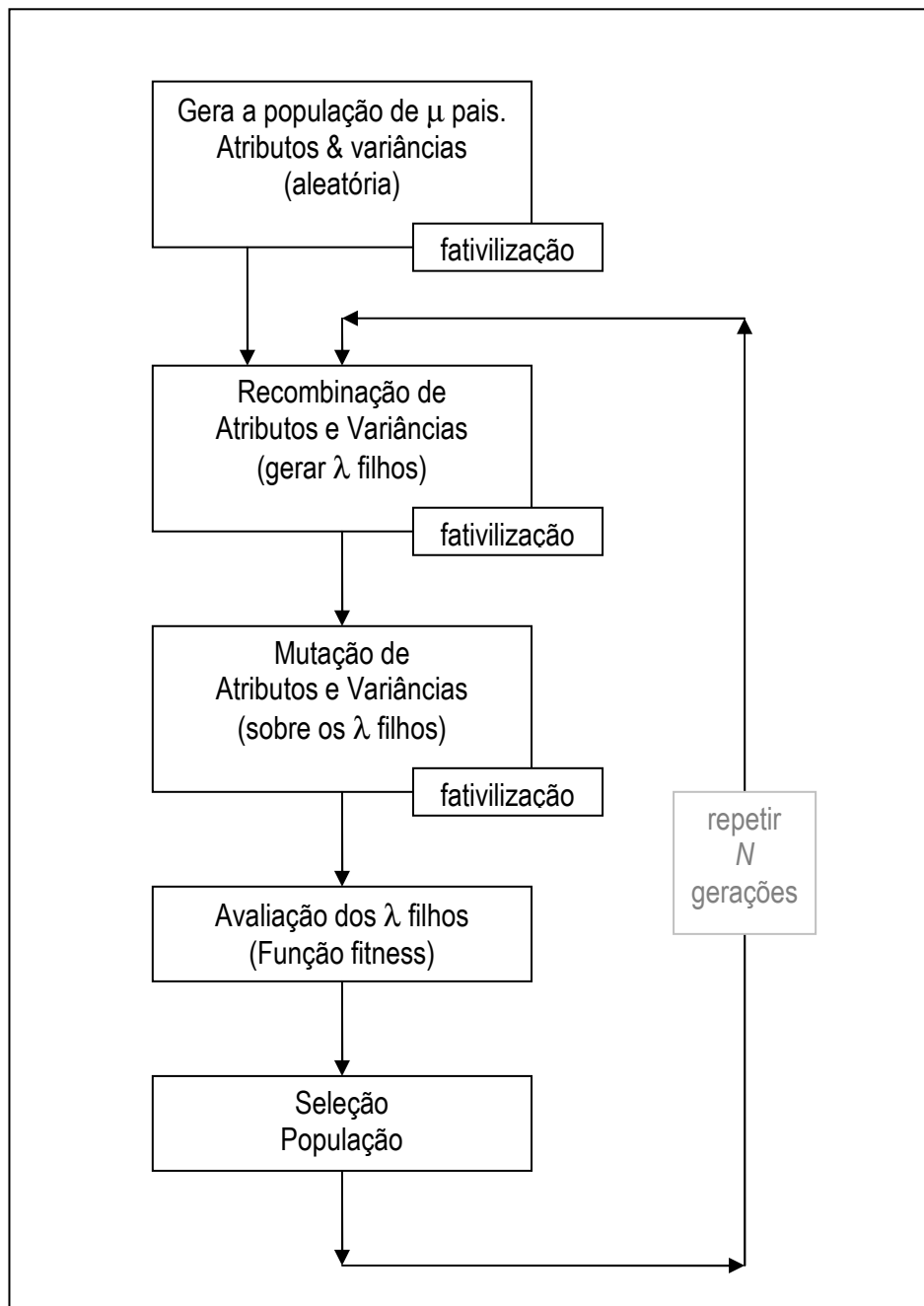
μ (pais) = 750

λ (filhos) = 1000

ρ (pais para a recombinação) = 150

N (numero de gerações) = 25000

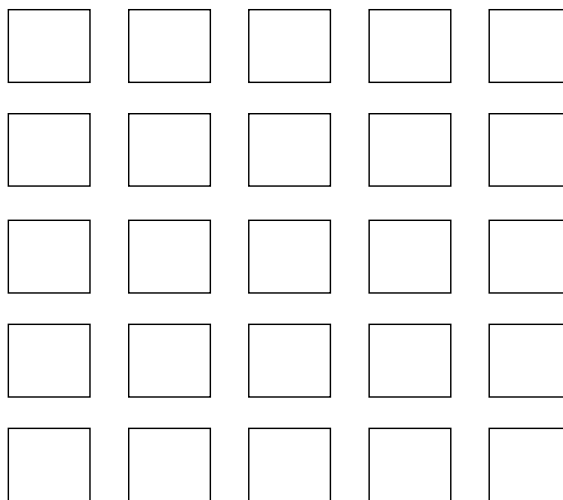
Fluxograma do processo de evolução



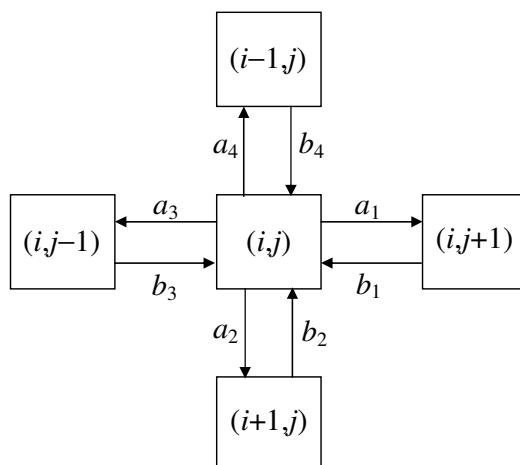
Autômato celular para reprodução de padrões de dispersão bidimensional larval

Assim baseado na literatura sobre a evolução do desenvolvimento de algoritmos para população em evolução, e principalmente nos dados desse projeto, chegou-se aos seguintes tópicos para reprodução do padrão de dispersão pós-alimentar larval:

- A conformação das células é a seguinte: grade reticulada bidimensional $n \times m$, onde n pode ser diferente de m e ambos devem ser maiores ou iguais a 2;



- conformação da vizinhança: ordem 1 e admitindo fluxo na vertical e da horizontal, não na diagonal.
- Baseado nos experimentos, a vizinhança na fronteira é toroidal, ou seja, o último é vizinho do primeiro, seja na vertical ou na horizontal.
- tomando uma célula (i,j) qualquer, o fluxo de massa vai obedecer o seguinte padrão:



