UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Desenvolvimento de imaturos e aspectos bionômicos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações em entomologia forense

Mônica Salazar Souza

Rio de Janeiro
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Desenvolvimento de imaturos e aspectos bionômicos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações em entomologia forense

Mônica Salazar Souza

Sob orientação da Professora
Dra. Valéria Magalhães Aguiar

e coorientação da Professora
Dra. Marcia Souto Couri

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: **Biodiversidade Neotropical**.

Rio de Janeiro
Fevereiro de 2017

Souza, Mônica Salazar
S719 Desenvolvimento de imaturos e aspectos bionômicos de Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) e Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações em entomologia forense / Mônica Salazar Souza. -- Rio de Janeiro, 2017.
86 p.

Orientadora: Valéria Magalhães Aguiar.
Coorientador: Marcia Souto Couri.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2017.

1. Desenvolvimento. 2. Morfologia. 3. Imaturos. 4. Mosca varejeira. 5. Entomologia Forense. I. Aguiar, Valéria Magalhães, orient. II. Couri, Marcia Souto, coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Mônica Salazar Souza

Desenvolvimento de imaturos e aspectos bionômicos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações em entomologia forense

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Biológicas**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Biodiversidade Neotropical, aprovada em 20 de fevereiro de 2017.

Banca Examinadora

_____
Profª. Dra. Valéria Magalhães Aguiar (Orientadora)
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/ UNIRIO)

_____
Profª. Dra. Cláudia Soares Santos Lessa
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/ UNIRIO)

_____
Profº. Dr. Elidiomar Ribeiro da Silva
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/ UNIRIO)

_____
Profª. Dra. Luci Boa Nova Coelho
(Universidade Federal do Rio de Janeiro /UFRJ)

_____
Profº. Dr. Carlos Henrique Soares Caetano
(Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/ UNIRIO)

Dedico esta dissertação à Marina Moraes Salazar, minha mãe. Com amor!

Agradecimentos

Ao Pai pela missão designada e pelos benfeitores que escolhidos por Ele, me auxiliaram na caminhada até aqui.

À minha mãe, que embora não entenda muito bem o que faço, apoia e torce incondicionalmente pelo meu sucesso. Por sua preocupação e dedicação à minha criação e formação. Pela contribuição incondicional para a concretização deste projeto pessoal, pelas incontáveis vezes que abdicou dos próprios interesses em prol das minhas necessidades, apoiando-me emocionalmente e financeiramente. Aos meus irmãos Danilo e Maria Luiza pelo carinho e encorajamento nos momentos difíceis.

A todos os professores que passaram pela minha vida e contribuíram para a minha formação. Em especial, a Arlindo Serpa Filho (INMA), grande incentivador e influenciador de todo amor que tenho pela Entomologia, e a Catia Mello-Patiu (UFRJ/ MNRJ) por ter sido minha "mãe científica". Pela confiança e carinho com que me acolheu em seu laboratório desde o primeiro contato, pelo incentivo para que eu desse prosseguimento a minha carreira profissional e pudesse chegar até esse momento, pela generosidade com que me ensinou a trilhar os primeiros passos na minha formação como pesquisadora.

Às minhas orientadoras, Valéria Magalhães Aguiar e Marcia Souto Couri pela generosidade com que me receberam em seus laboratórios, pelos auxílios, críticas e aconselhamentos que foram fundamentais para construção e conclusão desta pesquisa.

À equipe do Laboratório de Estudo de Dípteros da UNIRIO pelos auxílios e trocas de aprendizado.

Ao Prof.º Dr. Jairo Dias Barreira (LIPHAZA/UNIRIO) e ao Prof.º Dr. Guaraci Dias pelas parcerias na fase final.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas da UNIRIO pela oportunidade de aprendizado.

Ao Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (RIOZOO) pela parceria, e em especial, ao biólogo Anderson Mendes Augusto pela receptividade e por gentilmente disponibilizar o acesso para a realização das coletas sempre que necessário.

Aos familiares, amigos e a minha terapeuta Luana que com palavras e gestos de carinho me apoiaram e incentivaram a seguir em frente diante das inúmeras dificuldades.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa construção.

Às moscas, seres fundamentais para realização desta pesquisa.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.” (George Bernard Shaw)

Resumo

SALAZAR-SOUZA, Mônica. **Desenvolvimento de imaturos e aspectos bionômicos de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações em entomologia forense**. 2017. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2017.

A dissertação foi dividida em capítulos. O primeiro avaliou o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* em diferentes tecidos de suíno e bovino (fígado suíno, pulmão suíno, coração suíno, músculo suíno, coração bovino, pulmão bovino e músculo bovino). Foram quatro repetições (60 g dieta/40 larvas 1º estádio de 1ª e 2ª geração) por tratamento, acondicionado em recipiente de 100 mL introduzido em recipiente de 400 mL, mantido sob temperatura controlada à 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Foi observada diferença significativa pela análise de Variância (5% de significância) na duração média do estágio larval (5,2 dias) que foi significativamente maior nas larvas alimentadas em fígado suíno. O estágio pupal apresentou diferença significativa, sendo menor em fígado suíno (3,5 dias). O estágio total diferiu significativamente entre os tratamentos, sendo maior em fígado suíno (8,7 dias). A massa corporal das larvas de 3º estádio diferiu significativamente entre os tratamentos: as larvas alimentadas em pulmão suíno se mostraram significativamente mais pesadas (61,2 mg). A longevidade foi maior em fígado suíno (8,7 dias). A viabilidade larval e pupal se mantiveram acima de 86%, exceto em fígado, que apresentou taxa inferior a 77%. Entre os tratamentos avaliados, pulmão e coração suíno demonstraram melhor desempenho. O segundo capítulo avaliou a influência de músculo bovino e pulmão suíno no desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps*. Foram três repetições (60 g dieta/40 larvas de 1º estádio de 2ª geração) por tratamento, acondicionado em recipiente de 100 mL introduzido em recipiente de 400 mL mantido sob temperatura controlada à 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Foi observada diferença significativa pela análise de Variância (5% de significância) na duração média (dias) do estágio larval. Insetos criados em pulmão suíno apresentaram duração de desenvolvimento significativamente inferior (6,5 dias) comparado a músculo bovino (7,9 dias). Não foi observada diferença significativa entre os tratamentos no estágio pupal, com a fase durando em média 4,2 a 4,4 dias. O desenvolvimento total diferiu significativamente, onde os insetos alimentados em pulmão suíno desenvolveram

em menor tempo (10,9 dias) comparado a músculo bovino (12,2 dias). Larvas alimentadas em pulmão suíno apresentaram massa corporal significativamente mais pesadas (87,2 mg) comparado as larvas alimentadas em músculo bovino. A longevidade foi maior em músculo bovino, com longevidade média de (12,2 dias). A viabilidade larval e pupal se mantiveram acima de 65%. Entre os tratamentos avaliados, pulmão suíno demonstrou melhor desempenho. O terceiro capítulo avaliou o desenvolvimento intrapupal de *C. albiceps*. Um total de 240 larvas de 1º estádio foram transferidas para 254 g de pulmão suíno e mantidas sob temperatura controlada à 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Após o abandono da dieta e empupação, diariamente, durante cinco dias, um total de 84 pupas foram sacrificadas e fotografadas para que as alterações morfológicas oriundas do desenvolvimento das pupas pudessem ser caracterizadas pelas fases: apólise larval-pupal, criptocefálica, fanerocefálica, adulto farado, imago e emergência.

Palavras-chave: mosca varejeira, larva, pupa, morfologia, biologia, desenvolvimento, tecido animal, entomologia forense

Abstract

The dissertation was divided into chapters. The first evaluated the post-embryonic development of *Chrysomya putoria* in different tissues of swine and cattle (swine liver, swine lung, swine heart, swine muscle, bovine heart, bovine lung and bovine muscle). Four replicates (60 g diet / 40 1st instar larvae of 1st and 2nd generation) were prepared by treatment, packed in a 100 mL container, placed in a 400 mL container, kept under controlled temperature at 28°C/day, 26°C/night, RH 70±10% and 12h of photophase. A significant difference was observed in the analysis of Variance (5% significance) in the mean duration of the larval stage (5.2 days), which was significantly higher in the larvae fed on swine liver. The pupal stage had a significant difference, being smaller in swine liver (3.5 days). The total stage differed significantly between treatments, being higher in swine liver (8.7 days). The body mass of the 3rd instar larvae differed significantly between treatments, with larvae feeding on swine lung were significantly heavier (61.2 mg). Longevity was higher in swine liver (8.7 days). The larval and pupal viability remained above 86%, except in liver, which presented a rate lower than 77%. Among the evaluated treatments, lung and swine heart showed better performance. The second chapter evaluated the influence of bovine muscle and swine lung on the post-embryonic

development of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819). Three replicates (60 g diet/ 40 1st instar larvae of 2nd generation) were prepared by treatment, packed in a 100 mL container, placed in a 400 mL container, kept under controlled temperature at 28°C day/ 26°C night, RH 70±10% and 12 h photophase. Significant difference was observed by analysis of Variance (5% significance) in the mean duration (days) of the larval stage. Insects reared in swine lung had significantly less developmental duration (6.5 days) compared to bovine muscle (7.9 days). There was no significant difference between the treatments in the pupal stage, with the phase lasting in average 4.2 to 4.4 days. Total development differed significantly. Insects fed on swine lung developed less time (10.9 days) compared to bovine muscle (12.2 days). Larvae fed swine lung had significantly heavier body mass (87.2mg) compared to larvae fed on bovine muscle. The longevity was higher in bovine muscle. The larval and pupal viability remained above 65%. Among the evaluated treatments, swine lung showed better performance. The third chapter evaluated the intrapupal development of *C. albiceps*. The total of 240 instar larvae were transferred to 254 grams of swine lung and kept under controlled temperature at 28°C day/ 26°C night, RH 70±10% and 12h of photophase. After abandonment of the diet and cushioning, daily, during 5 days the total of 84 pupae were sacrificed and photographed so that the morphological alterations from the pupae development could be characterized by the phases: larval-pupal apolisys, cryptocephalic, phanerocephalic, adult pharate, imago and emergency.

Keywords: blowfly, larvae, pupa, morphology, biology, development, animal tissue, forensic entomology

Lista de Ilustrações

Introdução:

Figura 1: Mapa da atual distribuição de *Chrysomya putoria* (A) e *Chrysomya albiceps* (B) na região Neotropical 15

Capítulo I:

Figura 1: Coleta e criação da colônia estoque. Armadilha aérea instalada no ponto de coleta, localizado em frente às lixeiras (A e B); Isca atrativa utilizada (C); Área de coleta (D); Triagem (E); Gaiola de criação (F); Colônia estoque estabelecida (G) 25

Figura 2: Fase experimental. Postura de estímulo com massa de ovos (A); Eclosão das neolarvas (B); Corte dos tecidos (C); Pesagem dos tecidos (D); Transferência das neolarvas para o tecido (E); Armazenamento dos tecidos em BOD (F); Pesagem das larvas de 3º estádio (G); Armazenamento das larvas em tubo de ensaio (H); Adultos recém emergidos (I; J) 26

Figura 3: Ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emergência de adultos de *Chrysomya putoria* criadas em fígado suíno (T1), pulmão suíno (T2), coração suíno (T3) e músculo suíno (T4), à temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase 31

Figura 4: Ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emegência de *Chrysomya putoria* criadas em coração bovino (T5), pulmão bovino (T6), músculo bovino (T7) à temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase .....….... 31

Capítulo II:

Figura 1: Armadilha confeccionada com garrafas de Polietileno Tereftalato (PET) de 2 L para captura de califorídeos no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro, Brasil. Pote plástico de polipropileno rosqueado (sem tampa) (12 cm de altura x 31 cm de circunferência), perfurado, envolvo com fita isolante preta (A) como base da armadilha. Garrafa cortada em forma de funil invertido introduzida na garrafa de armazenamento (B; D), presa com fita isolante. Tampa do pote (vazada), unida ao funil por cola cianoacrilato, permitindo a conexão por rosqueamento, de ambas as garrafas com a base da armadilha (C). Garrafa de armazenamento (D). A tampa da garrafa de armazenamento foi substituída por tecido vedando a parte superior para facilitar a circulação de ar e diminuir a condensação no interior da garrafa de armazenamento 45

Figura 2: Armadilhas aéreas utilizadas para coleta (A). Isca atrativa (B). Ponto de coleta (C a F). Armadilha recolhida (G). Espécimes selvagens em processo de triagem (H e I). Colônia estoque (J) 46

Figura 3: Músculo suíno usado como estímulo de postura (A). Neolarvas recém emergidas no músculo suíno (B). Pesagem dos tecidos (C). Transferência das neolarvas para dieta (D). Tecidos armazenados em BOD (E). Larvas de 3º estádio (F). Aferição da massa corporal das larvas de 3º estádio (G). Larvas a serem transferedias para tubos de ensaio (H). Adulto recém emergido (I) 47

Figura 4: Ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emergência dos adultos de *Chrysomya albiceps* oriundas de coração músculo bovino (controle) e pulmão suíno (T1) à temperatura de 28ºC/ dia, 26ºC/noite UR 70±10% e 12h de fotofase .....…. 49

Capítulo III:

Figura 1: Desenvolvimento intrapupal de *Chrysomya albiceps* sob temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Pupa de 0h em vista ventral (A); de 4h em vista ventral (B); de 6h em vista frontal (C) e dorsal (D); de 24h em vista ventral (E) e dorsal (F); de 48h em vista ventral (G) e dorsal (H) ...…..…. 66

Figura 2: Desenvolvimento intrapupal de *Chrysomya albiceps* sob temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Pupas de 54h em vista ventral (A) e dorsal (B); de 72h em vista frontal (C) e dorsal (D); de 96h em vista ventral (E), dorsal (F) e lateral (G) 67

Figura 3: Desenvolvimento intrapupal de *Chrysomya albiceps* sob temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Pupas de 99h em vista ventral (H), dorsal (I) e adulto recém emergido em vista lateral (J) 68

