

Forensic Entomology/Entomologia Forense

Morfometria geométrica alar como ferramenta para a identificação de três espécies de califorídeos (Diptera: Calliphoridae) no Cerrado Brasileiro

Marcos Patrício Macedo✉

Universidade de Brasília/Instituto de Criminalística - PCDF.

EntomoBrasilis 10 (1): 09-13 (2017)

Resumo. *Chrysomya albiceps* (Weidemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) estão entre as espécies de dípteros necrófagos mais encontrados em locais de crime no Brasil. A correta identificação do espécime, ou fragmento deste, coletado em um local de crime é etapa fundamental para o emprego da entomologia forense em investigações criminais. Nesse estudo, avaliamos a possibilidade de identificação dessas três espécies de califorídeos pela morfologia alar, por meio de análises de morfometria geométrica. Foram analisadas as asas direitas de 139 espécimes, 55 *C. albiceps*, 42 *C. megacephala* e 42 *H. segmentaria*, por meio de análises de variáveis canônicas e análises discriminantes. Das 278 comparações par a par, apenas 6 seis erros de identificação foram registrados (2,1%), enquanto 22 (7,9%) erros de classificação para o teste de validação cruzada, o que aponta para um alto índice de confiabilidade da técnica. Mais estudos são necessários para a validação dessa técnica para seu uso na prática forense.

Palavras-Chave: Análise Discriminante; Entomologia Forense; Identificação; Moscas; Taxonomia.

Wing geometric morphometry as a tool for the identification of three calliphorid (Diptera: Calliphoridae) species at the Brazilian Cerrado

Abstract. *Chrysomya albiceps* (Weidemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) are among the fly species of forensic interest commonly found in Brazil. The correct identification of the specimen, or fragment of a specimen, collected at a crime scene is a crucial step for the use of forensic entomology as a tool in criminal investigations. In this study, the discrimination of these three species of Calliphoridae based on wing morphology, by means of geometric morphometric analysis was investigated. Right wings of 139 specimens were analyzed, 55 *C. albiceps*, 42 *C. megacephala* e 42 *H. segmentaria*, through Canonical Variate Analysis, Discriminant Analysis and Cross Validation tests. Of the 278 pairwise comparison, six misidentifications were recorded for discriminant analysis (2.1%), while 22 (7.9 %) misclassification for cross-validation tests, which points to a high technical reliability index. More studies are needed to validate this technique for use in forensic practice.

Keywords: Forensic Entomology; Flies; Fly Identification; Discriminant Analysis; Taxonomy.

Entomologia forense é a análise de vestígios entomológicos em situações que demandem a atenção dos órgãos estatais de aplicação da lei (AMENDT *et al.*, 2007). A tarefa mais frequente para os profissionais dessa área é o cálculo do intervalo pós morte mínimo (IPM_{min}), o tempo mínimo transcorrido entre uma morte e a descoberta de um corpo (CATTS 1992).

Existem diversas formas de se estimar o IPM_{min}, geralmente associadas aos eventos e processos naturais que se desenrolam ao longo do processo de decomposição, tais como *rigor mortis* e formação dos livores cadavéricos. Contudo, esses métodos podem se tornar imprecisos após as primeiras 72 horas do processo de decomposição. Nessas situações a interpretação de vestígios entomológicos pode ser a melhor ferramenta para a determinação do IPM_{min} (AMENDT *et al.* 2011).

Os métodos de estimativa de IPM_{min} mais comumente utilizados se baseiam no tempo de desenvolvimento pós embrionário de espécies de insetos necrófagos, geralmente dípteros e coleópteros, que usam carcaças animais como sítio de alimentação e/ou reprodução.