- Onde, os coeficientes a_k ($k=1,\dots,4$) representam as porcentagens de massa que irão fluir para os vizinhos e atendem às seguintes inequações:

$$\begin{cases} a_1 + a_2 + a_3 + a_4 \leq 1 \\ a_k \geq 0, k = 1,\dots,4 \end{cases}$$

- Sendo definido um conjunto $\{a_1, a_2, a_3, a_4\}$ para cada célula (i,j) , de modo que existe a seguinte relação envolvendo os parâmetros b_k ($k=1,\dots,4$):
 - ✓ b_1 da célula (i,j) corresponde a a_3 da célula $(i,j+1)$;
 - ✓ b_2 da célula (i,j) corresponde a a_4 da célula $(i+1,j)$;
 - ✓ b_3 da célula (i,j) corresponde a a_1 da célula $(i,j-1)$;
 - ✓ b_4 da célula (i,j) corresponde a a_2 da célula $(i-1,j)$;
- com esta correspondência, garante-se a condição de conservação de densidade larval por áreas, pois o total que sai de uma célula tem que entrar nas células vizinhas, de acordo com o seguinte equacionamento para a evolução do estado no tempo:

$$ac(i, j) = (1 - a_1 - a_2 - a_3 - a_4) * ac(i, j) + b_1 * ac(i, j + 1) + b_2 * ac(i + 1, j) + b_3 * ac(i, j - 1) + b_4 * ac(i - 1, j)$$

onde $i \in \{1, \dots, n\}$ e $j \in \{1, \dots, m\}$.

- deve ficar claro que, no caso de células da fronteira, ou as mesmas perdem alguns vizinhos, ou os vizinhos representam as células do lado oposto. Nesta segunda hipótese, o mapa não pode ser planar e sim toroidal.
- exemplo: no mapa 5×5 acima, sem vizinhança toroidal, a célula da primeira linha e quinta coluna, ou seja, célula $(i,j) = (1,5)$, não teria vizinho a leste nem a norte. Com vizinhança toroidal, o vizinho a leste é a célula $(1,1)$ e a norte é a célula $(5,5)$.

- a ausência de vizinhança toroidal pode ser simulada pela anulação dos coeficientes de fluxo destes vizinhos de fronteira no programa que considera a vizinhança toroidal.
- o fato de cada célula admitir valores distintos para os seus parâmetros $\{a_1, a_2, a_3, a_4\}$ promove um grau de flexibilidade à dinâmica do autômato que raramente é explorado e se apresenta inovador nessa linha de pesquisa.
- a estrutura de dados implementada para armazenar os parâmetros de todas as células do autômato celular é uma matriz de dimensão $(n*m) \times 4$.
- cada linha desta matriz vai conter os parâmetros de uma célula do autômato. A linha correspondente a uma célula (i,j) arbitrária, com $i \in \{1, \dots, n\}$ e $j \in \{1, \dots, m\}$, é dada pelo índice $m*(i-1)+j$.
- repare que, dadas as condições a serem atendidas pelo conjunto de parâmetros $\{a_1, a_2, a_3, a_4\}$ de cada célula, e admitindo que cada célula do autômato tenha valores distintos para este conjunto, o total que flui de cada célula para suas vizinhas pode variar de 0% a 100% da massa atualmente presente na célula. Aqui não está sendo contabilizado o que chega de massa das células vizinhas.

Como e para que fim otimizar os parâmetros?

A fim de se explicar parâmetros para a dispersão, podem ser relacionadas as seguintes assertivas:

- a dinâmica do autômato é dependente do seu estado inicial e dos parâmetros das células, presentes na matriz de dimensão $(n*m) \times 4$.
- admitindo conservação de densidade das larvas em uma área, de modo que o somatório da massa da densidade das células se mantém constante ao longo do tempo, dado um estado inicial e um estado final para as células (ambos obtidos a partir de experimentos de campo e/ou laboratório), quais devem ser os valores fixos dos elementos da matriz de dimensão $(n*m) \times 4$ tal que a dinâmica do autômato apresente uma trajetória com início e fim nestes perfis de estado desejados?
- com as condições impostas ao conjunto $\{a_1, a_2, a_3, a_4\}$, a dinâmica do autômato é sempre convergente. Sendo assim, espera-se que sempre exista ao menos uma

configuração para a matriz de dimensão $(n*m) \times 4$, tal que qualquer estado final que respeite a condição de conservação de massa seja atingível.

- experimentos computacionais estão sendo realizados neste sentido, empregando técnicas de otimização avançadas.
- uma vez bem-sucedidos estes experimentos, o passo seguinte é interpretar o padrão de fluxo obtido, capaz de levar ao estado final desejado.
- há a possibilidade de se levar em conta estados intermediários da trajetória, além dos estados inicial e final.

Autômato celular bidimensional com valores reais (11x11), tipo de vizinhança von Neumann (4 regras por célula). Considera-se um parâmetro que representa a taxa de enterramento por célula.

Evolução de parâmetros via Estratégias Evolutivas (EEs): cada cromossomo formado por 605 valores, operadores de Recombinação, Mutação e Seleção. A função *fitness* retorna à somatória do quadrado da diferença entre estado final desejado e obtido, para o qual roda-se o AC com os parâmetros em evolução até que o número de larvas enterradas alcance um valor limiar (exemplo no. Larvas iniciais – 0.001). ($\text{Fitness} = 1 / [1+(\text{desejado} - \text{enterrados})^2]$)

Evolução das 4 regras e o parâmetro de “Taxa de Enterramento” por cada célula da lattice de autômato celular bidimensional. (11x11x5=605 parâmetros a encontrar.)

A partir dos dados coletados, e determinado o autômato-celular (Lattice 11x11), foram realizadas as simulações do estado esperado através dos algoritmos e o estado obtido pelos experimentos em conjunto. Para tal simulação, foi utilizado o experimento em campo com o porco (*Sus scrofa*) por se tratar do experimento com maior quantidade de dados e por ser em ambiente natural, o qual demonstra e também confirma os dados em laboratório, como visto nas seções anteriores.