Lista de Tabelas

Capítulo I:

Tabela 1: Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* oriundas de tecidos suíno e bovino. Análise de Variância (ANOVA) e pós teste Tukey à temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase 29

Tabela 2: Peso individual (mg) de larvas maduras de *Chrysomya putoria* oriundas de tecidos suíno e bovino. Análise da variância (ANOVA) e pós teste Tukey e razão sexual em temperatura controlada de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase 30

Tabela 3: Razão sexual; Frequência e Análise da variância (ANOVA) com pós teste Tukey das viabilidades larval, pupal e total de *Chrysomya putoria* oriundas de tecidos suíno e bovino em temperatura controlada de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase 32

Capítulo II:

Tabela 1: Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário e viabilidades de acordo com a frequência esperada de larvas, pupas e adultos de *Chrysomya albiceps* oriundas de tecidos bovino e suíno. Análise de Variância (ANOVA) e pós teste Tukey à temperatura de 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase .…..... 49

Tabela 2: Peso individual (mg) de larvas maduras e razão sexual de *Chrysomya albiceps* oriundas de tecidos suíno e bovino. Análise da variância (ANOVA) e pós teste Tukey e razão sexual em temperatura controlada de 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase 50

Capítulo III:

Tabela 1: Comparação entre a cronologia do desenvolvimento intrapupal (em horas) de *Chrysomya albiceps* após a pupariação com a de outros califorídeos e muscóides de interesse forense em diferentes temperaturas e substratos larvais ….....……. 71

Sumário

Resumo vi
Abstract vii
Lista de ilustrações ix
Lista de tabelas xi
Introdução Geral 14
Objetivos 19

Capítulo I - Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) em tecidos suíno e bovino: implicações na entomologia forense 21
1.1 Resumo 21
1.2 Abstract 22
1.3 Introdução 23
1.4 Material e Métodos 24
1.5 Resultados 25
1.6 Discussão 32
1.7 Conclusão 34
1. 8 Referências Bibliográficas 35

Capítulo II - Dietas de origem animal e sua influência no desenvolvimento de larvas de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações na entomologia forense 41
2.1 Resumo 41
2.2 Abstract 42
2.3 Introdução 43
2.4 Material e Métodos 44
2.5 Resultados 48
2.6 Discussão 51
2.7 Conclusão 52
2.8 Referências Bibliográficas 53

Capítulo III - Cronologia do desenvolvimento intrapupal da mosca varejeira *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): aplicação em entomologia forense 59
3.1 Resumo 59
3.2 Abstract 60
3.3 Introdução 61
3.4 Material e Métodos 62
3.5 Resultados 63
3.6 Discussão 68
3.7 Conclusão 72
3.8 Referências Bibliográficas 72
Discussão Geral 77
Conclusões Gerais 79
Referências Bibliográficas Gerais 80

Introdução Geral

A ordem Diptera (*di* = duas, *ptera* = asas) composta por moscas e mosquitos, é uma das quatro ordens megadiversas, até o momento, com cerca de 153.000 espécies descritas mundialmente. Deste total, cerca de 31.000 espécies em 118 famílias são conhecidas na região Neotropical, e aproximadamente 8.700 espécies estão registradas para o Brasil. Talvez seja uma das ordens mais diversificadas em hábitats, presente em ambiente aquático e terrestre, e em hábitos, com espécies fitófagas, predadoras, endoparasitas (de humanos e outros insetos) e saprófitas, contribuindo como uma das mais importantes para os estudos de entomologia forense (Yates et al., 2003; Guimarães & Amorim, 2006; Mello-Patiu, 2007; Carvalho et al., 2012; Favretto et al., 2013).

Os dípteros da família Calliphoridae, também conhecidos como "moscas varejeiras" ou "moscas das carcaças" se desenvolvem por metamorfose completa (holometábolos), compreendendo os estágios de ovo, larva, pupa e adulto (Costa et al., 2006). O adulto se desenvolve encapsulado dentro de um pupário formado a partir da cutícula da larva de terceiro estádio (Denlinger & Zdárek, 1994). Os califorídeos adultos apresentam tamanho que varia de médio a grande (4-16 mm), tendo como característica marcante, a coloração do abdome e tórax, na maioria das vezes, escuro com reflexo metálico azul, verde, violáceo ou cúprico (Carvalho & Mello-Patiu, 2008).

A família Calliphoridae é cosmopolita, composta por mais de 1.000 espécies em 150 gêneros conhecidos, sendo a maioria restrita ao Velho Mundo. A maior riqueza da fauna pertence à região Afrotropical com mais de 300 espécies alocadas em 40 gêneros. A maioria das espécies da família Calliphoridae não é endêmica do Novo Mundo, e a introdução na região Neotropical foi acidental (Shewell, 1993).

Sua organização atual para América do Sul e México, compreende 99 espécies descritas, alocadas em 29 gêneros, distribuídos em 7 subfamílias: Calliphorinae (3 gêneros e 8 espécies), Chrysomyinae (7 gêneros e 27 espécies), Luciliinae (1 gênero e 17 espécies), Mesembrinellinae (9 gêneros e 33 espécies), Polleniinae (1 gênero e 1 espécie), Rhiniinae (1 gênero e 1 espécie) e Toxotarsinae (7 gêneros e 11 espécies) (Kosmann et al., 2013; Cavalcante et al., 2015).

Chrysomya Robineau-Desvoidy, 1830 é um dos sete gêneros alocados na subfamília Chrysomyinae. Atualmente, três espécies Afrotropicais estão descritas para o gênero (*Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *C. megacephala* (Fabricius, 1794) e *C. putoria* (Wiedemann, 1830)) e uma da Oceania (*C. rufifacies* (Macquart, 1843)). As quatro espécies exóticas para a região Neotropical são encontradas no Brasil (Dear,

1985; Vargas & Wood, 2010; Kosmann et al., 2013).

Atualmente *C. putoria* é encontrada em 7 países na região Neotropical (Argentina, Paraguai, Bolívia, Brasil, Peru, Colômbia e Panamá), enquanto *C. albiceps* é encontrada atualmente em 12 países (Uruguai, Argentina, Paraguai, Bolívia, Brasil, Peru, Colômbia, Venezuela, Domínica, Porto Rico, Nicaragua e Guatemala) (Kosmann et al., 2013) (Figura 1).

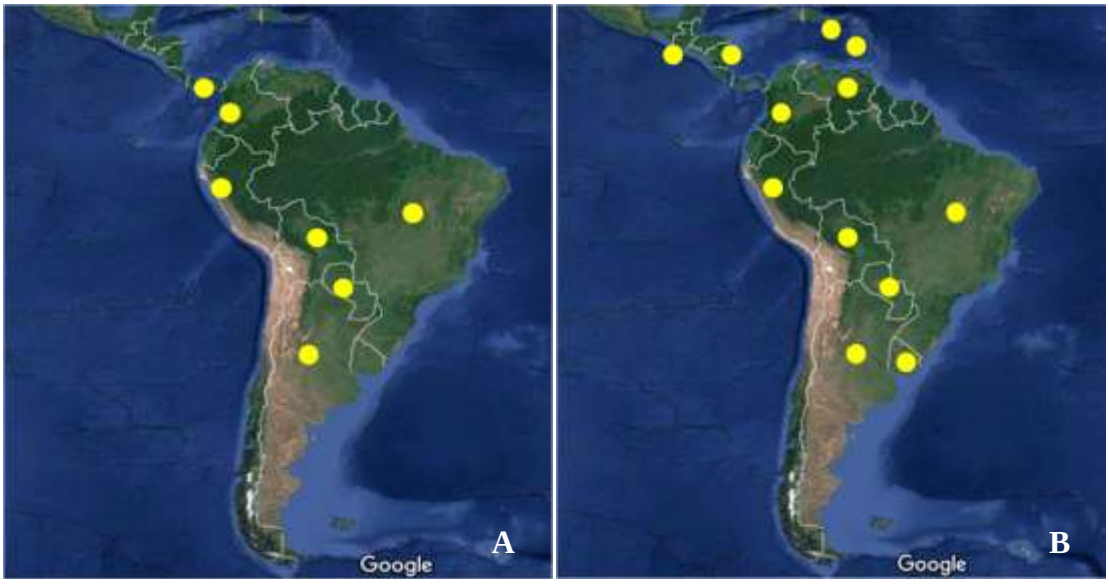

Figura 1: Mapa da atual distribuição de *Chrysomya putoria* (A) e *Chrysomya albiceps* (B) na região Neotropical.

No Brasil, *C. albiceps* e *C. putoria* foram observadas pela primeira vez em área urbana na cidade de São Paulo, e também nos estados do Paraná, Mato Grosso do Sul, Bahia, Maranhão, Para e Santa Catarina entre outubro de 1978 e julho de 1979 (Guimarães et al., 1978; 1979). Em território brasileiro, a dispersão de *C. albiceps* foi mais lenta comparado a *C. putoria* que alcançou 5.000 km após 5 anos de introdução (Prado et al., 1982). Uma das hipóteses desse sucesso, talvez esteja relacionada às diferentes portas de entrada de *C. putoria*, facilitadas pela expansão do comércio aéreo (Gagné, 1981). A lentidão na dispersão de *C. albiceps* poderia estar relacionada à monogenia da espécie e pelo fato de a regulação da razão sexual ser a nível populacional (Ullerich, 1963).

Os califorídeos adultos utilizam diversos substratos para alimentação, oviposição e cópula, sendo vistos inclusive, visitando espécies florais cujo odor exalado pela flor assemelha-se à carne putrefata, como a do gênero *Stapelia* Linnaeus, 1753 (Luna et al., 2014). Outras vezes, vistas no período de floração de espécies leguminosas e frutíferas contribuindo na polinização, assumindo importância agrícola e econômica (Castañeda-

Vildózola et al., 1999; Santos & Teixeira, 2009).

Por possuírem os hábitos saprófago, necrófago e necrobiontófago, as espécies tornaram-se importantes contribuidoras no processo de decomposição de material vegetal e animal (Goff, 2000; Cavalcante et al., 2015). Em contrapartida, o comportamento endófilo, evidenciou negativamente as espécies como potenciais vetoras de bactérias, protozoários e ovos de helmintos, em reforço, a frequente associação nos casos de miíase obrigatória e facultativa (Guimarães et al., 1983; Thyssen et al., 2004; Fares et al., 2005; Ferraz et al., 2010).

Em estudo relacionado ao potencial vetorial de alguns dípteros, Oliveira et al., (2002), encontraram ovos de helmintos no intestino e aderidos à superfície de *C. albiceps* (*Trichostrongylus* sp., *Ascaris* sp., *Trichuris* sp.) e *C. putoria* (*Ascaris* sp., *Toxascaris* sp., *Toxocara* sp., *Trichuris* sp., *Capillaria* sp., *Enterobius vermicularis* Leach, 1853 e *Trichostrongylus* sp.), porém em menor quantidade comparado às demais espécies observadas, sugerindo que a presença de *C. albiceps* e *C. putoria* em fezes, ocorra em menor frequência.

Em revisão de literatura a respeito de dípteros necrófagos da região Neotropical, Alves et al. (2014) revelaram que *C. putoria* ocorre em menor distribuição (países) e diversidade de substratos, locais e biomas brasileiros, comparada a *C. albiceps*, observada utilizando como substratos: cão (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758), cavalo (*Equus ferus caballus* Linnaeus, 1758), coelho doméstico (*Oryctolagus cunniculus* (Linnaeus, 1758)), galinha (*Gallus gallus domesticus* (Linnaeus, 1758)), gato (*Felis silvestris catus* Linnaeus, 1758), geneta (*Genetta genetta* Linnaeus, 1758) humano (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758), porco (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758), raposa vermelha (*Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758)), rato (*Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769)) e vaca (*Bos taurus* Linnaeus, 1758) (Salviano et al., 1996; Salazar, 2006; Salazar-Ortega, 2008; Aballay et al., 2008; Centeio, 2011; Martins et al., 2013). Há relatos da espécie em ambiente aquático (possivelmente colonizando cadáver parcialmente submerso), em ambiente rural, semirural e área urbana, ocupando os biomas da Caatinga, Cerrado, Florestas Amazônica e Atlântica, Pampas, região Árida e Savana, enquanto *C. putoria* foi encontrada em: coelho, humano, porco e rato, em ambiente rural e urbano, ocupando os biomas da Caatinga, Cerrado, Floresta Atlântica e Pampa.

A frequência e abundância de substratos de origem animal visitados por essas espécies está associado à anautogenia das fêmeas. Este comportamento destacou as

espécies como importantes entomo-indicadores forenses. Estudos ecológicos de sucessão de fauna cadavérica destacaram *C. albiceps* como uma das mais numerosas na colonização e maior tempo de permanência no cadáver, sendo atraída pelos gases produzidos nas fases iniciais de decomposição, permanecendo no cadáver em todos os estágios de decomposição, inclusive na fase seca, enquanto *C. putoria* geralmente é encontrada mais tardiamente (Avancini, 1986; Carvalho & Linhares, 2001; Oliveira-Costa & Queiroz, 2007; Cruz et al., 2014).

O tempo de desenvolvimento das formas imaturas no tecido cadavérico tornou-se importante ferramenta para entomologia forense. Através da idade da larva, é possível estimar a quanto tempo o cadáver foi exposto à colonização, possibilitando uma estimativa do cálculo de intervalo pós-morte (IPM) (Andrade et al., 2005; Oliveira & Vasconcelos, 2010; Pinheiro et al., 2012; Kosmann et al., 2011; Oliveira-Costa et al., 2013; Leal et al., 2013; Souza et al., 2014).

No entanto, estudos forenses relacionados ao cálculo de IPM pelo método entomológico apontam que o tempo de desenvolvimento larval e/ou pupal, pode ser reduzido ou aumentado em função de alguns fatores, como: umidade, temperatura ambiente e tipo de órgão ou tecido colonizado em um mesmo cadáver, podendo ocasionar imprecisão no cálculo de IPM (Norris, 1965; Mello et al., 2012; Pinheiro et al., 2012).