Os califorídeos (Diptera: Calliphoridae) estão entre os primeiros insetos a acessar uma carcaça após a sua exposição, atraídos pelos odores produzidos nos estágios iniciais do processo de decomposição. Isso faz com que esse grupo de moscas seja uma importante classe de evidências em investigações de homicídios (SMITH 1986; WALL & WARNES 1994). Vestígios entomológicos podem ainda servir como indícios de movimentação de cadáveres e de localização de regiões produtoras de drogas (PUJOL-LUZ *et al.* 2008; MACEDO *et al.* 2013).

Edited by:

William Costa Rodrigues

Article History:

Received: 09.ix.2016

Accepted: 27.i.2017

✉ Corresponding author:

Marcos Patrício Macedo

✉ marcos.patricio@gmail.com

🌐 No ORCID record

Funding agencies:

↪ Without funding declared

Em todos esses casos, a correta identificação ao nível de espécie dos espécimes em análise é uma etapa essencial para a realização de uma análise forense de vestígios entomológicos. Em alguns casos, o investigador tem acesso apenas a espécimes mal preservados, ou a fragmentos entomológicos, e caracteres importantes de chaves de identificação não estão presentes, o que pode impossibilitar esse processo ou levar a uma identificação equivocada do espécime. Nesses casos, a identificação da espécie pode ser feita por métodos baseados em sequências de DNA (WELLS & WILLIAMS 2007). Contudo, não há informações sobre sequências específicas para todas as espécies de interesse forense, e a estrutura laboratorial necessária para esse tipo de análises de forma rotineira as tornam inviáveis para alguns laboratórios forenses e de entomologia.

Um método de baixo custo e capaz de identificar espécies a partir da análise de estruturas específicas apenas é a caracterização morfométrica por meio da morfometria geométrica. Essa técnica, aliada a análises multivariadas, é capaz de distinguir entre espécies ou populações de uma mesma espécie (DUJARDIN 2008; HALL *et al.* 2014)

Por meio da morfologia alar é possível distinguir entre espécies do mesmo gênero de califorídeos de interesse forense (VÁSQUEZ & LIRIA 2012) e entre subpopulações de uma mesma espécie desta família (HALL *et al.* 2014). Em imaturos deste grupo, a diferenciação entre diferentes espécies pode ser realizada pela análise das diferenças morfológicas no esqueleto cefalofaríngeo (NÚÑEZ & LIRIA 2016). Contudo, não há estudos que tratem da aplicação dessas ferramentas para os dípteros necrófagos do Cerrado brasileiro.

Assim, o objetivo deste estudo é verificar a possibilidade de se diferenciar entre três das principais espécies de califorídeos necrófagos comumente encontradas no Distrito Federal, *Chrysomya albiceps* (Weidemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) por meio da morfologia alar dessas espécies

MATERIAL E MÉTODOS

As coletas foram realizadas em uma área de floresta de galeria em uma área de baixo nível de antropização no bioma Cerrado, na Fazenda Água Limpa (Universidade de Brasília – 15°56'21.95"S, 47°56'21.71"O), na porção sudoeste do Distrito Federal.

Foram realizadas três coletas no período de 31/01/2015 a 13/02/2015 com o uso carcaças de porcos natimortos, de pequeno porte, com massa aproximada de um quilograma. Os animais foram expostos em um anteparo plástico e protegidos da ação de vertebrados necrófagos por meio de uma tela plástica. As coletas foram realizadas no período matutino, com o uso de um puça entomológico na região em que foram expostas as iscas.

Os espécimes coletados eram transferidos para um tubo falcon de 50 mL com álcool 70% para preservação dos indivíduos e transportados às dependências do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Os espécimes adultos foram identificados com uso das chaves descritas por KOSMANN *et al.* (2013) e MELO (2003) para identificação de califorídeos.

Apenas os indivíduos adultos fêmeas foram selecionados, a fim de se evitar efeitos de dimorfismo sexual. Apesar de não haver relatos de dimorfismo sexual na morfologia alar para essas espécies, a ocorrência dessas diferenças é bem conhecida para dípteros, tendo sido documentada para *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) (ESPRA *et al.* 2015). De cada um dos indivíduos adultos, a asa direita foi removida com o uso de uma tesoura entomológica e fixada em uma lâmina de vidro com uso de esmalte transparente e coberta com lamínula de vidro.