Resultados na geração 25000

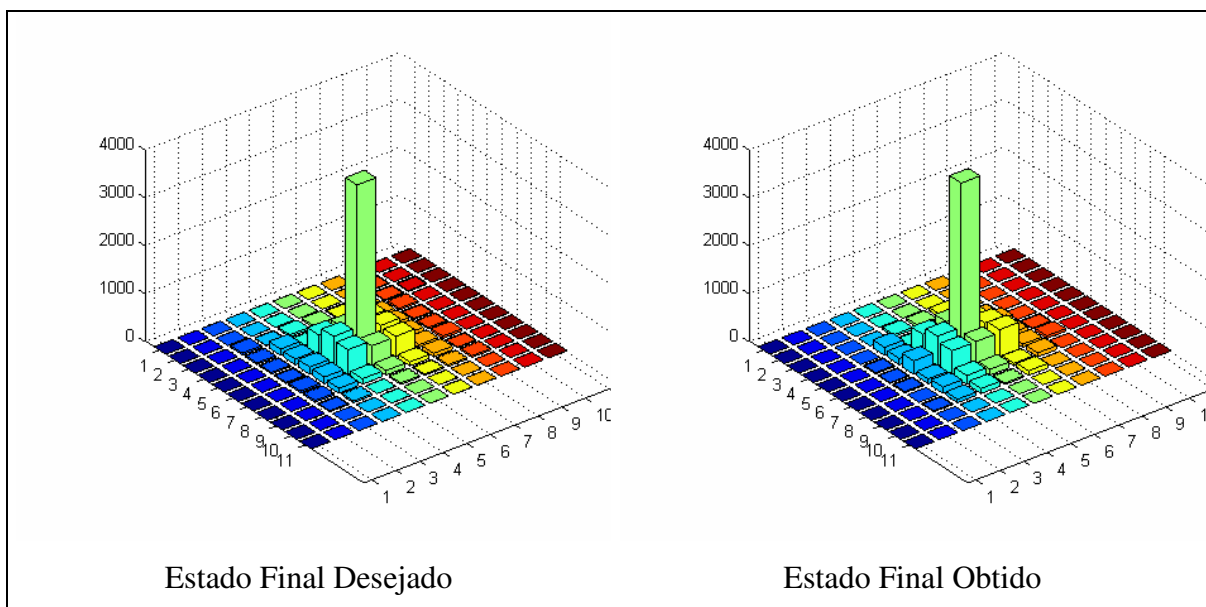


Figura 1: Simulação da ocorrência das pupas coletadas em campo (Estado Final obtido) e pupas coletadas simuladas através do autômato-celular desenvolvido (Estado final desejado).

A seguir, demonstra-se o mesmo gráfico da Figura 1, mas em vista frontal dos dados obtidos e desejados (Figura 2).

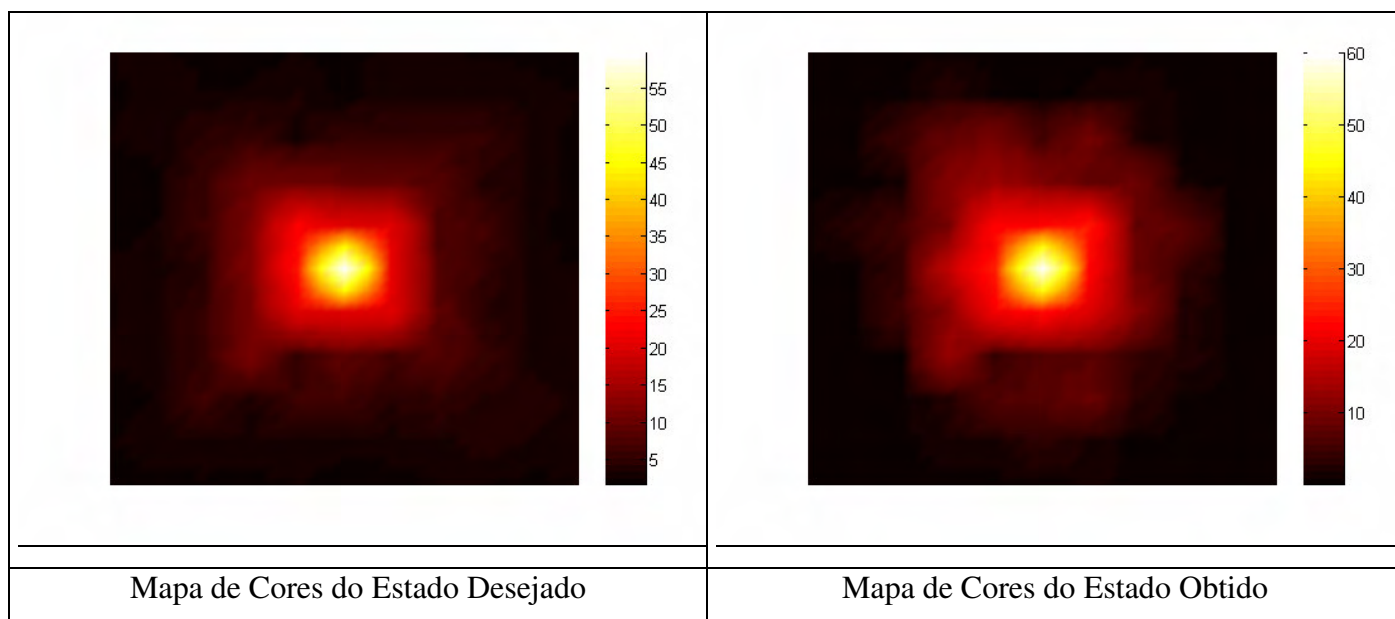


Figura 2: Simulação da ocorrência das pupas coletadas em campo (Estado Final obtido) e pupas coletadas simuladas através do autômato-celular desenvolvido (Estado final desejado) por gráfico de cores.

Como visto anteriormente, a evolução dos algoritmos dos autômatos segue o mesmo padrão de evolução (“fitness”) como pode-se ver pela Figura 3, a seguir.

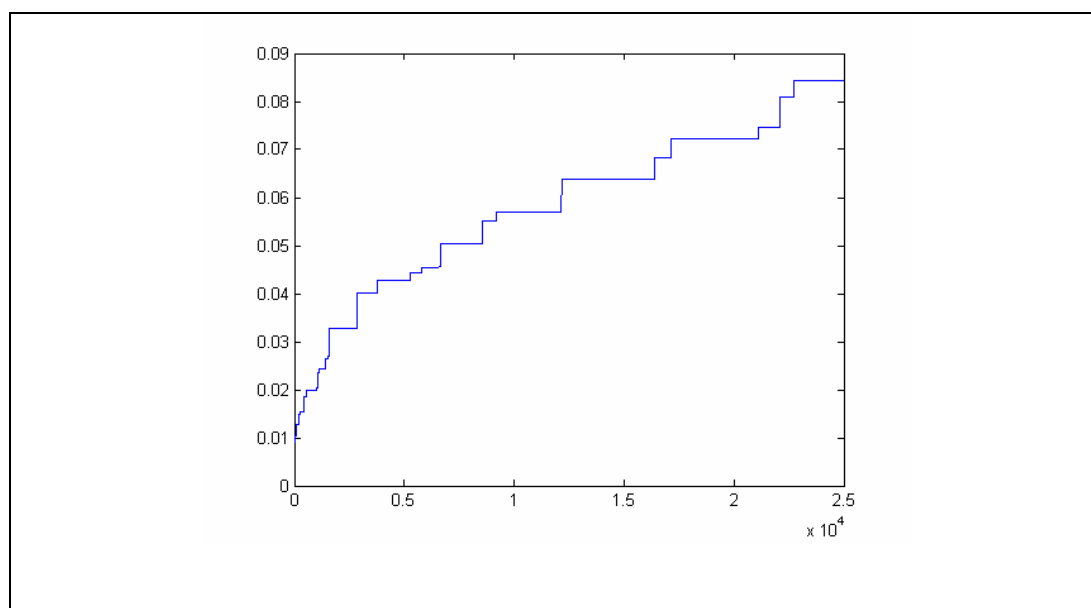


Figura 3: Valor Fitness do Processo Evolutivo (Busca dos parâmetros)