Além de absorverem do tecido cadavérico, nutrientes necessários ao seu desenvolvimento, as larvas incorporam toxinas e substâncias químicas (drogas, hormônios e medicamentos) em seu metabolismo, que em alguns casos, podem acelerar o tempo de desenvolvimento dos imaturos, levando o entomologista forense à imprecisão do cálculo de IPM. Por outro lado, o conhecimento de substâncias exógenas no cadáver contribui para a entomotoxicologia na determinação de uma possível causa *mortis* associada à overdose (Ferrari et al., 2008; Carvalho et al., 2012; Ferraz et al., 2014ab).

Devido à especificidade das espécies em certos locais e/ou biomas, a presença de larvas de determinada espécie que normalmente encontrada em ambiente urbano, vista em ambiente florestal, pode contribuir nos casos periciais para comprovação de possível deslocamento do cadáver (Amendt et al., 2004; Baltazar et al., 2011).

O hábito necrobiontófago das larvas sobressaiu à importância de algumas espécies de califorídeos como ferramentas no tratamento de feridas de difícil cicatrização oriundas de úlceras venosas, pós-cirúrgicas, queimaduras, úlceras de pé

diabético, entre outras. Para que possam se alimentar, as larvas liberam enzimas digestivas que dissolvem o tecido necrosado realizando o biodebridamento. Além de contribuir para o processo do debridamento, a terapia larval leva a redução do odor fétido, e os materiais oriundos da excreção da larval (soro, bactérias e neutrófilos) ativam macrófagos que induzem à cicatrização, melhorando a vascularização no local da ferida, e ao crescimento de novo tecido nas feridas de difícil cicatrização (Figueroa et al., 2006; Echeverri et al., 2010; Dallavecchia et al., 2011).

A história mostra que as moscas são referenciadas quanto a sua importância para as ciências forenses desde o antigo Egito, como visto no Papiro de Gizeh 18026:4:14 encontrado em uma múmia com a seguinte inscrição: "*As larvas não se vão transformar em moscas dentro de ti.*" Desde a sua primeira utilização como resolução de um crime de homicídio no século XIII, na China, a utilização do desenvolvimento de imaturos nos casos periciais foi retomada no século XVII, após a estagnação dos estudos forenses na Idade Média, contribuindo com lacunas a respeito de muitas espécies e para um distanciamento entre a medicina legal e os entomologistas, refletindo inclusive, em uma entomologia carente nos estudos da sistemática e biologia de fauna cadavérica (Pujol-Luz et al., 2008; Rebelo et al., 2014).

Embora alguns fatores de interferência no desenvolvimento dos insetos necrófagos sejam conhecidos, devido à especificidade de algumas espécies, ainda existe uma lacuna a respeito do grau de influência relacionada ao tipo de tecido colonizado. Em estudo do desenvolvimento larval de *C. albiceps* Beuter & Mendes (2013) comprovaram que os tecidos utilizados como substrato larval alteraram significativamente a taxa de crescimento larval desta espécie. O mesmo foi observado por Clark et al. (2006) ao estudarem o desenvolvimento de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) em diferentes tecidos.

Tendo vista a utilização das pupas na estimativa de IPM, ensaios relacionados ao desenvolvimento intra-pupal de califorídeos tem sido objeto de investigações recentes no Brasil (Karabey & Sert, 2014; Vairo et al., 2014; Ma et al., 2015; Barros-Cordeiro et al., 2016; Li et al., 2016), incluindo *C. putoria* (Proença et al., 2014). Embora *C. albiceps* e *C. putoria* tenham sido estudadas quanto ao desenvolvimento larval e pupal, ainda carecem informações a respeito da taxa de desenvolvimento destas fases em associação a diferentes tecidos e temperaturas, em especial, *C. albiceps* por apresentar comportamento peculiar entre os Calliphoridae, cujas larvas são predadoras e canibais.

Por isso, se propôs:

a) acompanhar e avaliar o desenvolvimento *C. putoria* em quatro tecidos de suíno (fígado, pulmão, coração e músculo) e em três tecidos de bovino (coração, pulmão e músculo), sob temperatura constante e luminosidade dia/noite;

b) acompanhar e avaliar o desenvolvimento pós-embrionário de *C. albiceps* em dois tecidos de origem animal (músculo bovino e pulmão suíno), sob temperatura constante e luminosidade dia/noite;

c) caracterizar e descrever o desenvolvimento intra-pupal de *C. albiceps* a partir de larvas alimentadas em pulmão suíno, sob temperatura constante e luminosidade dia/noite.

Tendo como critério de avaliação do aspecto bionômico das espécies estudadas nos estudos de pós-embrionário os parâmetros biológicos: taxa de desenvolvimento larval, pupal e total; viabilidades dos estágios de desenvolvimento; razão sexual e taxa de anormalidade de adultos.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE *Chrysomya putoria* (WIEDEMANN, 1830) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE) EM TECIDOS SUÍNO E BOVINO: IMPLICAÇÕES NA ENTOMOLOGIA FORENSE

Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Calliphoridae) em tecidos suíno e bovino: implicações na entomologia forense

Mônica Salazar-Souza[1], Márcia Souto Couri[2,4] & Valéria Magalhães Aguiar[1,3]

[1] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical), Av. Pasteur, 458, Urca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 22.290-240.

[2] Departamento de Entomologia, Laboratório de Diptera, Museu Nacional/UFRJ. Quinta da Boa Vista, s.n., São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[3] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Rua Frei Caneca, 94 - Centro, Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 20211-040.

[4] CNPq fellow

Resumo

Dípteros necrófagos são utilizados na entomologia forense para mensuração do intervalo pós-morte (IPM) em cadáveres. A composição nutricional do tecido pode influenciar retardando ou acelerando a taxa de desenvolvimento das larvas, induzindo as estimativas de IPM imprecisos. Comparou-se o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* em diferentes tecidos de suíno e bovino. Larvas recém eclodidas de *C. putoria* foram transferidas para os tecidos na proporção de 40 neolarvas/ 60 gramas de tecido/tratamento: fígado suíno (T1), pulmão suíno (T2), coração suíno (T3), músculo suíno (T4), coração bovino (T5), pulmão bovino (T6) e músculo bovino (T7), em quatro repetições/ tratamento em câmara climatizada a temperatura de 28ºC dia/ 26ºCnoite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Insetos criados em fígado suíno apresentaram significativamente maior duração do estágio larval (5,2 dias), constatando-se diferença significativa pelo ANOVA entre os demais tratamentos (de 3,5 até 4,5 dias). A duração total em fígado suíno (T1) apresentou desenvolvimento significativamente mais lento (8,7 dias) comparado com os outros tratamentos. Larvas alimentadas com pulmão suíno (T2), apresentaram-se significativamente mais pesadas ($\bar{x}$ = 61.2 mg) em relação a larvas alimentadas em fígado suíno (T1), músculo suíno (T4), pulmão bovino (T6) e músculo

bovino (T7). A viabilidade total revelou índices elevados (acima de 76%) para todos os tratamentos exceto em T1 (66%). Não ocorreu desvio da razão sexual e o percentual de anormalidade se manteve dentro do esperado. Os resultados mostram a necessidade de se levar em consideração o tecido em que desenvolveram as larvas de cadáveres para estudos forenses para maior precisão para o cálculo do IPM.

Palavras-chave: Mosca varejeira, taxa de desenvolvimento, intervalo pós-morte, inseto necrófago

Abstract

Necrophagous diptera are used in forensic entomology to measure the postmortem interval (PMI) of cadavers. PMI estimates based on fly larvae, however, can be inaccurate when larval development is retarded or accelerated by the nutritional composition of the cadaveric tissue. Here we compared the post-embryonic development of *Chrysomya putoria* on different tissues of pig and cow. Newly hatched fly larvae were placed on the following tissues at the following proportions: 40 neolarvae/ 60 grams of tissue/treatment: swine liver (T1), swine lung (T2), swine heart (T3), swine muscle (T4), bovine heart (T5), bovine lung (T6) and bovine muscle (T7). There were four replicates/ treatment. Experiments were conducted in controlled conditions (28ºC day, 26ºC night, RH 70±10% and 12h of photophase). Fly larvae reared on swine liver took longer to develop (5.2 days) than flies reared on other substrates (from 3.5 to 4.5 days), and this difference was significant according to ANOVA tests. The total duration of development on swine liver (T1) was significantly slower (8.7 days) when compared to the other treatments. Larvae reared on swine lungs (T2) were significantly heavier ($\bar{x}$ = 61.2 mg) than larvae reared on swine liver (T1), swine muscle (T4), bovine lung (T6) and bovine muscle (T7). Total larval viability was high (above 76%) in all treatments except for T1 (66%). There was no deviation from the expected sex ratio and the percentage of abnormalities remained within the expected range. These results reinforce the idea that, to achieve greater accuracy in PMI estimates, the type of tissue on which the larvae develops needs to be taken into account.

Keywords: Blowfly, development rate, post-mortem interval, insect necrophagus

Introdução

Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) é um dptero da família Calliphoridae, originário da África, popularmente conhecido como mosca varejeira que teve seu primeiro registro, no Brasil, em 1978 (Guimarães et al., 1978). O comportamento sinantrópico pode ter influenciado na adaptação e dispersão da espécie que atualmente, encontra-se dispersa nos biomas da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pampa. Além do Brasil, sua distribuição geográfica atual, aponta a presença em outros países da América do Sul (Argentina, Bolívia, Colômbia, Paraguai e Peru) e América Central (Panamá) (Mello et al., 2007; Castro et al., 2010; Kosmann et al., 2013; Barbosa et al., 2014).

C. putoria destaca-se em importância médico-sanitária como potencial vetor de patógenos em decorrência de seu hábito alimentar e reprodutivo, sendo encontrada frequentemente em áreas rurais e urbanas, visitando fezes e cadáveres de animais (Furlanetto et al., 1984; Oliveira et al., 2002; Thyssen et al., 2004). As fêmeas adultas utilizam esses substratos para amadurecimento dos ovos, oviposição e desenvolvimento das larvas, contribuindo ativamente no processo de decomposição (Guimarães et al., 1978, Souza & Linhares, 1997; Mulieri et al., 2006; Estrada et al., 2009).

A ação decompositora das larvas de *C. putoria* os torna de elevada importância para a entomologia forense (Amendt et al., 2004; Oliveira-Costa, 2007), com registros deste díptero colonizando cadáveres humanos nas regiões Nordeste (Pernambuco) e Sudeste (Rio de Janeiro) do Brasil (Salviano et al., 1996; Oliveira & Vasconcelos, 2010). Muitas drogas podem gerar efeitos no desenvolvimento de artrópodes de importância forense por estes serem afetados pela ação das mesmas ou de seus metabólitos quando presentes no corpo. Baseado nisto, Ferraz et al., (2014ab; 2016) testaram o desenvolvimento de *C. putoria* utilizando dieta com acréscimo de antibióticos (ampicilina, gentamicina e ciprofloxacina) em diferentes concentrações para estudar a taxa de crescimento das larvas sob efeito destas substâncias.

Para a aplicação da entomologia forense é imprescindível conhecer o desenvolvimento do inseto em laboratório para que possa ser utilizado nos cálculos do IPM. Contudo, a ausência de um substrato artificial que substitua a carne, suprindo as necessidades nutricionais dos imaturos, desta e de outras espécies necrófagas coletadas em cadáveres (Estrada et al., 2009), reforça a necessidade de estudos a respeito do desenvolvimento destes imaturos, utilizando a carne como substrato, sob condições de laboratório, simulando variações de temperatura e luminosidade, contribuindo com dados importantes para

entomologia forense (Rabêlo et al., 2011). As características organolépticas da carne bovina, aliadas aos hábitos alimentar e reprodutivo dos dípteros necrófagos foram determinantes para que Ullyett (1950) e Marckenko (1985) destacassem em seus estudos a preferência pela carne bovina como substrato para suas criações em laboratório.

Por outro lado, utilizado como modelo experimental desde 1540, devido, principalmente, às semelhanças fisiológicas com as do homem (Swinddle, 1994; Mariano, 2003), o porco doméstico, *Sus scrofa domesticus* Linnaeus, 1758, é comumente utilizado como substrato nos estudos de sucessão ecológica de entomofauna sapronecrófaga, que na maioria das vezes, relataram a presença de imaturos de *C. putoria* colonizando tecidos (Rosa et al., 2009; Biavati et al., 2010; Oliveira-Costa et al., 2013; Cruz et al., 2014; Cavalcante et al., 2015). Norris (1965) já referia que a colonização em diferentes tecidos e/ou vísceras, pode alterar o desenvolvimento de imaturos de insetos sapronecrófagos. O que foi comprovado por Clarck et al., (2006) e Beuter et al., (2013), ao testarem diferentes tecidos de suíno, no desenvolvimento de duas espécies de Calliphoridae, *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), respectivamente, observaram alterações significativas na duração dos estágios de desenvolvimento.

Diante disto, esta pesquisa pretende contribuir com dados para as ciências forenses, estudando o desenvolvimento pós-embrionário de *C. putoria* em tecidos de suíno e bovino (coração, fígado, pulmão e músculo) avaliando-se o ganho de massa corporal dos imaturos, a duração e viabilidades dos estágios de desenvolvimento das fases de larva, pupa e total (de neolarvas a adultos), razão sexual e anormalidade dos adultos.

Material e Métodos

Coleta e criação da colônia estoque. Adultos de Calliphoridae foram capturados por meio de duas armadilhas aéreas, confeccionadas com garrafas de Polietileno Tereftalato (PET) de 2 litros, modificadas do modelo Mello et al., (2007), sendo utilizado 200 gramas de sardinha fresca como isca atrativa em cada armadilha. As armadilhas foram instaladas em uma árvore próxima às lixeiras (22º54’20,9”S, 043º13’45,8”W) no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro, localizado no Parque da Quinta da Boa Vista, s/n, São Cristóvão, Rio de Janeiro, Brasil, onde permaneceram por 48 horas (Figura 1 A a D). Após esse período foram retiradas e transportadas para o Laboratório de Estudo de Dípteros (LED/UNIRIO) do Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro para início do estudo.