Subsequentemente, as asas foram fotografadas com uso de um microscópio estereoscópico Leica M205C, software LAS 9.1 e as imagens foram armazenadas em um único diretório para análises.

Foi construída uma biblioteca das imagens das asas com auxílio do software TPSUtil; 13 marcos foram selecionados, de acordo com estudo prévio de VÁSQUEZ & LIRIA (2012) com auxílio do software TPSDig2 (ROHLF 2006). As análises morfométricas foram realizadas pelo software MorphoJ (KLINGENBERG 2011), maiores detalhes a seguir (Figura 1).

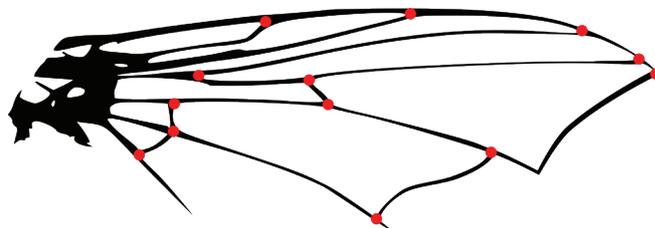


Figura 1. Representação dos 13 marcos anatômicos utilizados no estudo.

Os dados dos marcos anatômicos foram examinados com a realização de uma superimposição Procrustes, seguido pela geração de uma matriz de covariância.

A correção para efeitos de alometria foi feita por meio de uma regressão em que se utilizou a configuração anatômica de cada asa como variável dependente e o tamanho do centroide dessa asa, indicando o tamanho da asa, como variável preditora.

A variação total das configurações anatômicas foi avaliada por meio de uma análise de componentes principais (PCA). E as diferenças entre os grupos (espécies) foram avaliadas por meio de uma análise de variáveis canônicas (CVA) e de três análises discriminantes (DA) e três análises de validação cruzada, uma para cada par de espécies. As análises de comparação (CVA, DA e validação cruzada) foram efetuadas com base nos resíduos da regressão para eliminação dos efeitos alométricos.

RESULTADOS

Foram coletados 204 espécimes de Calliphoridae. Desses, contabilizando apenas as fêmeas registrou-se 55 indivíduos de *C. albiceps*, 42 de *C. megacephala* e 42 de *H. segmentaria*. Foram analisados 139 asas no total.

Após a superimposição Procrustes, uma PCA baseada na matriz de covariância apresentou uma variância de 83,392% para o primeiro componente (PC1) e 5,06% para o segundo (PC2). Noventa e um por cento da variação acumulada concentravam-se nos três primeiros componentes.

A regressão para estimar os efeitos de alometria retornou um índice se Soma de Quadrados (Sum of Squares) de 0,398. Desse total, 0,0490 (12,3%) eram atribuídos à variação no tamanho do centróide, e 0,3488 (87,7%) eram resíduos da regressão, variando independentemente do tamanho do centróide. Testes de permutação contra hipótese nula de independência com 10.000 rodadas apontaram $P < 0,0001$.

A CVA (Figura 2) indicou 91,43% da variância entre grupos na primeira variável canônica (CV1) e 8,57% na segunda (CV2), com distâncias de Mahalanobis entre espécies de 4,457 para *C. albiceps* – *C. megacephala*, ($p < 0,0001$), 2,932 para *C. albiceps* – *H. segmentaria*, ($p < 0,0001$), e 6,568 para *H. segmentaria* – *C. megacephala*, ($p < 0,0001$). Todos os valores de P para 10.000 rodadas de permutação.