A seguir, encontram-se as matrizes (11x11, vizinhança de Von Neuman) da densidade de larvas (massa) dos dados desejados e obtidos onde o centro é representado em “sublinado”.

Valores da matriz de “Estado Final Desejado”										
3	4	6	5	7	5	5	7	7	5	7
6	12	10	10	10	8	9	10	18	11	9
4	7	40	15	41	42	23	30	18	19	8
8	12	32	132	30	90	51	71	36	7	7
6	10	31	121	430	410	418	82	20	11	9
8	10	20	151	600	<u>3573</u>	452	73	30	8	7
4	7	40	140	520	412	419	57	46	8	5
5	5	37	102	113	95	85	75	16	12	4
7	9	21	35	12	32	29	34	32	12	5
5	12	7	8	13	5	12	8	12	8	7
7	8	5	4	7	5	8	8	6	6	5

Valores da matriz de “Estado Final Obtido” = Larvas enterradas										
0,001	0,005	0,026	0,047	0,021	0,071	1,51	0,084	0,00 3	0,00 6	0 0
0	0,008	0,131	3,132	2,291	10,374	2,694	0,009	0,00 6	0,00 2	0 0
0	0	0,022	5,323	43,119	50,163	73,91 2	9,797	0,19	0,04 7	0,00 1
0,002	0,067	0,567	166,214	15,087	49,457	52,51 8	16,06 4	6,68 7	0,53 1	0 0
0,143	0,227	26,326	132,137	444,883	515,577	377,1 53	130,5 74	5,17	0,04 9	0,00 5
0,006	0,543	14,658	280,132	603,671	<u>3612,66</u>	500,4 02	81,70 5	16,0 45	0,13 7	0,01 8
0,014	8,26	26,04	102,281	497,152	499,745	560,2 29	69,22	53,0 57	0,37 3	0,18 3
0,004	0,116	1,49	126,108	178,843	122,046	56,58 6	83,78 4	1,44 1	0,01 4	0 0
0	0,088	18,922	70,124	106,134	30,708	95,81 6	4,504	0,08	0	0
0	0,009	0,019	6,781	0,032	0,049	1,333	3,521	0,01 8	0,00 2	0,00 1
0	0,001	0,037	0,295	0,085	0,009	0,015	0,008	0,01 2	0,00 1	0 0

Da mesma forma, foi determinada a taxa de enterramento das larvas por área em uma matriz 11x11 com o centro representado em “sublinhado”.

Taxa de enterramento por célula										
0,229	0,007	0,564	0,177	0,016	0,075	0,588	0,438	0,444	0,727	0,804
0,073	0,253	0,426	0,521	0,524	0,473	0,382	0,754	0,474	0,087	0,787
0,475	0,588	0,582	0,464	0,409	0,264	0,863	0,349	0,569	0,689	0,383
0,62	0,526	0,51	0,805	0,128	0,094	0,167	0,237	0,822	0,918	0,133
0,609	0,451	0,687	0,284	0,337	0,158	0,337	0,717	0,346	0,235	0,535
0,266	0,93	0,489	0,248	0,217	<u>0,816</u>	0,332	0,206	0,945	0,485	0,824
0,353	0,952	0,279	0,452	0,394	0,173	0,408	0,225	0,691	0,388	0,739
0,794	0,454	0,269	0,343	0,256	0,219	0,225	0,672	0,483	0,117	0,398
0,484	0,681	0,754	0,557	0,436	0,984	0,856	0,195	0,924	0,367	0,144
0,045	0,802	0,268	0,854	0,094	0,318	0,383	0,779	0,545	0,333	0,273
0,151	0,171	0,233	0,588	0,261	0,763	0,514	0,031	0,475	0,656	0,412

A seguir, encontra-se o mapa das cores das taxas de enterramento das larvas por região.

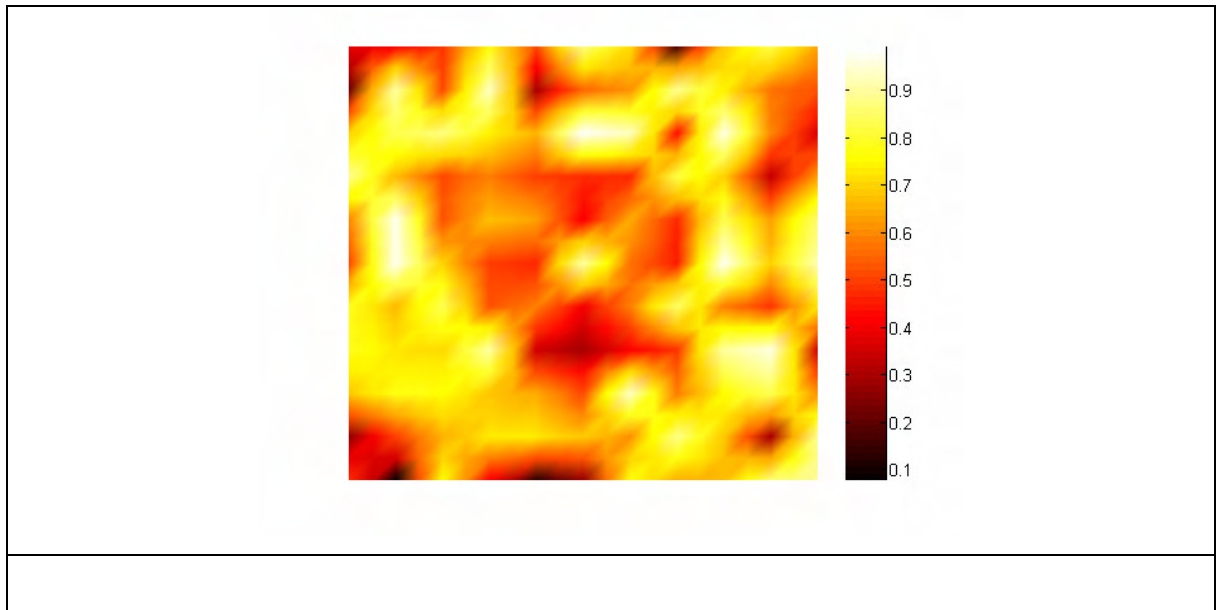


Figura 4: Mapa de Cores das Taxas de Enterramento (cor clara para valores altos, escuro para baixos), indica os setores onde o enterramento é maior ou menor.