No LED/UNIRIO, os espécimes foram expostos por cerca de dois minutos a uma temperatura de -15ºC para diminuir a atividade metabólica, e realização do processo de

identificação com auxílio de microscópio estereoscópio e chave taxonômica de Mello (2003). Os adultos de *C. putoria* foram mantidos em gaiolas de criação de polipropileno (45 cm x 30 cm x 20 cm), alimentados diariamente com mel a 50%, H_2O e proteína (moela de frango) para o estabelecimento da colônia estoque (Figura 1 E a G).

Figura 1: Coleta e criação da colônia estoque. Armadilha aérea instalada no ponto de coleta, localizado em frente às lixeiras (A e B); Isca atrativa utilizada (C); Área de coleta (D); Triagem (E); Gaiola de criação (F); Colônia estoque estabelecida (G).

Fase experimental. O experimento teve início quando a massa de ovos depositada na proteína animal (moela de frango) que serviu para estímulo de postura foi retirada das gaiolas de *C. putoria* (Figura 2 A). Os ovos permaneceram na proteína até a eclosão das neolarvas (https://youtu.be/oOSHRVzDYyw) (Figura 2 B). Larvas recém eclodidas (neolarvas) das gerações G1 e G2 foram transferidas para tecidos de suíno e bovino, previamente descongelados por 16 horas em temperatura ambiente, cortados em cubos de aproximadamente 2 cm^3, na proporção de 40 neolarvas para 60 gramas de tecido animal para cada tratamento: fígado suíno (T1); pulmão suíno (T2); coração suíno (T3) e músculo suíno (T4); coração bovino (T5); pulmão bovino (T6) e músculo bovino (T7), em quatro repetições para cada tratamento, totalizando 1120 larvas de 1º estádio (Figura 2 C a E).

Cada 60 gramas de tecido foi acondicionado em recipiente de poliestireno de 100 mL, introduzido em recipiente de poliestireno de 400 mL, previamente forrados com maravalha

esterilizada e cobertos por tecido de náilon, preso com elástico. Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada (BOD) a 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12 horas de fotofase iniciando às 6 horas, com observação dos parâmetros biológicos a cada 12 horas (Figura 2 F).

À medida que as larvas de 3º estádio (L3) abandonaram a dieta, foram separadas em lotes de cinco, registrando-se a massa corporal (gramas) em balança digital semianalítica, sob placa de Petri, e em seguida, armazenadas em tubos de ensaio contendo maravalha esterilizada, cobertos com tecido de náilon presos com elástico e mantidos na câmara climatizada até a emergência do adulto (Figura 2 G a J).

Figura 2: Fase experimental. Postura de estímulo com massa de ovos (A); Eclosão das neolarvas (B); Corte dos tecidos (C); Pesagem dos tecidos (D); Transferência das neolarvas para o tecido (E); Armazenamento dos tecidos em BOD (F); Pesagem das larvas de 3º estádio (G); Armazenamento das larvas em tubo de ensaio (H); Adultos recém emergidos (I; J).

Parâmetros biológicos e análise estatística. Para avaliar o desenvolvimento dos insetos em cada tecido animal foram utilizados os parâmetros: massa corporal das larvas maduras, duração e viabilidades dos estágios larval, pupal e de neolarvas a adulto, anormalidade dos adultos, ritmo de abandono de larvas da dieta, de pupariação e de emergência e razão sexual. Os valores de todas as médias foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) (um critério) e comparadas entre si pelo pós teste Tukey (p = 0,05). O desvio padrão e valores de intervalo entre as médias foram obtidos por estatística descritiva de

dados quantitativos. Os valores de razão sexual foram calculados utilizando a fórmula: $rs = \frac{F}{F+M}$ (rs = razão sexual, F = fêmeas, M = machos), a fim de obter a proporção esperada 1:1 (= 0,50) e a normalidade, de acordo com a frequência esperada (%).

Resultados

No confronto entre os tratamentos de suíno e bovino, observou-se que a fase larval apresentou diferença significativa na duração média (dias) de desenvolvimento (F = 5,86; p = 0,0013) entre o T1 (fígado suíno) e os demais tratamentos. Insetos criados em fígado suíno apresentaram o maior intervalo individual médio na fase de abandono larval (5,2 dias), constatando-se diferença significativa entre os demais tratamentos que levaram em média de 4,0 a 4,5 dias para o abandono total das dietas (Tabela 1).

A fase pupal também apresentou diferença significativa na duração média (dias) entre os tratamentos de suíno e bovino (F = 5,28; p = 0,0021). Fígado suíno (T1) apresentou estágio pupal significativamente menor (3,5 dias), comparado com todos os tratamentos de origem bovina (T5- coração bovino, T6- pulmão bovino e T7- músculo bovino). Verificou-se que músculo suíno (T4) e músculo bovino (T7) também apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 1).

Da mesma forma, a duração total (neolarvas a emergência dos adultos) em fígado suíno (T1) apresentou desenvolvimento significativamente mais lento, onde os insetos levaram em média 8,7 dias para completarem o seu desenvolvimento, comparado com os outros tratamentos avaliados (T2, T3, T4, T5, T6 e T7), que não apresentaram diferença significativa entre si, onde observou-se a média de emergência de adultos entre 7,6 a 8,0 dias de desenvolvimento (Tabela 1).

Quanto ao peso individual médio das larvas maduras (mg) foi observado diferença significativa entre os tecidos de suíno e bovino (F = 9,62; p = 0,0001) (Tabela 2). Larvas alimentadas com pulmão suíno (T2), apresentaram-se em média, significativamente mais pesadas ($\bar{x}$ = 61,2 mg) em relação a larvas alimentadas em fígado suíno (T1), músculo suíno (T4), pulmão bovino (T6) e músculo bovino (T7) (Tabela 2). Os insetos apresentaram massa corporal significativamente reduzida ($\bar{x}$ = 40,1 mg) quando alimentados com fígado suíno (T1) em relação a coração suíno (T3), pulmão bovino (T6) e músculo bovino (T7). O desenvolvimento dos insetos em coração suíno (T3) apresentou significativamente maior ganho de massa corpórea em relação fígado suíno (T1) e músculo suíno (T4), e de músculo bovino (T7). Músculo de suíno (T4), por outro lado, gerou indivíduos com reduzida massa

em relação a pulmão suíno (T2) e coração suíno (T3) (Tabela 2).

O ritmo de abandono de larvas maduras da dieta, pupariação e emergência dos adultos de *C. putoria* alimentadas nos tecidos de suíno e bovino estão representados nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Em suíno, o pico de abandono de larvas maduras da dieta ocorreu no 3º dia para os insetos alimentados com pulmão (T2), coração (T3) e músculo (T4), no entanto, insetos criados em fígado (T1) apresentaram pico de abandono posterior, no 4º dia (Figura 3).

A pupariação ficou compreendida entre o 4º e 8º dias. Como consequência do retardo no abandono de larvas no T1 (fígado suíno) observou-se pico de pupariação posterior, no 5º dia, para insetos criados neste tecido quando comparados com insetos criados em pulmão suíno (T2), coração suíno (T3) e músculo suíno (T4), que apresentaram pico no 4º dia (Figura 3). A emergência dos adultos teve início no 7º dia e se manteve até o 13º dia. O pico foi observado no 8º dia para todos os tratamentos, com exceção do T1 (fígado) cujos insetos emergiram em maior número no 8º e 9º dias (Figura 3).

Em bovino, a maioria das larvas abandonou a dieta no 3º e 4º dias de desenvolvimento em todos os tecidos estudados (Figura 4). A pupariação de todos os insetos nos diferentes tratamentos ocorreu entre o 4º e 7º dia, com pico no 4º dia (Figura 4). Todos adultos emergiram dos tratamentos de bovino entre o 7º e 10º dia, observando-se pico de emergência no 8º dia (Figura 4).

As taxas de viabilidade larval e pupal foram elevadas (acima de 86%) em todos os tratamentos avaliados (T2, T3, T4, T5 e T6), exceto no T1 (fígado de suíno) apresentando-se inferior (77%). Da mesma forma, a viabilidade total também se mostrou com índices elevados (acima de 76%) para todos os tratamentos com exceção do T1 onde 66% das larvas desenvolveram até adultos (Tabela 3).

A razão sexual se manteve próximo do esperado quase todos os tratamentos (proporção 1:1), com excessão de músculo suíno (T4). Não foram observados insetos anormais, isto é, com qualquer deformidade morfológica, quando estes foram criados em tecido bovino, bem como, em fígado suíno. Nos tratamentos de suíno, o percentual de anormalidade se manteve em 1%, porém considerado dentro do esperado (Tabela 3).

Tabela 1: Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya putoria* oriundas de tecidos suíno e bovino. Análise de Variância (ANOVA) e pós teste Tukey à temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase.

				***p* = valor de significância (Tukey)**						
	Tratamento	$\bar{x}\pm\sigma$	**I.V.**	**T1(FS)**	**T2(PS)**	**T3(CS)**	**T4(MS)**	**T5(CB)**	**T6(PB)**	**T7(MB)**
Fase larval	T1(FS)	5,2 ± 0,82	3 - 10	-	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,05
	T2(PS)	4,0 ± 0,04	3 - 6	0,01	-	ns	ns	ns	ns	ns
	T3(CS)	4,0 ± 0,00	3 - 7	0,01	ns	-	ns	ns	ns	ns
	T4(MS)	4,3 ± 0,24	3 - 7	0,05	ns	ns	-	ns	ns	ns
	T5(CB)	4,2 ± 0,20	3 - 7	0,01	ns	ns	ns	-	ns	ns
	T6(PB)	4,2 ± 0,13	3 - 6	0,01	ns	ns	ns	ns	-	ns
	T7(MB)	4,5 ± 0,42	3 -5	0,01	ns	ns	ns	ns	ns	-
Fase pupal	T1(FS)	3,5 ± 0,39	4 - 11	-	ns	ns	ns	0,05	0,05	0,01
	T2(PS)	3,9 ± 0,08	4 - 7	ns	-	ns	ns	ns	ns	ns
	T3(CS)	3,9 ± 0,25	4 - 8	ns	ns	-	ns	ns	ns	ns
	T4(MS)	3,8 ± 0,17	4 - 8	ns	ns	ns	-	ns	ns	0,05
	T5(CB)	3,6 ± 0,30	4 - 7	0,05	ns	ns	ns	-	ns	ns
	T6(PB)	3,7 ± 0,12	4 - 7	0,05	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	T7(MB)	3,7 ± 0,50	4 - 6	0,01	ns	ns	-	ns	ns	-
Duração total	T1(FS)	8,7 ± 0,42	8 - 13	-	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
	T2(PS)	8,0 ± 0,06	7 -11	0,01	-	ns	ns	ns	ns	ns
	T3(CS)	8,0 ± 0,00	7 - 9	0,01	ns	-	ns	ns	ns	ns
	T4(MS)	8,0 ± 0,13	7 - 11	0,01	ns	ns	-	ns	ns	ns
	T5(CB)	7,6 ± 0,30	7 - 8	0,01	ns	ns	ns	-	ns	ns
	T6(PB)	7,7 ± 0,11	7 - 10	0,01	ns	ns	ns	ns	-	ns
	T7(MB)	8,0 ± 0,02	7 -10	0,01	ns	ns	ns	ns	ns	-

$\bar{x}$= média dos dias; σ = desvio padrão; I.V**.** = intervalo de variação (mínimo e máximo de duração em dias nos estágios). Tratamentos = T1(FS) (fígado suíno); T2(FS) (coração suíno); T3(PS) (pulmão suíno); T4(MS) (músculo suíno); T5(CB) (coração bovino); T6(PB) (pulmão bovino) e T7(MB) (músculo bovino).

Tabela 2: Peso individual (mg) de larvas maduras de *Chrysomya putoria* oriundas de tecidos suíno e bovino. Análise da variância (ANOVA) e pós teste Tukey e razão sexual em temperatura controlada de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase.

Tratamento	**Peso individual médio (mg) ± *σ***	**I.V.**	***p* = valor de significância (Tukey)**						
			T1(FS)	**T2(PS)**	**T3(CS)**	**T4(MS)**	**T5(CB)**	**T6(PB)**	**T7(MB)**
T1(FS)	40,1 ± 0,002	0,038-0,042	-	0,01	0,01	ns	0,05	ns	ns
T2(PS)	61,2 ± 0,005	0,055-0,065	0,01	-	ns	0,01	ns	0,05	0,01
T3(CS)	58,7 ± 0,007	0,051-0,067	0,01	ns	-	0,05	ns	ns	0,05
T4(MS)	47,6 ± 0,007	0,043-0,057	ns	0,01	0,05	-	ns	ns	ns
T5(CB)	51,7 ± 0,002	0,050-0,054	0,05	ns	ns	ns	-	ns	ns
T6(PB)	50,2 ± 0,005	0,046-0,057	ns	0,05	0,05	ns	ns	-	ns
T7(MB)	46,5 ± 0,002	0,044-0,048	ns	0,01	0,01	ns	ns	ns	-

σ= desvio padrão; I.V. = intervalo de variação (mínimo e máximo). Tratamentos = T1(FS) (fígado suíno); T2(CS) (coração suíno); T3(FS) (pulmão suíno); T4(MS) (músculo suíno); T5(CB) (coração bovino); T6(PB) (pulmão bovino) e T7(MB) (músculo bovino).