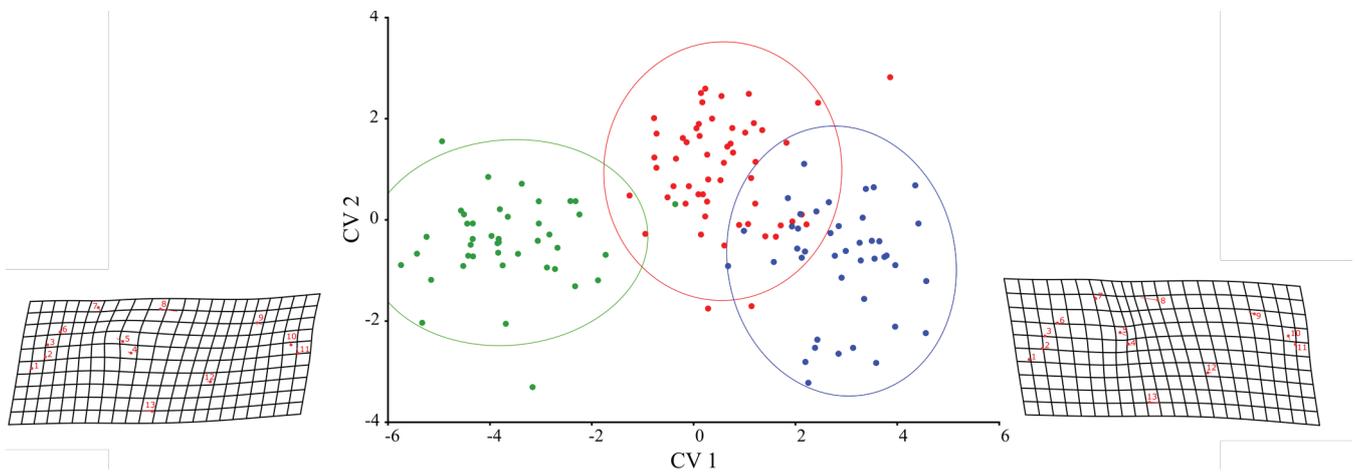


Figura 2. Análise de Variáveis Canônicas com base nos resíduos da regressão linear para se excluir efeitos de alometria. Em verde as amostras de *C. megacephala*, em vermelho as amostras de *C. albiceps*, e em azul as amostras de *H. segmentaria*. As elipses representam intervalo de confiança de 0.95. Os grids de deformação ilustram as mudanças estruturais para a o primeiro eixo de variáveis canônicas.

As análises discriminantes e os testes de validação cruzada realizadas par a par retornaram os resultados expostos na Tabela 1.

DISCUSSÃO

Foram examinadas três espécies de califórídeos necrófagos que ocorrem no Cerrado, duas exóticas e uma nativa. Após as correções para alometria e a análise de variáveis canônicas, a análise de morfometria alar com base nos 13 marcos anatômicos foi suficiente para evidenciar a ocorrência de grupos distintos (Figura 2).

As análises discriminantes par a par tiveram altos índices de resolução, sendo o par com menor percentual de diferenciação *C. albiceps* e *H. segmentaria*, (com 92,7% de acertos). Já para os demais pares os índices de separação chegaram a 100%, o que demonstra a viabilidade desse método para a distinção entre espécies. No total, das 278 comparações, apenas 6 não retornaram a espécie correta do espécime (2,15%), o que é um percentual de erros razoavelmente reduzido para a área. Por outro lado, o índice de retorno correto para os testes de validação cruzada foram menores (92%) (Figura 3) (Tabela 1). Uma melhor discriminação do espécime analisado pode ser possível com análises de mais amostras e com o uso de marcos anatômicos adicionais. Contudo, a seleção de mais marcos anatômicos em