Finalmente, a seguir encontram-se os vetores da direção por cada célula de escolha para as larvas dispersarem em ambiente natural (Figura 5).

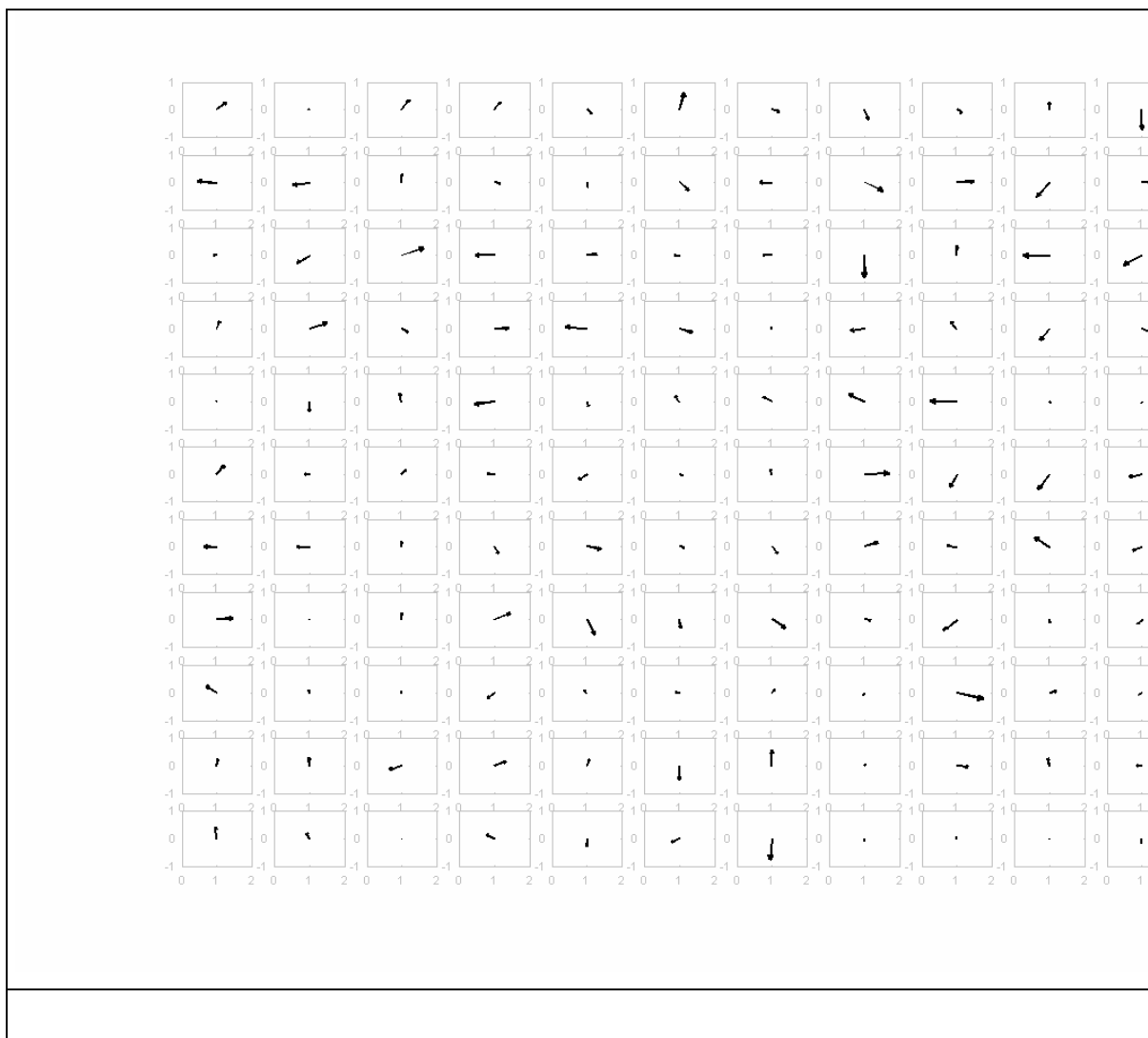


Figura 5: Campo dos vetores resultantes por cada célula (resultante da somatória dos 4 vetores, segundo a vizinhança de Von Newman), indica o fluxo das larvas.

E na seqüência, encontram-se os vetores da direção por cada célula (resultante) de escolha para as larvas dispersarem em ambiente natural (Figura 6).