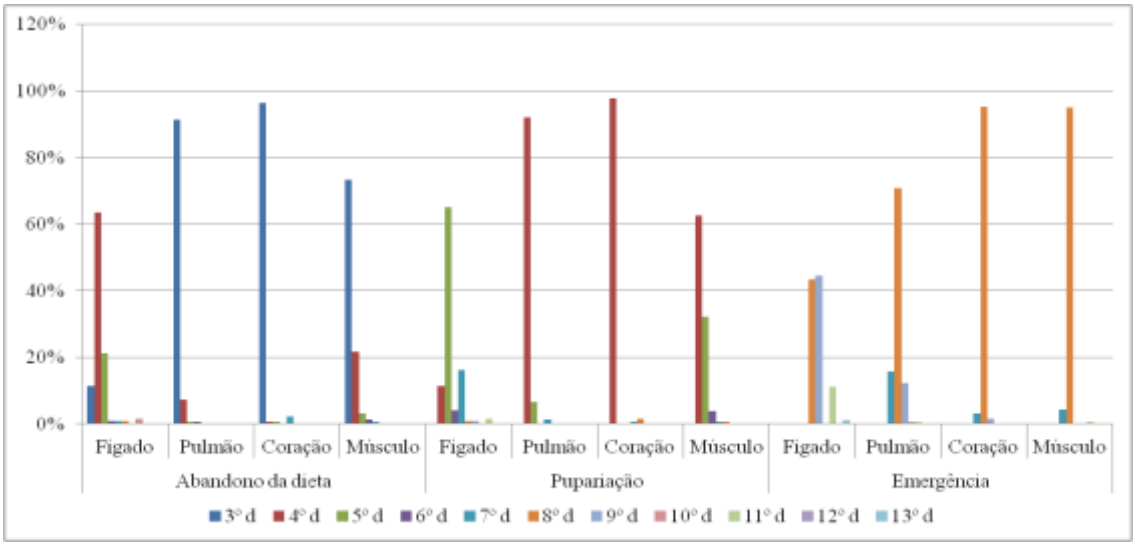

Figura 3: Ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emergência de adultos de *Chrysomya putoria* criadas em fígado suíno (T1), pulmão suíno (T2), coração suíno (T3) e músculo suíno (T4), à temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase.

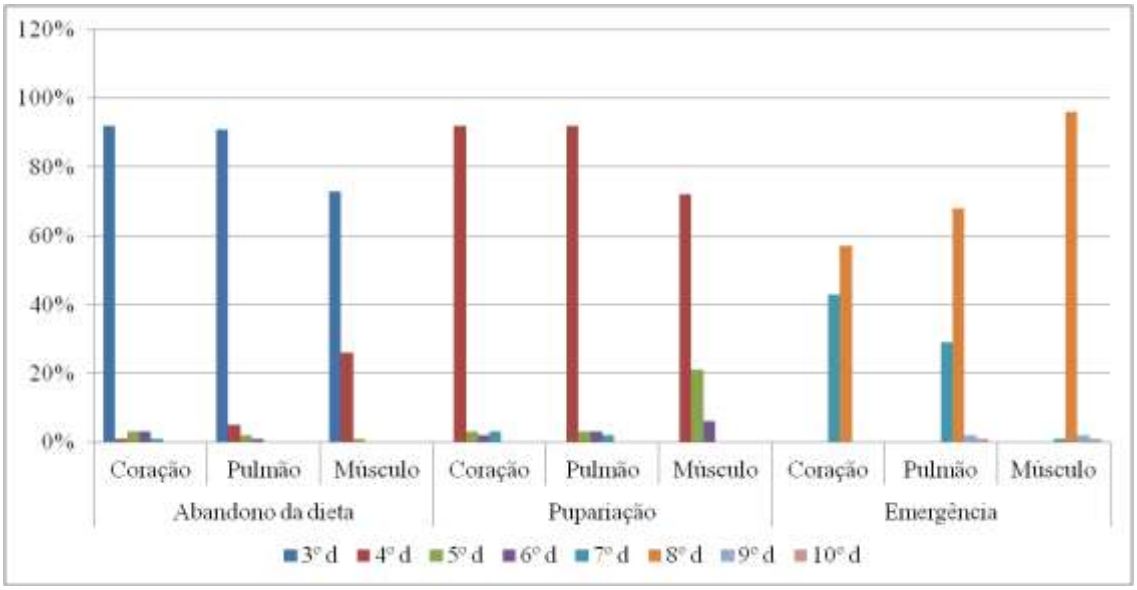

Figura 4: Ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emegência de *Chrysomya putoria* criadas em coração bovino (T5), pulmão bovino (T6), músculo bovino (T7) à temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase.

Tabela 3: Razão sexual; Frequência e Análise da variância (ANOVA) com pós teste Tukey das viabilidades larval, pupal e total de *Chrysomya putoria* oriundas de tecidos suíno e bovino em temperatura controlada de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase.

Tratamentos	Viabilidade			Razão sexual	% Normalidade
	% larval	% pupal	% total		
T1(FS)	77a	77a	62a	0,58	100
T2(PS)	94b	94b	92b	0,46	99
T3(CS)	87a	86a	78a	0,52	99
T4(MS)	98c	97c	87c	0,39	99
T5(CB)	89a	89a	76a	0,55	100
T6(PB)	94d	94d	78a	0,51	100
T7(MB)	89a	89e	83d	0,46	100

*Razão sexual calculada pela fórmula: $rs = \frac{F}{F+M}$. **Percentuais de viabilidade com letras diferentes, diferem significativamente entre si e com letras iguais não diferem significativamente pelo pós teste Tukey.

Discussão

O ritmo de abandono de larvas de *C. putoria* maduras da dieta mostrou que as larvas alimentadas em fígado suíno (T1) foram mais lentas no desenvolvimento quando comparadas a todos os outros tratamentos, provavelmente a baixa velocidade refletiu em uma redução da massa corporal. Por outro lado, larvas alimentadas em outros tecidos de suíno e bovino desenvolveram em menor tempo, e em T2 (pulmão suíno), T3 (coração suíno) e T5 (coração bovino) obtiveram significativamente um maior ganho de massa corporal comparada àquelas originadas do fígado suíno (T1), corroborando com Ribeiro & Milward-de-Azevedo (1997) ao afirmarem que velocidade do desenvolvimento estaria associada a uma maior taxa de assimilação de nutrientes e refletida no aumento de peso.

Segundo dados fornecidos pelo Departamento de Informática e Saúde da Escola Paulista de Medicina (DISEPM 2016), cada 100 g de fígado bovino apresenta em sua composição química: água (70,81 g), calorias (135 Kcal), proteína (20,36 g) e gorduras totais (3,63 g), além de textura, dureza e homogeneidade considerados por Parra (2001) como essenciais para nutrir as larvas. Contudo, convém ressaltar e considerar a atuação do fígado como órgão filtrador de impurezas e toxinas transportadas pelo sangue. Desta forma, o

desenvolvimento das larvas poderia estar suscetível à influência de eventuais resíduos de toxinas (Estrada et al., 2009), o que provavelmente poderia explicar uma desaceleração do desenvolvimento dos insetos em fígado suíno (T1).

Considerando tais resultados em uma determinação do IPM, pela entomologia forense, utilizando como método, o desenvolvimento fisiológico (Oliveira-Costa, 2007), o contraste observado neste estudo, na fase larval, onde as larvas criadas no fígado suíno apresentaram um desenvolvimento mais lento, poderiam induzir a uma imprecisão do cálculo. Introna et al., (2001) e Estrada et al., (2009) sublinharam em seus estudos, semelhante observação, de que a presença de certas substâncias como hormônios, drogas ou seus metabólitos nos tecidos pode influenciar o desenvolvimento de insetos necrófagos que os colonizam, e seus efeitos poderiam induzir a uma imprecisão de sua idade e consequentemente da estimativa do IPM.

Na avaliação do desempenho das dietas, Ribeiro & Milward-de-Azevedo (1997) e Barbosa et al., (2004) destacaram a importância da dieta de criação das matrizes das larvas e o efeito materno. Assim, convém consideramos qualquer interferência do efeito materno no consumo e/ou assimilação de nutrientes, resultando em uma redução de peso ou viabilidades dos insetos adultos. No presente estudo, apesar das matrizes terem sido criadas em moela putrefata, considerou-se que todos os tratamentos avaliados estiveram sob a mesma influência, não interferindo nos resultados encontrados.

A fim de evitar que a densidade influenciasse na avaliação da eficiência da dieta, induzindo ao abandono precoce por falta de nutrientes e/ou excesso de população, ou ainda, que a atividade metabólica das larvas resultasse em alterações químicas no substrato, a quantidade de carne nos tratamentos foi superior a proporção recomendada por Aguiar-Coelho et al., (1995) de 1 larva/ 1 grama de tecido, considerada a densidade relativa ideal para criação de diferentes califorídeos. No presente estudo, foram utilizadas 40 neolarvas para 60g de dieta, neste caso, a normalidade de 100% dos insetos na maioria dos tratamentos pode indicar que a densidade da dieta, bem como os outros parâmetros físicos e químicos dos tecidos foram adequados para o desenvolvimento das larvas.

Os valores de peso médio individual significativamente menor observado no T1 (fígado suíno) (40,1 mg), não impediu que as larvas maduras originassem adultos, no entanto, observou-se uma diminuição da viabilidade total com desenvolvimento de 62% dos insetos. Resultados diferentes foram encontrados por Queiroz & Milward-de-Azevedo (1991) ao estudarem o desenvolvimento de *C. albiceps* em carne equina a 27ºC, observaram que larvas maduras com peso entre 38-42 mg pupariaram, mas não originariam adultos, e Levot et al.,

(1979) ao estudarem desenvolvimento em fígado bovino de alguns sarcofagídeos e califorídeos dentre eles *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) e *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842), ambos Diptera, Calliphoridae a 27ºC/28°C, observaram que larvas maduras com peso mínimo de 40,2 mg não pupariaram. Desta forma, embora no presente estudo tenha sido observado menor viabilidade na fase adulta, o percentual obtido em fígado suíno (T1), o baixo ganho de massa corporal 40,1 mg reforça que houve assimilação dos nutrientes na fase larval suficiente para originar adultos viáveis.

Outros estudos avaliaram a influência de carne de bovino e suíno em desenvolvimento pós-embrionários e obtiveram resultados próximos aos apresentados neste estudo. Ferraz et al., (2011), no estudo com dietas alternativas para *C. putoria* utilizando carne bovina como controle em temperatura ambiente a 21,2ºC/25ºC, obtiveram uma duração média na fase larval menor de 4,1dias ($\bar{x}$ = 4,050, sd = 0,068). Entretanto, as fases pupal e de neolarva a adultos, foram mais longas, durando em média 4,3 dias ($\bar{x}$ = 4,278 sd = 0,099) e 8,9 dias ($\bar{x}$ = 8,868 sd = 0,102), respectivamente. A variação entre os dois estudos pode ser justificada pelas diferentes temperaturas em que os insetos foram submetidos.

Clark et al., (2006) em estudo pós-embrionário de *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) utilizando coração, pulmão e fígado de suíno e bovino e trabalhando a 25ºC, observaram que as larvas iniciaram abandono no 2º dia, entretanto, larvas criadas em tecidos suínos foram mais precoces, do que as criadas em tecido bovino. Contudo, o desenvolvimento total (larva/adulto) nos tratamentos ocorreu em 12 dias. Neste estudo, as larvas alimentadas nos tratamentos de suíno e bovino, iniciaram o abandono no 3º dia, apresentando desenvolvimento significativamente mais reduzido em fígado suíno (T1) comparado aos demais tratamentos. O coração bovino (T5), completando todo o desenvolvimento em tempos distintos, sendo menor nos tecidos de bovino (oito dias). Estas diferenças são esperadas por se tratarem de espécies diferentes do presente estudo, bem como condições ambientais.

No presente estudo, dos sete tecidos avaliados, seis (pulmão suíno, coração suíno, músculo suíno, coração bovino, pulmão bovino e músculo bovino) demonstraram potencial nutricional e influência positiva para o desenvolvimento de imaturos de *C. putoria* sob condições artificiais. O mesmo não foi observado em fígado suíno, onde foram observadas alterações nas taxas de desenvolvimento larval e duração total, e menores percentuais de viabilidades nos estágios de desenvolvimento, demonstrando não ser tão efetivo para esta espécie. É importante salientar que diante destes resultados estas dietas podem favorecer pesquisas que necessitem a criação em massa de *C. putoria*.

Tais contrastes são relevantes e devem ser levados em consideração em estudos forenses durante a coleta de larvas em cadáveres em avançado processo de putrefação, auxiliando na determinação da idade das larvas coletadas em determinado órgão humano. Neste caso, considerando que estas larvas poderão estar colonizando os mesmos tecidos testados neste estudo, os resultados obtidos poderão contribuir para comparação de possíveis diferenças de desenvolvimento entre larvas criadas em um ou mais órgãos na tentativa de reduzir imprecisões de cálculo, principalmente, quando estas larvas estiverem colonizando o fígado, devido à lentidão do seu crescimento.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da UNIRIO, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), ao Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (RIOZOO), à Marcela Teixeira Rebello e ao Me. Wellington Thadeu A. Azevedo do (LED/UNIRIO) por suas contribuições na etapa inicial.

Referências bibliográficas

Aguiar-Coelho VM, Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. 1995. Associações entre larvas de *Cochllomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoologia* 12(4): 983-990.

Amendt J, Krette KR & Zehner R. 2004. Forensic Entomolgy, Springer, Verlag 91: 51-65. doi 10.1007/s00114-003-0493-5

Barbosa LS, Jesus DML & Aguiar-Coelho M. 2004. Longevidade e capacidade reprodutiva de casais agrupados de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) oriundos de larvas criadas em dieta natural e oligídica. *Revista Brasileira de Zoociências* 6: 207-217.

Barbosa LS, Cunha AM, Couri MS & Maia VC. 2014. Muscidae, Sarcophagidae, Calliphoridae e Mesembrinellidae (Diptera) da Estação Biológica de Santa Lúcia (Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil). *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão (Nova Série)* 33: 131-140.

Beuter L & Mendes J. 2013. Development of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) in Different Pig Tissues. *Neotropical Entomology* 43(4): 426-430.

Biavati GM, Santana FHA & Pujol-Luz JR. 2010. A Checklist of Calliphoridae Blowflies (Insecta, Diptera) Associated with a Pig Carrion in Central Brazil. Journal of Forensic Sciences 55(6): 1603-1606. doi: 10.1111/j.1556-4029.2010.01502.x

Castro SCR, Dias XD, Sujji RE & Queiroz RP. 2010. Levantamento de dípteros de interesse forense em uma área de cerrado em Brasília. *Universitas: Ciências da Saúde* 8(1): 1-16.