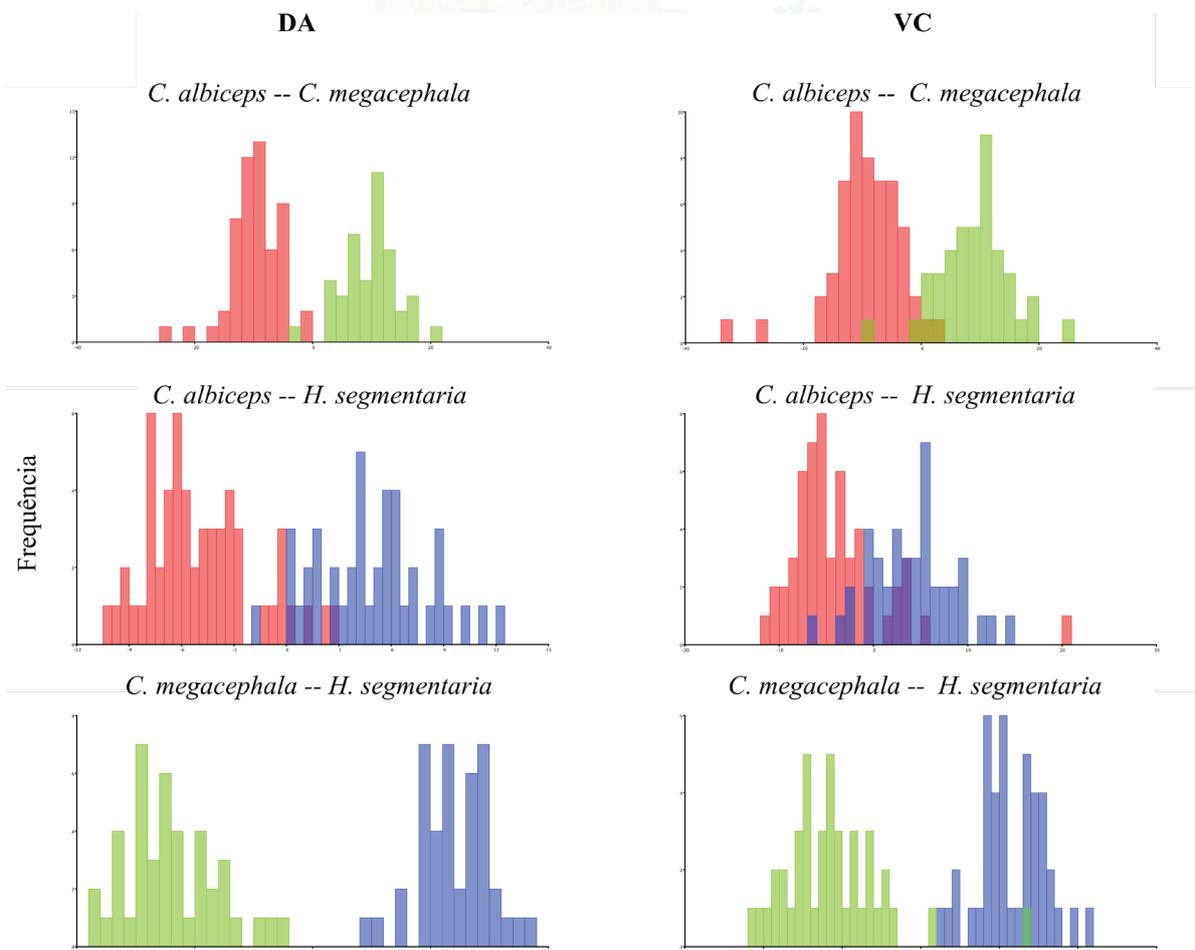


Figura 3. Resultados das Análises Discriminantes (DA) e de Validação Cruzada (VC) par a par de todos os espécimes examinados. Áreas de sobreposição indicam erros de discriminação e de validação cruzada. Em verde as amostras de *C. megacephala*, em vermelho as amostras de *C. albiceps*, e em azul as amostras de *H. segmentaria*. As elipses representam intervalo de confiança de 0.95.

Tabela 01. Resultados das Análises Discriminantes (DA) e de Validação Cruzada (VC). As linhas indicam a espécie à qual pertenciam os espécimes analisados e as colunas indicam os grupos aos quais os espécimes foram atribuídos.