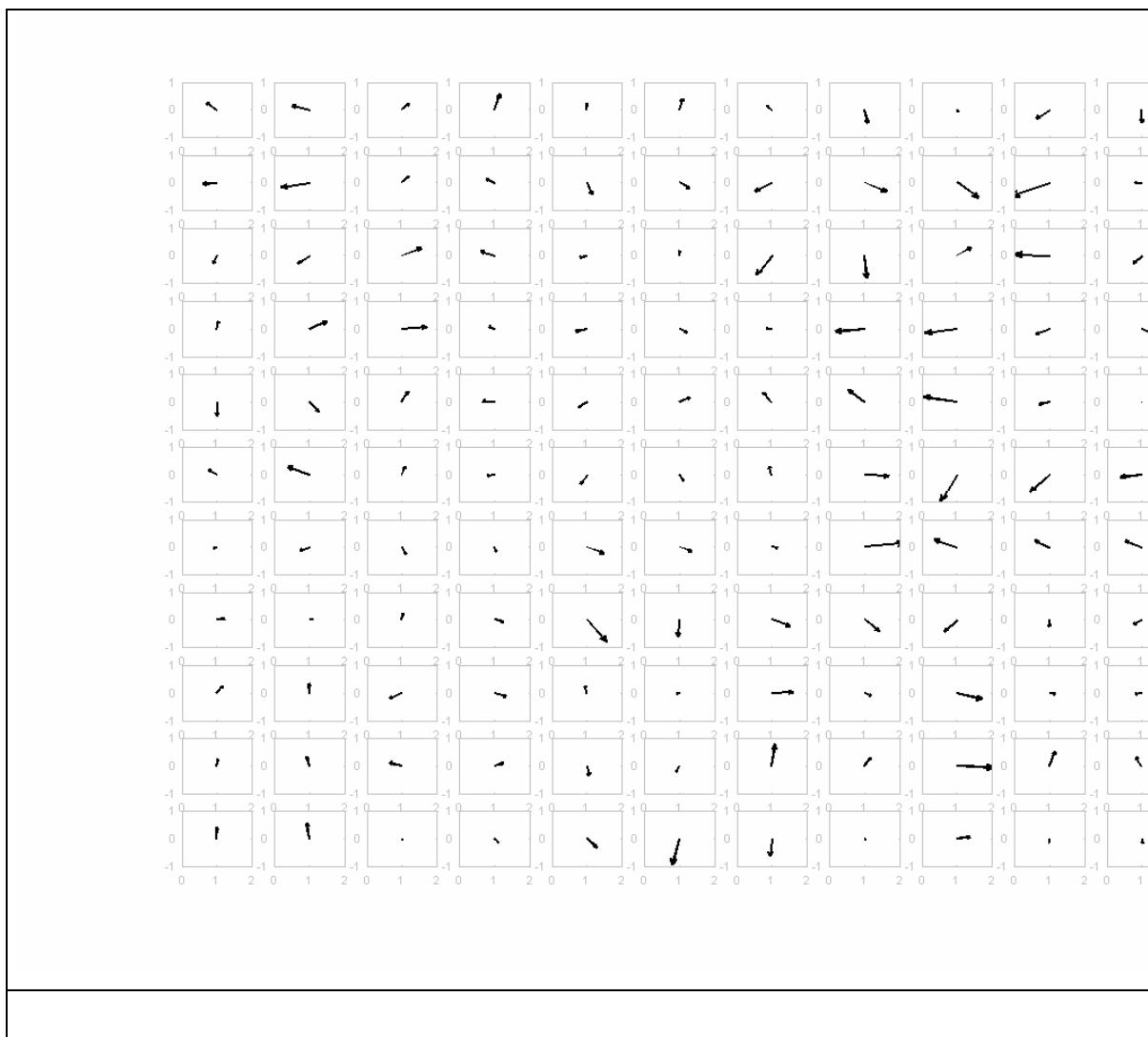


Figura 6: Campo dos vetores resultantes por cada célula (resultante da somatória dos 4 vetores de saída com os outros de entrada correspondentes às 4 células vizinhas - vizinhança de Von Newman), indica o fluxo resultante por célula.

CONCLUSÃO

- Pode-se dizer que a dispersão das larvas de moscas-varejeiras em substratos mais compactos ou com maiores obstáculos provavelmente dificulte a penetração das larvas durante a dispersão para enterramento, como se pôde notar nesse experimento em que a vermiculita, apesar de ser menos densa que a serragem, possui uma granulometria maior que a mesma (GOMES *et al.*, 2003), o que poderia, provavelmente, dificultar a movimentação das larvas pelo fato de haver menos poros ou espaços para as larvas se movimentarem.
- Outro aspecto que se pode confirmar é que a correlação entre peso e distância é geralmente negativa, o que vem a reafirmar que as larvas menos pesadas são as que percorrem maiores distâncias no ambiente natural, talvez por estarem à procura de novos substratos alimentares ou para pupação (GOMES *et al.*, 2002, 2003). O presente estudo com arenas menores com três espécies de larvas de moscas-varejeiras demonstrou aspectos gerais sobre o processo de dispersão em uma arena circular, e não confirmou resultados anteriores de distribuição espacial (GOMES & VON ZUBEN, 2003; GOMES *et al.* 2003), em que as larvas eram soltas isoladamente e se distribuíram uniformemente. Isso se deve provavelmente ao fato da ocorrência de mais de uma espécie dispersando para se empupar, além de que as larvas de *C. albiceps* são predadoras e até canibais durante o processo de procura por nova fonte alimentar.
- Nos estudos considerando temperatura, a temperatura afeta a profundidade para ambas as espécies. As larvas de *L. cuprina* apresentam

profundidades maiores para temperaturas baixas e altas, enquanto que as larvas de *C. albiceps* apresentam profundidades médias menores para temperaturas extremas. Foi verificado que para as larvas de *C. albiceps*, o comportamento da profundidade com a variação da temperatura é mais previsível, ou seja, sob temperaturas mais baixas, as larvas tendem a se enterrar mais profundamente. Quando se compara o efeito da temperatura no peso para as duas espécies, pode-se verificar que ele é significativo nos dois casos. No caso das larvas de *L. cuprina*, o aumento da temperatura faz com que o peso diminua sempre em todo o intervalo considerado. Já no caso das larvas de *C. albiceps*, o peso aumenta até uma temperatura em torno de 25 °C e depois cai bruscamente. Da mesma forma que a profundidade, o peso parece ser afetado pela temperatura de forma diferente para as duas espécies, mas também com indicações de que há um ponto de máximo para ambas as espécies, isto é, há uma temperatura na qual as larvas atingem um peso máximo. Inicialmente isso parece ter relação com a alimentação, mas talvez a temperatura afete a quantidade de energia gasta com o metabolismo acelerado, o que por sua vez afetaria o peso.

- Apesar da vermiculita alterar as médias das profundidades significativamente, isso já era de se esperar já que quanto maior a dificuldade da larva para penetrar no substrato, menos profundamente ela chegará. Mas, o fato mais importante é que o tipo de substrato não afeta o comportamento de dispersão dessas larvas (padrão de uniformidade), o que significa que em ambiente natural, a ocorrência delas em vários tipos de substratos diferentes provavelmente demonstrará o mesmo tipo de comportamento de dispersão.
- Os experimentos em ambiente natural confirmaram algumas análises feitas em laboratório. O mais importante do estudo em campo sobre a dispersão larval pós-alimentar e da entomofauna visitante da carcaça de *Sus scrofa* (porco), é que realmente não existe uma uniformidade de distribuição das larvas para se enterrarem em ambiente natural, da mesma forma que na maioria dos estudos em laboratório (GOMES *et al.*, 2002, 2003; GOMES & VON ZUBEN, 2005).

Além disso, da mesma forma que nesses estudos, as larvas de *C. albiceps* têm uma tendência de se enterrarem de forma agregada e mais próximas ao substrato de alimentação, nesse caso o porco. Apesar de o estudo ter constatado a existência de outras espécies que participaram do processo de dispersão (espécies que foram trabalhadas em outros estudos, tais como: *Sarcophaga ruficornis* e *L. eximia*), as larvas de *C. albiceps* mantiveram seu comportamento de agregação fazendo com que as larvas de *C. megacephala*, principalmente, se dispersassem e se enterrassem mais longe do centro da mesma forma que resultados de estudos anteriores (GOMES *et al.*, 2002, 2003, 2004; GOMES & VON ZUBEN, 2005).