Cavalcante ANP, Dal-Bó D, Creão-Duarte AJ & Farias RCAP. 2015. Espécies de Calliphoridae (Diptera) associadas a carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus,1758 em área de restinga na Paraíba, Brasil, e espécies de importância forense para a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM). *Entomotropica* 30(15): 150-159.

Clark KL, Evans L & Wall R. 2006. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Science International* 156:145–149.

Cruz JD, Silva CC & Raposo-Filho JR. 2014. Dipterofauna associada a cadáver de porco doméstico *Sus scrofa domesticus* (Linnaeus, 1758) na cidade de Itabaianinha, Estado de Sergipe. *Cadernos de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde Unit* 2 (1): 155-173.

Departamento de Informática em Saúde Escola Paulista de Medicina/UNIFESP. *Tabela de Composição Química dos Alimentos - Versão 3.0.* Disponível online <http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/public/> acesso em 07 abr 2016.

Estrada DA, Grella MND, Thyssen PJ & Linhares AX. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207.

Ferraz ACP, Dellavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Silva-Filho RG & Aguiar-Coelho VM. 2011. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal Insect Sciences* 12:43.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Silva-Filho RG & Aguiar-Coelho VM. 2014a. Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of an Old World screwworm fly, *Chrysomya putoria*. *Journal Insect Sciences* 14(3): 1-11.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Figueiredo AL, Proença B, Silva-Filho RG & Aguiar VM. 2014b. Evaluation of the Effects of the Antibiotics Gentamicin on the Postembryonic Development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal Insect Sciences* 14(279): 1-5.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Silva-Filho RG & Aguiar VM. 2016. Post-embriononic development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) on a diet containing ampicillin in different concentrations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88(1): 106-116. http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620140440

Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM & Ishihata GK. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15(3): 170-174.

Guimarães JH, Prado AP & Linhares AX. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22(1): 53-60.

Introna F, Campobasso CP & Goff ML. 2001. Entomotoxicology. *Forensic Sciences International* 120: 42-47.

Levot GW, Brown KR & Shipp E. 1979. Larval growth of some calliphorid and sarcophagid Diptera. *Bulletin of Entomological Research* 69: 469-475.

Marckenko MI. 1985. Characteristic of development of the fly *Chrysomya albiceps* (Wd.) (Diptera, Calliphoridae). *Entomologicheskoe Obozrenie* 64(1): 79-84.

Mariano M. 2003. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental. *Acta Cirúrgica Brasileira* 18(5): 387-391.

Mello RP. 2003. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. *Entomology Y Vectores* 10(2): 255-268.

Mello RS, Queiroz MMC & Aguiar-Coelho VM. 2007. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia Série Zoologia* 97(4):481-485. http://dx.doi.org/10.1590/S0073-47212007000400019

Mulieri PR, Torretta JP, Schnack JA & Mariluis JC. 2006. Calliphoridae (Diptera) of the coastline of Buenos Aires, Argentina: species composition, numerical trends, and bait's preferences. *Entomological News* 117(2): 139-148.

http://dx.doi.org/10.3157/0013-872X(2006)117[139:CDOTCO]2.0.CO;2

Norris KR. 1965. The bionomics of blow flies. *Annual Review of Entomology* 10:47-68.

Kosmann C, Mello PR, Harterreiten-Souza SE & Pujol-Luz RJ. 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(1): 74-85.

Parra JRP. 2001. *Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico*, 6nd ed., Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 134 p.

Rabêlo KCN, Thyssen PJ, Salgado RL, Araújo MSC & Vasconcelos SD. 2011. Bionomics of two forensically important blowfly species *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) reared on four types of diet. *Forensic Science International* 210: 257-262.

Ribeiro RC & Milward-de-Azevedo EMV. 1997. Dietas naturais na criação de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819; Diptera: Calliphoridae): estudo comparado. *Ciência Rural* 27(4): 641-644.

Rosa TA, Babata MLY, Souza CM, Sousa D, Mello-Patiu CA & Mendes J. 2009. Dípteros de interesse forense em dois perfis de vegetação de cerrado em Uberlândia, MG. *Neotropical Entomology* 38(6): 859-866.

Oliveira-Costa J. 2007. *Entomologia forense: quando os insetos são vestígios*. 2nd ed., Campinas - SP: Millennium Editora. pp. 178-180.

Oliveira-Costa j, Oliveira RG & Bastos CS. 2013. Diptera Calliphoridae de importância forense no Rio de Janeiro. *Revista Eletrônica Novo Enfoque* 16(16): 41-52.

Oliveira TC & Vasconcelos SD. 2010. Insects (Diptera) associated with cadaversat the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology. *Forensic Science Intomology* 198: 97-102.

Oliveira VC, Mello RP & d'Almeida JM. 2002. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos no jardim zoológico, Brasil. *Revista de Saúde Publica* 36(5): 614-620.

Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. 1991. Técnicas de criação de alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. Revista Brasileira de Zoologia 8(1/2/3/4): 75-84.

Salviano RJB, Mello RP, Santos RFS, Beck LCNH & Ferreira A. 1996. Calliphoridae (Diptera) associated with human corpes in Rio de Janeiro, Brazil. *Entomology y Vectores* 3(5-6): 145-146.

Souza AM &Linhares AX. 1997. Diptera and Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 8-12.

Swindle MM, Smith AC, Laber-Laird K & Dungan L. 1994. Swine in Biomedical Research: Management and Models. *ILAR News* 3(1): 1-4.

Thyssen PJ, Moretti CT, Ueta MT & Ribeiro OB. 2004. O papel de insetos (Blattodea, Diptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. *Cadernos de Saúde Pública* 20(4):1096-1102.

Ullyett GC. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Biological Sciences* 234(610):77-174.

CAPÍTULO II

DIETAS DE ORIGEM ANIMAL E SUA INFLUÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE IMATUROS DE *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): IMPLICAÇÕES NA ENTOMOLOGIA FORENSE

Dietas de origem animal e sua influência no desenvolvimento de imaturos de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): implicações na entomologia forense

Mônica Salazar-Souza[1], Marcia Souto Couri[2,4] & Valéria Magalhães Aguiar[1,3]

[1] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical), Av. Pasteur, 458, Urca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 22.290-240.

[2] Departamento de Entomologia, Laboratório de Diptera, Museu Nacional/UFRJ. Quinta da Boa Vista, s.n., São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

[3] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Rua Frei Caneca, 94 - Centro, Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 20211-040.

[4] CNPq fellow

Resumo

A estimativa do intervalo pós-morte pela entomologia forense se baseia no tempo de desenvolvimento das larvas de dípteros necrófagos sobre um cadáver. Assim, a composição nutricional do tecido pode influenciar retardando ou acelerando a taxa de desenvolvimento dessas larvas no tecido, induzindo a dados imprecisos. Comparou-se o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* em tecido de bovino e suíno. Larvas recém eclodidas de *C. albiceps* foram transferidas para os tecidos na proporção de 40 neolarvas /60 gramas de tecido/tratamento: músculo bovino (controle) e pulmão suíno (T1), em quatro repetições/ tratamento em câmara climatizada a temperatura de 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Insetos criados em músculo bovino apresentaram significativamente maior duração da fase larval (7,9 dias), constatando-se diferença significativa pelo ANOVA em relação a pulmão suíno (6,5 dias). A duração total em músculo bovino apresentou desenvolvimento significativamente mais lento (12,2 dias) comparado a pulmão suíno. Larvas alimentadas com pulmão suíno, apresentaram-se significativamente mais pesadas ($\bar{x}$ = 87,2 mg) em relação as larvas alimentadas no músculo bovino. A viabilidade total revelou índice elevado em pulmão suíno (acima de 68%). A razão sexual se manteve mais próxima da proporção 1:1 em

músculo bovino (rs = 0,59), com maior proporção de fêmeas. O percentual de anormalidade se manteve dentro do esperado. Os resultados mostram que os diferentes tecidos influenciaram no desenvolvimento larval, sublinhando a importância de considerar o tipo de tecido cadavérico colonizado pelas larvas nos estudos forenses quando o método de desenvolvimento for utilizado para o cálculo do IPM, na tentativa de reduzir imprecisões do cálculo.

Palavras-chave: Entomologia forense, tecido suíno, tecido bovino, intervalo pós-morte

Abstract

The postmortem interval estimation by forensic entomology is based on the time of development of the necrophagous diptera larvae on a corpse. Thus, the nutritional composition of the tissue may influence retarding or accelerating the rate of development of such larvae in the tissue, inducing imprecise data. The post-embryonic development of *Chrysomya albiceps* was compared in bovine and swine tissue. Newly hatched larvae of *C. albiceps* were transferred to the tissues at a ratio of 40 neolarvae / 60 grams of tissue / treatment: bovine muscle (control) and swine lung (T1), in four replicates / treatment in controlled conditions at a temperature of 28°C day/ 26°C night, RH 70±10% and 12h photophase. Insects created in bovine muscle showed significantly longer duration of the larval phase (7.9 days), showing a significant difference by ANOVA in relation to swine lung (6.5 days). The total duration in bovine muscle presented a significantly slower development (12.2 days) compared to swine lung. Larvae fed swine lung were significantly heavier ($\bar{x}$ = 87.2 mg) in relation to the larvae fed on the bovine muscle. Total viability revealed a high index in swine lung (over 68%). The sex ratio remained closer to the 1:1 ratio in bovine muscle (rs = 0.59), with a higher proportion of females. The percentage of abnormality remained within the expected range. The results show that the different tissues influenced the larval development, underlining the importance of considering the type of cadaveric tissue colonized by the larvae in the forensic studies when the development method is used to calculate the PMI, in an attempt to reduce imprecision of the calculation.

Keywords: Forensic entomology, swine tissue, bovine tissue, postmortem interval

Introdução

Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819) é uma espécie exótica, originária dos trópicos do Velho Mundo, ocupa atualmente além das regiões da África, América do Sul, partes da Europa e Ásia (Guimarães et al., 1978; Al Shareef & Al-Qurashi, 2016). O comportamento sinantrópico e endófilo aliado à variedade de substratos visitados pelos adultos pode ter contribuído para a sua rápida adaptação e dispersão (Gagné, 1981; Nespoli et al., 1998). No Brasil, a espécie se destaca em importância médico-sanitária por ser observada visitando lixões, por ser atraída por sangue, carne fresca ou putrefata e fezes, ao mesmo tempo em que é encontrada em feiras livres e mercados, tornando-se potencial vetora mecânica de patógenos, além disto, pode estar associada à miíases em animais e/ou humanos (Zumpt, 1965; Linhares, 1981; Braack & Retief, 1986; Nespoli et al., 1998; Ferraz et al., 2011).

Estudos relacionados à entomofauna cadavérica evidenciaram a espécie como pioneira na colonização de cadáveres de animais em área urbana, na região Sudeste e Norte do Brasil, destacando a importância forense desta espécie para estimativa do intervalo pós-morte (IPM) (Souza & Linhares, 1997; Oliveira-Costa, 2000). Carvalho et al., (2004), observaram adultos da espécie atingindo cadáveres de *Sus scrofa domesticus* Linnaeus, 1758 em área urbana logo após a exposição, ressaltando o predomínio da espécie durante todo o período de decomposição, possivelmente justificado pelo comportamento predatório das larvas (Queiroz & Milward-de-Azevedo, 1991). Outros estudos nestas regiões também observaram a presença em cadáveres humanos em área natural e urbana (Salviano et al., 1996; Oliveira-Costa et al., 2001; 2005; Andrade et al., 2005).

Como entomo-indicador forense, a espécie contribui para a estimativa do IPM pelo método entomológico, no estabelecimento do tempo mínimo e máximo, entre a morte e a data em que o corpo foi encontrado com base na idade da larva, além de indicar possíveis mudanças ou injúrias sofridas após a morte, bem como, causas ou circunstâncias relacionadas à morte, podendo contribuir, inclusive, nos estudos de entomotoxicologia (Leccese, 2004; Oliveira-Costa, 2007).

Na tentativa de demonstrar a capacidade de desenvolvimento de *C. albiceps* em laboratório, diversos ensaios utilizaram dietas naturais com diferentes valores nutricionais como carne bovina (Ullyet, 1950; Marckenko, 1985; Al-Misned et al., 2002; Grassberger, 2003; Kheirallah, 2007; Cordeiro, 2011; Al Shareef & Al-Qurashi, 2016), carne equina (Queiroz & Milward-de-Azevedo, 1991; Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo, 1995;

Queiroz, 1996); coelho (Carvalho et al., 2012); frango (Richards et al., 2007) e dietas artificiais (Estrada et al., 2009; Ferraz et al., 2011).

Embora suínos sejam utilizados como modelo de estudo forense, devido à semelhança fisiológica com a carne humana (Swinddle, 1994; Mariano, 2003), existe uma lacuna a respeito do uso da carne suína no desenvolvimento dessa espécie em laboratório. Beuter et al., (2013) estudaram o desenvolvimento de larvas de *C. albiceps* em gordura, cérebro e carne de suíno em laboratório e obtiveram uma disparidade no tempo de desenvolvimento das larvas.

Em razão de as larvas coletadas nos cadáveres serem mantidas em dieta larval sob condições artificiais até a emergência do adulto para que se proceda à identificação da espécie, torna-se relevante para a entomologia forense, na tentativa de reduzir o grau de imprecisão do IPM, o conhecimento de possíveis alterações nas taxas de desenvolvimento de *C. albiceps* quando criadas em diferentes substratos. Clark et al., (2006) observaram que larvas de *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) apresentaram taxa de desenvolvimento mais acelerado em tecidos de suíno comparada a bovino, e quando criadas em pulmão comparado a fígado. O presente estudo pretende avaliar o desempenho de *C. albiceps* criada em pulmão suíno, utilizando como controle músculo bovino, visando contribuir com dados para serem utilizados na entomologia forense, além de preencher as lacunas a respeito da eficiência deste tecido como substrato de criação para a espécie em laboratório.