Análise	Espécies	Espécies					
		<i>C. alb</i>	<i>C. meg</i>	<i>C. alb</i>	<i>H. seg</i>	<i>C. meg</i>	<i>H. seg</i>
Análise Discriminante	<i>C. albiceps</i>	55 (100%)	0 (0%)	51 (92,7%)	4 (7,3%)	-	-
	<i>C. megacephala</i>	1 (2,4%)	41 (97,6%)	-	-	42 (100%)	0 (0%)
	<i>H. segmentaria</i>	-	-	1 (2,4%)	41 (97,6%)	0 (0%)	42 (100%)
Validação Cruzada	<i>C. albiceps</i>	53 (100%)	2 (0%)	47 (85,5%)	8 (14,5%)	-	-
	<i>C. megacephala</i>	2 (4,8%)	40 (95,2%)	-	-	40 (95,2%)	2 (4,8%)
	<i>H. segmentaria</i>	-	-	8 (19,1%)	34 (81,9%)	0 (0%)	42 (100%)

um conjunto amostral não muito vasto, pode levar a resultados aparentemente significativos em uma análise discriminante, mesmo que isso não reflita a realidade, por esse motivo, essa abordagem não foi adotada nesse caso.

Das espécies analisadas, duas pertencem ao gênero *Chrysomya* e a outra, ao gênero *Hemilucilia*. As funções discriminantes apresentaram menor índice de acertos para o par *C. albiceps* e *H. segmentaria*, o que não seria esperado em caso de sinal filogenético forte já que essas espécies são mais distantes entre si do que as do gênero *Chrysomya*. Isso reforça o potencial discriminante da técnica.

Em diversas chaves de identificação para Calliphoridae, a análise de cerdas torácicas é um passo importante para o diagnóstico da espécie (RIBEIRO & CARVALHO 1998; WHITWORTH 2006; KOSMANN *et al.* 2013). Esses caracteres demandam um conhecimento aprofundado de anatomia e ainda são consideravelmente frágeis e podem ser danificados facilmente durante a coleta e manipulação dos espécimes (VASQUEZ & LIRIA 2012). Assim, a identificação de espécimes por morfologia alar é uma ferramenta rápida e de baixo custo disponível aos profissionais da área forense.

O uso da morfometria geométrica superou algumas deficiências analíticas da morfometria tradicional. A análise da configuração espacial de marcos anatômicos possibilita o uso de métodos estatísticos mais robustos e confere maior poder discriminante no estudo de populações (ROHLF & MARCUS 1996). Ainda assim, os estudos dessa natureza ainda são escassos na área forense.

Estudos adicionais, com a análise de outras espécies desses gêneros, bem como de outros gêneros de ocorrência registrada para a região Neotropical (*e.g. Cochliomyia*), e também a análise de espécimes adicionais para uma maior robustez estatística desses resultados, são necessários para uma validação da técnica para fins forenses. Ainda assim, os resultados aqui expostos apresentam uma promissora alternativa para a identificação taxonômica de dípteros de interesse forense, com menor custo financeiro e demanda de tempo quando comparados aos métodos de identificação molecular.