- Baseado nos algoritmos desenvolvidos através dos dados coletados nesse e em outros relatórios, pode-se dizer que as larvas dessas espécies de moscas-varejeiras (Família Calliphoridae) possuem probabilidades iguais de dispersarem em regiões próximas ao centro de dispersão, ou seja, devido, provavelmente, ao fato de que em distâncias de até 3 m, as larvas por estarem competindo nessa região com outras espécies, por recursos alimentares e principalmente por sítios de pupação, não conseguem dispersar sem a influência do contato físico com as outras. Porém, em regiões com distâncias superiores a 3m do centro, as larvas passam a ter mais liberdade de dispersão, devido ao espaço maior que lhes é disponibilizado, e assim as probabilidades de dispersarem de volta em direção ao centro e de maneira aleatória, em círculos, começam a aumentar. Isso ocorre provavelmente pelo fato da maioria das larvas, que não encontraram substrato adicional de alimento, voltem ao centro de dispersão para se alimentarem.
- Baseado no comportamento individual, pode-se dizer que esse comportamento de voltarem ao centro como se estivessem circulando nessa região, ocorre mais frequentemente quanto maior for a presença de larvas predadoras e canibais e/ou quanto menor for a disponibilidade de alimento para as mesmas.

LITERATURA CITADA

- ATKINSON W D, SHORROCKS B (1981) Competition on a divided and ephemeral resource: a simulation model. *J. of Anim Ecol* 50: 461-471.
- BAK, P. **“How Nature Works: The Science of Self-Organized Criticality”**, Copernicus Books, 1996.
- BACKER, K. **An analysis of factors which determine success in competition for food among larvae of *Drosophila melanogaster***. *Arch. Neer. Zool.*, v. 14, n. 2, p. 200-281, 1961.
- Selection for rate of growth and its influence on competitive ability of larvae of *Drosophila melanogaster*** . *Neth. J. Zool.*, v. 19, n. 14, p. 541-595, 1969
- 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. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 92, n. 2, p.281-286, 1997.
- BAUMGARTNER, D L., GREENBERG, B. **The genus *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in the New World**. *J. Med. Entomol.* , v. 21, n.1, p. 105-113, 1984.
- BEM-JACOB, E. 2003. **Bacterial self-organization: co-enhancement of complexication and adaptability ina dynamic environment**. *Philip. Trans. R. Soc. London A* 361: 1283-1312.
- H-G. BEYER AND H-P. SCHWEFEL, **“Evolution strategies: A comprehensive introduction”**, Natural Computing, 2002.
- BONABEAU, E., DORIGO, M., THÉRAULAZ, G. **“Swarm Intelligence from Natural to Artificial Systems”**, Oxford University Press, 1999.

- CAMAZINE, S., DENEUBOURG, J.-L., FRANKS, N.R., SNEYD, J., THERAULAZ, G., BONABEAU, E. **“Self-Organization in Biological Systems”**, Princeton University Press, 2001.
- Feng, W.C.; Cui, H; Chuan, C.Y.; Xiong, M.J.; Tao, L. J.; Wang, J.F.; Hu, C.; Chen, Y.C.; Min, J. X. & Li, J.T., 2001. **Chronology of development within puparium of *Chrysomya megecephala* in different constant temperature and its application in postmortem interval.** Acta Paras. Med. Entomol. Sin. 8:232-236.
- FENG, W.C.; CUI, H; CHUAN, C.Y.; XIONG, M.J.; TAO, L.J.; WANG, J.F.; HU, C.; CHEN, Y.C.; MIN, J. X. & LI, J.T., 2002. **Effect of temperature over the body-length change of *Chrysomya megacephala* (Fabrius).** Acta Paras. Med. Entomol. Sin. 9:100-105.
- Furlanetto, S. M. P.; Campos, M. L. C.; Hársi, C. M.; Buralli, G. M. & Ishihata, G. H., 1984. **Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil.** Rev. Microbiol. 15:170-174.
- FORREST, S. **“Emergent Computation: Self-organizing, Collective, and Cooperative Phenomena in Natural and Artificial Computing Networks”**, *Physica D*, 42:1-11, 1990.
- FURLANETTO, S. M. P. , CAMPOS, M.L.C., HÁRSI, C.M., BURALLI, G.M., ISHIHATA , G.K. **Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil.** Rev. Microbiol., São Paulo, v.15, n.3, p.170-174, 1984.
- GODOY, W. A.C., FOWLER, H. G., VON ZUBEN, C. J., ZITI, L., RIBEIRO, O. B. **Larval dispersion in *Chrysonya megacephala*, *C. putoria* and *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae).** J. Appl. Entomol., v. 119, p.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., v. 120, n. 4, p. 423-426, 1996.
- GOLDBETER, A. **“Biochemical Oscillations and Cellular Rhythms”**, Cambridge University Press, 1996.

- GOMES, L., VON ZUBEN, C. J., GOVONE, J. S. **Comportamento da dispersão larval radial pós-alimentar em moscas-varejeiras do gênero *Chrysomya* (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): busca por novas fontes de alimento.** Entomologia y Vectores. Rio de Janeiro: , v. 9, n. 1, p. 115 - 132, 2002.
- GOMES, L. & VON ZUBEN, C.J., 2002. **Dispersão larval pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): Profundidade, Distância e Peso de enterramento para pupariação.** Biosci. J. 18: 67-76.
- GOMES, L.; VON ZUBEN, C.J. & SANCHES, M. R., 2003. **Estudo da dispersão larval radial pós- alimentar em *Chrysomya Megacephala* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae).** Rev. Bras. Entomol. 47: 229- 234.
- GOMES L, VON ZUBEN C J, SANCHES M R (2003) **Estudo da dispersão larval radial pós-alimentar em *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae).** Rev Bras Entomol 47: 229-234.
- Gomes L, Von Zuben C J (2004) **Dispersão larval radial pós-alimentar em *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): profundidade, peso e distância de enterramento para pupação.** Iheringia. Série Zoologia 94: 135 - 138.
- Gomes, L. e Von Zuben, C. J. 2004. **Efeito da temperatura na profundidade de enterramento de larvas de *Chrysomya megacephala* (Wied.) (Diptera: Calliphoridae).** Entomologia y Vectores. , v.11, n.3.
- Gomes, L. e Von Zuben, C. J. 2004. **Insetos ajudando a desvendando crimes: Entomologia forense.** Ciência Hoje, 208: 28- 31.
- Gomes L, Sanches M R, Von Zuben C J (2005) **Dispersal and burial behavior in larvae of *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae).** J Ins Behav 18 (2) 281- 292.
- Gomes L, Von Zuben C J (2005) **Postfeeding radial dispersal in larvae of *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae): implications for forensic entomology.** For Sci Intern 155 (2005) 61–64.
- GOODBROD, J.R., GOOF, M. L. **Effects of larval pupation density on rates of development and interactions between two species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) in laboratory culture.** J. Med. Entomol. , v. 27, n. 3, p. 388- 343, 1990.