Material e Métodos

Coleta e estabelecimento da colônia estoque. Espécimes adultos de Calliphoridae foram capturados por meio de duas armadilhas aéreas, confeccionadas com garrafas de Polietileno Tereftalato (PET) de 2 litros modificada de Mello et al., (2007) (Figura 1), tendo como isca atrativa em cada armadilha, 200 gramas de sardinha fresca (Figura 2 A; B) .

Estas foram instaladas em uma árvore, a aproximadamente 1,5 m de distância do solo, próximo às lixeiras (22º54’20.9”S, 043º13’45.8”W), no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (RIOZOO), localizado no Parque Quinta da Boa Vista, s/n, São Cristóvão, Rio de Janeiro, Brasil, onde permaneceram por 72 horas (Figura 2 C a G). Foram recolhidas após esse período e levadas para o Laboratório de Estudo de Dípteros do Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (LED/UNIRIO) para triagem e identificação da espécie de interesse (Figura 2 H; I).

Os espécimes coletados foram expostos em freezer por aproximadamente dois

minutos a -15ºC para diminuição da atividade metabólica, e identificados com auxílio de microscópio estereoscópio, segundo chave taxonômica de Mello (2003). À medida que identificados, os adultos de *C. albiceps* foram acondicionados em gaiolas de polipropileno (45 cm x 30 cm x 20 cm), alimentados diariamente *ad libitum* com mel a 50%, H_2O e proteína (músculo suíno) para estabelecimento da colônia estoque (Figura 2 J).

Figura 1: Armadilha confeccionada com garrafas de Polietileno Tereftalato (PET) de 2 L para captura de califorídeos no Jardim Zoológico do Rio de Janeiro, Brasil. Pote plástico de polipropileno rosqueado (sem tampa) (12 cm de altura X 31 cm de circunferência), perfurado, envolvo com fita isolante preta (A) como base da armadilha. Garrafa cortada em forma de funil invertido introduzida na garrafa de armazenamento (B; D), presa com fita isolante. Tampa do pote (vazada), unida ao funil por cola cianoacrilato, permitindo a conexão por rosqueamento, de ambas as garrafas com a base da armadilha (C). Garrafa de armazenamento (D). A tampa da garrafa de armazenamento foi substituída por tecido vedando a parte superior para facilitar a circulação de ar e diminuir a condensação no interior da garrafa de armazenamento.

Figura 2: Armadilhas aéreas utilizadas para coleta (A). Isca atrativa (B). Ponto de coleta (C a F). Armadilha recolhida (G). Espécimes selvagens em processo de triagem (H e I). Colônia estoque (J).

Fase experimental. Fêmeas de segunda geração de laboratório foram estimuladas a oviposição em 60 gramas de músculo suíno (Figura 3 A). Imediatamente após a eclosão, as larvas de 1º estádio (L1) (https://youtu.be/bBThRVJwqAc) foram transferidas individualmente com pincel (número 0) para duas dietas larvais de origem bovina e suína. As dietas foram cortadas em cubos de aproximadamente 2 cm^3, descongelados 17 horas, em temperatura ambiente, e utilizadas na proporção: 40 larvas/ 60 gramas de tecido: músculo bovino (controle) e pulmão suíno (T1) (Figura 3 B a D). Para cada tratamento, foram realizadas três repetições, totalizando 240 larvas L1. A proporção de dieta utilizada foi superior a 1 larva/ 1 grama de tecido, seguindo a proporção recomendada por Aguiar-Coelho et al., (1995) para a criação de califorídeos.

As dietas larvais foram acondicionadas em recipientes de poliestireno de 100 mL, introduzido em recipientes de poliestireno de 400 mL, previamente forrados com maravalha esterilizada, sendo este último recipiente, recoberto com tecido de náilon, preso com elástico. Os tratamentos foram mantidos em câmara climatizada (BOD) a 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12 horas de fotofase com observações biológicas a cada 12 horas (Figura 3 E).

Figura 3: Músculo suíno usado como estímulo de postura (A). Neolarvas recém emergidas no músculo suíno (B). Pesagem dos tecidos (C). Transferência das neolarvas para dieta (D). Tecidos armazenados em BOD (E). Larvas de 3º estádio (F). Aferição da massa corporal das larvas de 3º estádio (G). Larvas a serem transferedias para tubos de ensaio (H). Adulto recém emergido (I).

À medida que as larvas de 3º estádio (L3) abandonaram as dietas, foram agrupadas em lotes de cinco, registrando-se a massa corporal (em gramas) em balança digital analítica, sob placa de Petri, e em seguida, transferidas para tubos de ensaio contendo maravalha esterilizada, vedados com tecido de náilon e elástico, mantidos na câmara climatizada até a emergência dos adultos (Figura 3 F a I).

Parâmetros biológicos e análise estatística. Para avaliar o desenvolvimento dos insetos foram utilizados os parâmetros: massa corporal das larvas maduras; duração e viabilidade dos estágios larval, pupal e de neolarvas a adulto (total); ritmo de abandono das

larvas, pupariação e de emergência dos adultos; razão sexual e anormalidade dos adultos. Os cálculos estatísticos foram realizados no BioEstat® (Ayres et al. 2007). Os valores das médias foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparadas entre si pelo pós teste Tukey (p = 0,05), e o desvio padrão e valores de intervalo entre as médias foram obtidos por estatística descritiva de dados quantitativos. Os valores de razão sexual foram obtidos segundo fórmula: rs = $\frac{F}{F+M}$ (rs = razão sexual; F= fêmeas; M = machos) a fim de obter a proporção 1:1 (= 0,50) e a anormalidade, de acordo com a frequência esperada (%).

Resultados

Os tratamentos foram confrontados e as médias no estágio larval apresentaram diferença significativa na duração média (dias) de desenvolvimento (F = 29,79; d.f. = 1,35; p = 0,0068) (controle *vs.* T1 $p < 0,01$). Insetos criados em T1 (pulmão suíno) apresentaram média de duração de desenvolvimento significativamente inferior (6,5 dias) aos insetos criados na dieta controle (músculo bovino) (7,9 dias) (Tabela 1).

Em relação à duração de desenvolvimento do estágio pupal não foi observada diferença significativa entre os tratamentos (F = 0,23; p = 0,6565) (Tabela 1). A duração média variou de 4,2 a 4,4 dias (Tabela 1).

A duração total (L1 a emergência dos adultos) apresentou diferença significativa no confronto entre os tratamentos (F = 17,37; d.f. = 1,47; p = 0,0151) (controle *vs.* T1 $p < 0,05$). Insetos alimentados com a dieta controle (músculo bovino) apresentaram desenvolvimento mais lento levando em média 12,2 dias para completarem seu desenvolvimento, diferindo significativamente de T1 (pulmão suíno), cujo desenvolvimento total dos insetos levou em média 10,9 dias (Tabela 1).

A duração dos estágios de desenvolvimento refletiu o ritmo de abandono de larvas maduras da dieta, pupariação e emergência dos adultos de *C. albiceps* alimentadas nos dois tecidos e está representado na Figura 1.

Observou-se que o pico de abandono de larvas da dieta ocorreu no 7º dia no controle (músculo bovino) e no 5º dia em T1 (pulmão suíno). As larvas do T1 (pulmão suíno) cessaram o abandono da dieta no 7º dia, enquanto as larvas da dieta controle (músculo bovino) permaneceram na dieta até o 8º dia. Estes dados expressam uma aceleração no desenvolvimento larval para os insetos do T1 (pulmão suíno).

A fase de pupariação teve início no 6º dia em ambos os tratamentos, estendendo-se até o 10º dia. Contudo, embora tenham completado a fase com a mesma quantidade de dias, até o

8º dia, constatou-se 99% de pupariação das larvas criadas em T1 (pulmão suíno), enquanto no mesmo período, observou-se 73% de pupação na dieta controle (músculo bovino). Os picos de pupariação foram observados no 6º dia em T1 (pulmão suíno), e 8º dia no controle (músculo bovino).

Tabela 1: Duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário e viabilidades de acordo com a frequência esperada de larvas, pupas e adultos de *Chrysomya albiceps* oriundas de tecidos bovino e suíno. Análise de Variância (ANOVA) e pós teste Tukey à temperatura de 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase.

	Tempo de desenvolvimento pós-embrionário (dias)			
	Tratamentos	$\bar{x} \pm \sigma$	**I.V.**	**Viabilidades (%)**
Fase larval	Controle (MB)	7,9 ± 0,2354a	5,0 - 8,0	65,0
	T1 (PS)	6,5 ± 0,3584b	5,0 - 7,0	69,1
Fase pupal	Controle (MB)	4,4 ± 0,4538a	5,0 - 10,0	65,0
	T1 (PS)	4,2 ± 0,2409a	6,0 - 10,0	69,0
Duração total	Controle (MB)	12,2 ± 0,3849a	11,0 - 13,0	58,0
	T1 (PS)	10,8 ± 0,4744b	10,0 - 13,0	68,3

$\bar{x}$ = média dos dias; σ = desvio padrão; **I.V.** = intervalo de variação (mínimo e máximo). Tratamentos: controle (MB) (músculo bovino) e T1(PS) (pulmão suíno). Médias com letras diferentes diferem significativamente entre si e com letras iguais não diferem significativamente pelo pós teste Tukey.

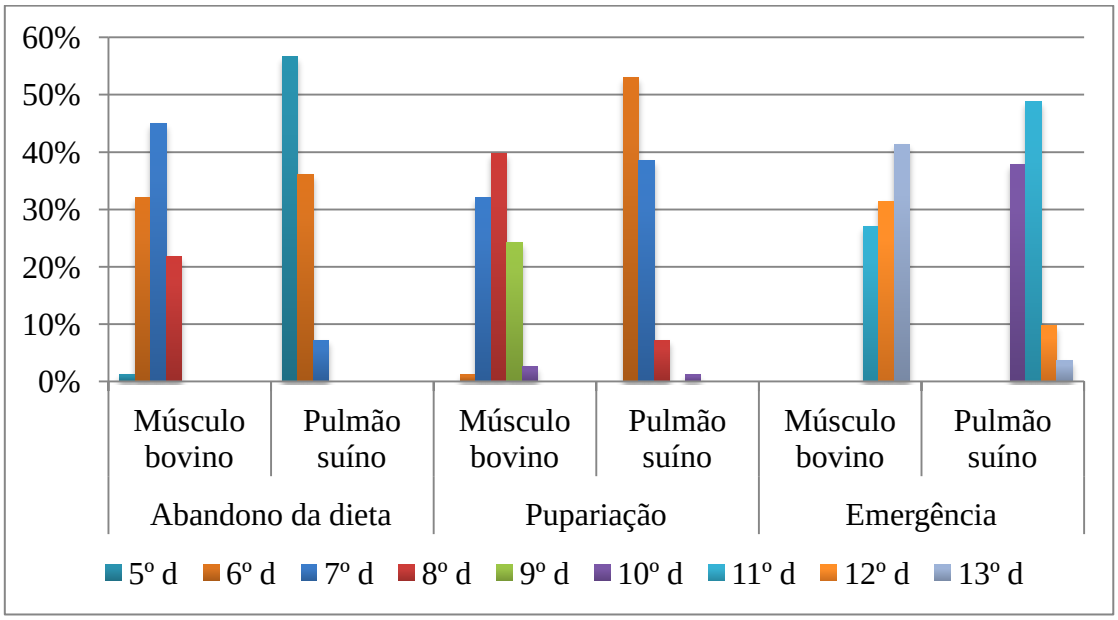

Figura 4: Ritmo de abandono de larvas da dieta, pupariação e emergência dos adultos de *Chrysomya albiceps* oriundas de coração músculo bovino (controle) e pulmão suíno (T1) à temperatura de 28ºC/ dia, 26ºC/noite UR 70±10% e 12h de fotofase.

Em relação à emergência, os primeiros adultos emergiram 10 dias após a transferência das larvas para a dieta T1 (pulmão suíno) e 11 dias após para a dieta controle (músculo bovino). O período de emergência total compreendeu de 10 a 13 dias. Picos de emergência foram observados precocemente no 11º dia em T1 (pulmão suíno), comparado com o 13º dia para a dieta controle (músculo bovino).

Em relação às viabilidades, na comparação das médias não foram observadas diferenças significativas entre os estágios larval; pupal; total (L1 a adulto) (F = 0,6990 p = 0,5464) entre os tratamentos. Observando os percentuais de viabilidades larval e pupal obtidos constatou-se que insetos alimentados na dieta controle (músculo bovino) e T1 (pulmão suíno) apresentaram percentuais entre 65% e 69%. Apesar das viabilidades de larvas a adulto apresentarem uma diferença de 10% entre as dietas, esta não foi estatisticamente significativa (F = 0,2358 p = 0,6536). (Tabela 1).

Com relação ao peso individual médio das larvas maduras (g) foram observadas diferenças significativas na comparação entre os tratamentos (F = 42,58; d.f = 0,02; p = 0,001) (controle *vs*. T1 $p < 0,01$). Larvas alimentadas com T1 (pulmão suíno) apresentaram massa corporal significativamente mais pesadas ($\bar{x}$ = 87,2 mg) quando comparadas com larvas criadas dieta controle (músculo bovino) ($\bar{x}$ = 66,0 mg) (Tabela 2).

A razão sexual se distanciou do esperado (proporção 1:1) no pulmão suíno (T1) (rs = 0,91; F = 91,0%; M = 8,0%), mantendo-se mais próxima no músculo bovino (controle) (rs = 0,59; F= 60,8%; M = 39,1%) (Tabela 2). Não foram observados insetos anormais, isto é, com qualquer deformidade morfológica, em nenhum dos tratamentos.

Tabela 2: Peso individual (mg) de larvas maduras e razão sexual de *Chrysomya albiceps* oriundas de tecidos suíno e bovino. Análise da variância (ANOVA) e pós teste Tukey e razão sexual em temperatura controlada de 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase.