REFERÊNCIAS

- Amendt J., C.P. Campobasso, E. Gaudry, C. Reiter, H.N. LeBlanc & M.J.R. Hall, 2007. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *International Journal Legal Medicine*, 121: 90-104. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-006-0086-x>.
- Amendt, J., C.S. Richards, C.P. Campobasso, R. Zehner & M.J.R. Hall, 2011. Forensic entomology: Applications and limitations. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 7: 379-392. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12024-010-9209-2>.
- Catts, E.P., 1992. Problems in estimating the post-mortem interval in death investigations. *Journal Agricultural Entomology*, 9: 245-55.
- Dujardin, J.P., 2008. Morphometrics applied to medical entomology. *Infection, Genetics and Evolution*, 8: 875-890. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.07.011>.
- Espra, A.S., S.R.M. Tabugo, M.A.J. Torres, J.G. Gorospe, M.M.E. Manting & C.g. Demayo, 2015. Describing Dimorphism in Wing Shapes in the Blowfly *Lucilia Sericata* Meigen (Diptera: Calliphoridae) using Geometric Morphometrics. *Advances in Environmental Biology*, 9: 64-70.
- Hall M.J., N. MacLeod & A.H. Wardhana, 2014. Use of wing morphometrics to identify populations of the Old World screwworm fly, *Chrysomya bezziana* (Diptera: Calliphoridae): a preliminary study of the utility of museum specimens. *Acta Tropical*, 138 Suppl: S49-55. DOI: <https://dx.doi.org.br/10.1016/j.actatropica.2014.03.023>.
- Kosmann, C., R.P. Mello, E.S. Harterreiten-Souza & J.R. Pujol-Luz, 2013. A List of Current Valid Blow Fly Names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with Key to the Brazilian Species. *EntomoBrasilis*, 6: 74-85. DOI: <https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v6i1.266>.
- Klingenberg, C.P., 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353-357. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>.
- Macedo, M.P., C. Kosmann & J.R. Pujol-luz, 2013. Origin of samples of Cannabis sativa through insect fragments associated with compacted hemp drug in South America. *Revista Brasileira de Entomologia*, 57: 197-201. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0085-56262013005000008>.
- Mello, R.P., 2003. Chave para identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomologia y Vectores*, 10: 255-268.
- Núñez J.A. & J. Liria, 2016. Cephalopharyngeal geometric morphometrics in three blowfly species (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*; 4: 338-341.
- Pujol-Luz, J.R., L.C. Arantes & R. Constantino, 2008. One hundred years of forensic entomology in Brazil (1908-2008). *Revista Brasileira de Entomologia*, 52: 485-492.
- Ribeiro, P.B. & C.J.B. Carvalho, 1998. Pictorial key to Calliphoridae genera (Diptera) in southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 7: 130-140.
- Rohlf, F.J. & L. Marcus, 1993. A Revolution in Morphometrics. *Trends Ecology Evolution* 8: 129-132.
- Rohlf, F.J., 2006. TpsDig, program for Digitizing landmarks and outline for Geometric morphometric analyses, Version 2.04. Depto Ecol. and Evol., Stony Brook, New York. Disponível em: <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>>.
- Smith K.G.V., 1986. *A Manual of Forensic Entomology*. British Museum (Natural History), London, and Cornell University Press, Ithaca, NY. 205 p.
- Vásquez, M. & J. Liria, 2012. Morfometria geométrica alar para a identificação de *Chrysomya albiceps* y *C. megacephala* (Diptera: Calliphoridae) de Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 60: 1249-1258. DOI: <https://doi.org/10.15517/rbt.v60i3.1776>.

Wells, J.D. & D.W. Williams, 2007. Validation of a DNA-based method for identifying Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae) used in a death investigation. *International Journal of Legal Medicine*, 121: 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00414-005-0056-8>.

Whitworth, T., 2006. Keys to the genera and species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) of America North of Mexico. *Proceedings of Entomological Society of Washington*, 108: 689-725.

Wall, R. & M.L. Warnes, 1994. Responses of the sheep blowfly *Lucilia sericata* to carrion odour and carbon dioxide. *Entomologia experimentalis et applicata* 73: 239-246. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1994.tb01861.x>.

Suggestion citation:

Macedo, M.P., 2017. Morfometria geométrica alar como ferramenta para a identificação de três espécies de califorídeos (Diptera: Calliphoridae) no Cerrado Brasileiro. *EntomoBrasilis*, 10 (1): 09-13.
Available on: [doi:10.12741/ebrasilis.v10i1.655](https://doi.org/10.12741/ebrasilis.v10i1.655)