- GRASSBERGER, M & REITER, C. 2003. **Effect of temperature on development of the forensically important holartic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae).** Forensic Sci. Int.128:177- 182.
- GREENBERG, B. **Behavior of postfeeding larvae of some Calliphoridae and amuscid (Diptera).** Ann. Entomol. Soc. Am., v. 83, p. 1210-1214, 1990.
- : Flies as forensic indicators. J. Med. Entomol., v. 28, p. 565-577, 1991.
- GUIMARÃES, J.H. , PRADO, A. P., LINHARES, X. **Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae).** Revta. Bras. Ent., v. 22.n. 1, p. 53-60, 1978.
- 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., v.23, n. 4, p. 245-255, 1979.
- GUIMARÃES, J. H., PAPAVERO, N., PRADO, A. P. **As miíases na região neotropical (identificação, biologia, bibliografia).** Revta. Bras. Zool. 1 (4) : 239-416, 1983.
- HANSEN, N. AND A. OSTERMEIER, **“Completely Derandomized Self-Adaptation in Evolution Strategies”**, *Evolutionary Computation*, 9(2), pp. 159-195, 2001.
- İLACHINSKI, 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. ,v. 20, p. 35-39, 1977.
- KAPRAL, R. & SHOWALTER, K. (eds.) **“Chemical Waves and Patterns”**, Kluwer Academic Press, 1994.
- KAUFFMAN, S.A. **“The Origins of Order: Self-Organization and Selection in Evolution”**, Oxford University Press, 1993.
- LEVOT, G.W., BROWN, K. R., SHIPP, E. **Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera.** Bull. ent. Res. , v. 69, p .469-475, 1979.
- LEFBVERE, F & PASQUERAULT, T. 2004. **Temperature- dependent development of *Ophyra aenescens* (Wiedemann 1830) and *Ophyra capensis* (Wiedemann 1818) (Diptera, Muscidae).** Forens. Sci. Int. 139: 75- 79.
- LIMA, M. L. P. S., LUZ, E. **Espécies exóticas de *Chrysomya* (Diptera, Calliphoridae) como veiculadoras de enterobactérias patogênicas em Curitiba, Paraná, Brasil.** Acta. Biol. Par., Curitiba, v. 20, n. 1/2/3/4, p. 61-83, 1991.

- LINHARES, A. X. (1988) **The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory.** *Rev. Bras. Ent.* 32: 383- 392.
- LOMNICKI, A. **Population ecology of individuals.** Princeton: Princeton Press, 233 p., 1988.
- MYSKOWIAK, J. B. & DOUMS, C. 2002. **Effects of refrigeration on the biometry and development of *Protophormia terraenovae* (Robineau- Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) and its consequences in estimating the post- mortem interval in forensic investigations.** *Forens. Sci. Int.* 125: 254- 261.
- NISHIZUKA, M, AZUMA, A. & MASAKI, S. (1998). **Diapause response to photoperiod and temperature in *Lepisma saccharina* Linnaeus (Thysanura, Lepismatidae).** *Entomological Science*, 1: 7- 14.
- NICOLIS, G., PRIGOGINE, I. **“Self-organization in non-equilibrium systems”**, Wiley, 1977.
- OTERMEIER, A., A. GAWELCZYK AND N. HANSEN, **“Step-size adaptation based on non-local use of selection information”**, In Y. Davidor, H.-P. Schwefel and R. Männer (Eds.), *Parallel Problem Solving from Nature--PPSN IV, Proceedings*, Jerusalem, pp. 189-198. Springer, 1994.
- REIS, S. F., STANGENHAUS, G., GODOY, W. A.C., VON ZUBEN, C. J., RIBEIRO, O.B. **Variação em caracteres bionômicos em função de densidade larval em *Chrysomya megacephala* e *Chrysomya putoria* (Diptera : Calliphoridae).** *Revta bras. Ent.*, v. 38, n. 1, p. 33-34, 1994.
- REIS, Sérgio Furtado dos; ZUBEN, Claudio José Von; GODOY, Wesley Augusto Conde. **Larval aggregation and competition for food in experimental populations of *Chrysomya putoria* (Wied.) and *Cochliomyia macellaria* (F.) (Diptera: Calliphoridae).** *J. of App. Entom.*, Alemanha, v. 123, p. 485-489, 1999.
- R. SOLOMON, **“Evolutionary Algorithms and Gradient Search: Similarities and Differences”**, *IEEE trans. on Evolutionary Computation*, vol. 2, no. 2, pp. 45-55, July 1998.
- SAUNDERS, D. S. 2002. **Insects clocks.** 3rd edn. Elsevier Science, Amsterdam.
- ULLYETT, G. C. **Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations.** *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, v. B234, p. 77-174, 1950.

- VON NEUMANN, J. **“The general and logical theory of automata”**, in Taub, A.H. (ed.) J. von Neumann, Collected Works, 5(288), 1963.
- VON ZUBEN, C. J., BASSANEZI, R. C., REIS, S. F., GODOY, W. A. C., ZUBEN, F. J. V. **Theoretical approaches to forensic entomology: I. Mathematical model of postfeeding larval dispersal.** J. Appl. Entomol., v.120, n. 3, p. 379-382, 1996.
- Von ZUBEN, Claudio José. **Implicações do fenômeno de agregação espacial para a dinâmica de populações em insetos. I. Competição por recursos alimentares e espaço.** Rev. Bras. de Zooc., Juiz de Fora, MG, v. 2, n. 1, p. 117-133, 2000.
- VON ZUBEN, CLAUDIO JOSÉ; STANGENHAUS, GABRIELA; GODOY, WESLEY AUGUSTO CONDE. **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. de Biol., São Carlos, v. 60, n. 2, p. 195-203, 2000.
- ZUBEN, CLAUDIO JOSÉ VON; ZUBEN, FERNANDO JOSÉ VON; GODOY, WESLEY AUGUSTO CONDE. **Larval competition for patchy resources in *Chrysomya megacephala* (Dipt., Calliphoridae): implications of the spatial distribution of immatures.** J. of App. Entom., Berlin, Alemanha, v. 125, n. 1, p. 537-541, 2001.
- WOLFRAM, S., *Cellular Automata and Complexity – Collected Papers*, Addison-Wesley Publishing Company, 1994
- ZUMPT, F. **Myiasis in man and animals in the Old World.** London: Butterworths, 267 p., 1965.