Tempo de desenvolvimento pós-embrionário (dias)			
Tratamento	**Peso individual médio (mg) ± σ**	**I.V.**	**Razão sexual**
Controle (MB)	66,0 ± 0,0036a	62,1 - 69,2	0,59
T1(PS)	87,2 ± 0,0045b	82,1 – 99,9	0,91

σ= desvio padrão; **I.V.** = intervalo de variação (mínimo e máximo). Tratamentos: controle (MB) (músculo bovino) e T1(PS) (pulmão suíno). Razão sexual calculada pela fórmula: $rs = \frac{F}{F+M}$. Percentuais de viabilidade com letras diferentes diferem significativamente entre si e com letras iguais não diferem significativamente pelo pós teste Tukey.

Discussão

Embora os esforços em desenvolver e adaptar uma dieta alternativa, de baixo custo e composição nutricional eficiente que permita às larvas coletas em cadáveres completar seu ciclo biológico em laboratório, esse ainda tem sido um desafio para os estudos do desenvolvimento dos dípteros de importância forense (Estrada et al., 2009). Por ser o substrato natural de insetos necrófagos, as dietas de origem animal tornam-se mais propícias a suprir as necessidades nutricionais das larvas. Além da facilidade em incorporar à sua composição substâncias químicas que contribuirão nos estudos entomotoxicológicos (Rabêlo et al., 2011). Os resultados apresentados confirmam a eficiência de ambas as dietas como substrato larval. Porém, na comparação entre os tecidos, embora a eficiência da carne bovina seja consolidada nos estudos relacionados, em termos gerais, o pulmão suíno se mostrou mais eficiente, demonstrando que os insetos se desenvolveram mais rapidamente e obtiveram maior ganho de massa corporal.

O desenvolvimento de *C. albiceps* foi analisado em outros ensaios utilizando tecidos de bovino e suíno como substrato larval. Os resultados deste estudo diferem dos resultados observados anteriormente. Mello et al., (2012) utilizando carne moída bovina, a 27±1ºC UR 60±10% a 12 horas de fotofase, obtiveram tempo de desenvolvimento larval, mais curto (5,7 dias), porém larvas com massa corporal semelhante ao presente estudo superior (70,0 mg). Estrada et al., (2009) utilizaram carne moída bovina como controle a 27±1ºC UR 70±10% e 12 horas de fotofase, obtiveram tempo médio de desenvolvimento larval em 5 dias e larvas com massa corporal próxima a que obtive-se no T1 (pulmão suíno) mais pesadas (84,9 mg). Em contrapartida, Beuter & Mendes (2013) compararam o desempenho de quatro diferentes tecidos de suíno, entre eles, carne moída, a 25±1ºC UR 70±10%; 12 horas de fotofase, e observaram um tempo médio de desenvolvimento larval de 4 dias e larvas com peso médio de 62,5 mg.

As divergências observadas são relevantes para a entomologia forense quando tais resultados forem utilizados como parâmetro de cálculo na estimativa do IPM. Norris (1965) sublinhou que a colonização em diferentes tecidos e/ou vísceras pode alterar o desenvolvimento de imaturos de insetos necrófagos. Estes dados reforçam a necessidade de realizar estudos em diferentes regiões geográficas, com diferentes linhagens da espécie, diferentes tecidos e condições ambientais controladas.

Neste caso, em se tratando de substratos bovinos, que apresentam a mesma composição proteica, uma das hipóteses a cerca das diferenças observadas entre o presente

estudo e os registrados na literatura pode estar relacionada à consistência e a quantidade de lipídios dos tecidos experimentados. A carne moída bovina pode ter sido mais facilmente digerida pelas larvas, e a maior quantidade de lipídios pode ter favorecido a diluição de vitaminas lipossolúveis contribuído para maior assimilação de determinados nutrientes (Flemming et al., 2003). Outros aspectos a serem considerados são as linhagens das espécies utilizadas nos experimentos (Aguiar-Coelho et al., 1995; Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo, 1995), diferentes condições ambientais (Queiroz & Milward-de-Azevedo, 1991; Queiroz, 1996; Marchenko, 2001; Richards et al., 2007).

Da mesma forma, pode-se considerar que devido à consistência do tecido, as larvas criadas no pulmão suíno tiveram melhor desempenho na alimentação, refletido na maior massa corporal comparado ao músculo bovino (Ribeiro & Milward-de-Azevedo, 1997), bem como um rápido desenvolvimento larval (Rabêlo et al., 2011).

Devido à importância que *C. albiceps* assumiu nos estudos forenses, torna-se imprescindível à manutenção de colônias estoque da espécie em laboratório. Os resultados a respeito do desempenho de ambas as dietas ressalta-se o potencial de ambas, em especial, do pulmão suíno como uma dieta favorável para a manutenção das larvas dessa espécie em laboratório. Embora o músculo bovino tenha apresentado um desenvolvimento mais lento e menor peso corporal, as viabilidades dos estágios larval, pupal e total não diferiram estatisticamente do pulmão suíno, produzindo indivíduos normais, isto é, sem deformidades morfológicas.

É comprovado que *C. albiceps* participa da primeira onda na colonização de cadáveres de animais e humanos (Oliveira-Costa, 2007), a espécie já foi observada por Souza et al., (2005) colonizando cadáver de coelho em todos os estágios de decomposição (de fresco a seco). Por isso, seria relevante a realização de novos ensaios com outros tecidos de suíno e bovino e em diferentes estágios de putrefação.

Em relação ao desvio sexual, os maiores percentuais de fêmeas observados em ambas as dietas testadas, pode ter sido influenciado pelo fato de as fêmeas se reproduzirem monogenicamente (Queiroz et al., 1996). Segundo Ullerich (1953) e Queiroz (1991) a bissexualidade não interfere na proporção sexual, já que os machos não influenciam no sexo de seus descendentes podendo ocorrer em uma mesma geração apenas machos ou apenas fêmeas.

Os contrastes observados especialmente na fase larval devem ser considerados pelos entomólogos forenses em uma eventual datação do IPM pelo método de desenvolvimento. Espera-se que os resultados obtidos possam contribuir na redução de imprecisões de cálculo,

levando-se em consideração as condições de temperatura constante semelhantes às utilizadas neste estudo, e caso esteja colonizando os mesmos tecidos testados em humanos.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Biodiversidade Neotropical da UNIRIO), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) e ao Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (RIOZOO).

Referências bibliográficas

Aguiar-Coelho VM & Milward-de-Azevedo EMV. 1995. Associação entre *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann), *Chrysomya megacephala* (Fabricius) e *Cochllomyia macellaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) sob condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 12(4): 991-1000.

Aguiar-Coelho VM, Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. 1995. Associações entre larvas de *Cochllomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoologia* 12(4): 983-990.

Al-Misned FAM, Amoundi MA & Abou-Fannah SM. 2002. Development rate, Mortality and growth rate of immature *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera:Calliphoridae) at constant laboratory temperatures. *Journal-King Saud University* 15(1): 49-58.

Al Shareef LAH & Al-Qurashi, SID. 2016. Study of some biological aspects of the blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann 1819) (Diptera: Calliphoridae) in Jeddah, Saudi Arabia. *Egyptiam Journal Forensic* Sci 6: 11–16.

Andrade HTA, Varela-Freire AA, Batis MJA & Medeiros JF. 2005. Calliphoridae (Diptera) coletados em cadáveres humanos no Rio Grande do Norte. *Neotropic Entomology* 34(5): 855-856.

Ayres M, Ayres Junior M, Ayres DL & dos Santos AAS. 2007. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e medicas. *Belém: Sociedade Civil Mamirauá.* 364 p.

Braack LEO & Retief PE. 1986. Dispersal density and habitat preference of the blowflies *Chrysomya albiceps* (Wd.) and *Chrysomya marginalis* (Wd.) (Diptera, Calliphoridae). *The Onderstepoort Journal Veterinary Research* 53:13-18.

Beuter L & Mendes J. 2013. Development of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) in Different Pig Tissues. *Neotropical Entomology* 43(4): 426-430.

Carvalho LML, Thyssen PJ, Goff ML & Linhares AX. 2004. Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of southeastern Brazil. *Aggrawal's Internet Journal Forensic Medicine and Toxicology* 5(1): 33-39.

Carvalho LML, Linhares AX & Palhares FAB. 2012. The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic Science International* 220: 27-32.

Clark K, Evans L & Wall R. 2006. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Science International* 156: 145-149.

Cordeiro KBB. 2011. *Desenvolvimento pós-embrionário de Chrysomya albiceps (Diptera:Calliphoridae) sob condições controladas em laboratório e contribuições para a Entomologia Forense*. [Dissertação de licenciatura]. Universidade de Brasília/Universidade Estadual de Goiás.

Costa C, Ide S & Simonka CE. 2006. *Insetos imaturos: metamorfose e identificação*. Holos Ed. 249p.

Estrada DA, Grella MND, Thyssen PJ & Linhares AX. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207.

Ferraz ACP, Dellavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Silva Filho RG & Aguiar-Coelho VM. 2011. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal of Insect Science* 12:43.

Ferraz ACP, De Almeida VRG, De Jesus DM, Rotatori GN, Nunes R, Proença B, Aguiar-Coelho VM & Lessa CSS. 2011. Epidemiological study of myiases in the hospital of the Andaraí, Rio de Janeiro, including reference to an exotic etiological agent. *Neotropical Entomology* 40(3): 393-397.

Flemming JS, Bueno ROG, Cançado RA, Freitas RJS & Montanhini Neto MR. 2003. Avaliação dos teores de gordura em carne moída comercializada em supermercados. *Archives of Veterinary Science* 8(2): 39-42.

Gagné RJ. 1981. *Chrysomya* spp., old world blowflies (Diptera, Calliphoridae), recently established in the Americas. *Entomological Society of America* 27(1): 21-22.

Grassberger M, Friedrich E & Reiter C. 2003. The blowfly *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) as a new forensic indicator in Central Europe. *International Journal of Legal Medicine* 117: 75–81.

Guimarães JH, Prado AP & Linhares AX. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22(1): 53-60.

Kheirallah AM, Tantawi TI, Aly AH & El-Moaty ZA. 2007. Competitive interaction between larvae of *Lucilia sericata* (Meigen) and *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera :Calliphoridae). *Pakistan Journal Biology Science* 10(7):1001-1010.

Leccese A. 2004. Insects a forensic indicators: methodological aspects. Agg Internet J *Forensic Medicine and Toxicology* 5(1): 26-32.

Linhares AX. 1981. Synanthropy of Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) in the city of Campinas, São Paulo, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 25(3): 189-215.

Marckenko MI. 1985. Characteristic of development of the fly *Chrysomya albiceps* (Wd.) (Diptera, Calliphoridae). *Entomology Obozr* 64(1): 79-84.

Marckenko MI. 2001. Medicolegal relevance of cadaver entomofauna for the determination of the time of the death. *Forensic Science International* 120: 89-109.

Mariano M. 2003. Minisuíno (minipig) na pesquisa biomédica experimental. *Acta Cirurgica Brasileira* 18(5): 387-391.

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

Mello RS, Queiroz MMC & Aguiar-Coelho VM. 2007. Population fluctuations of calliphorid species (Diptera, Calliphoridae) in the Biological Reserve of Tinguá, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Iheringia Série Zoologia* 97(4):481-485.

Nespoli PEB, Queiroz MMC, Ribeiro RC & Milward-de-Azevedo EMV. 1998. Desenvolvimento pós-embrionário de duas populações de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann)

(Diptera: Calliphoridae) criadas em carne em diferentes estágios de decomposição. *Revista Brasileira de Entomologia* 41(2-4): 133-136.

Norris KR.1965. The bionomics of blow flies. *Annual Reviews Entomology* 10:47-68.

Oliveira-Costa J. 2000. *Dipterofauna cadavérica dos municípios de Duque de Caxias e São João de Meriti*. [Dissertação]. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Oliveira-Costa J, Mello-Patiu CA & Lopes SM. 2001. Dípteros muscóides associados com cadáveres humanos na cena da morte no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Boletim do Museu Nacional - série Zoologia* 464:1-6.

Oliveira-Costa J. 2005. *Levantamento da entomofauna cadavérica com vistas à formação de um banco de dados de aplicação em investigações de morte violenta do estado do Rio de Janeiro*. [Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Zoologia)]. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil.

Oliveira-Costa J. 2007. *Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios*. 2ed. Campinas - SP. Millenium Ed. 456p.

Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. 1991. Técnicas de criação de alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 8(1/2/3/4): 75-84.

Queiroz MMC. 1996. Temperature requirements of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91:785-788.

Rabêlo KCN, Thyssen PJ, Salgado RL, Araújo MSC & Vasconcelos SD. 2011. Bionomics of two forensically important blowfly species *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) reared on four types of diet. *Forensic Science International* 210: 257-262.

Ribeiro RC & Milward-de-Azevedo EMV. 1997. Dietas naturais na criação de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819; Diptera: Calliphoridae): estudo comparado. *Ciência Rural* 27(4): 641-644.

Richards CS, Paterson ID & Villet MH. 2007. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. *International Journal of Legal Medicine* 122: 271–279.

Salviano RJB, Mello RP, Santos RFS, Beck LCNH & Ferreira A. 1996. Calliphoridae (Diptera) associated with human corpes in Rio de Janeiro, Brazil. *Entomology y Vectores* 3(5-6): 145-146.

Swindle MM, Smith AC, Laber-Laird K & Dungan L. 1994.Swine in Biomedical Research: Management and Models. *ILAR News* 3(1): 1-4.

Souza AM & Linhares AX. 1997. Diptera & Coleoptera of potential forensic importance in southeastern Brazil: relative abundance and seasonality. *Medicine and Veterinary Entomology* 11: 8-12.

Souza AB, Krüger RF & Kirst F. 2005. Sucessão e diversidade de Calliphoridae (Diptera) em carcaça de Coelho (Oryctolagus cuniculus Linnaeus, 1758) na região de Pelotas, RS, Brasil. XIV congresso de iniciação científica UFPEL. Acesso em dez 2016. <http://www2.ufpel.edu.br/cic/2005/arquivos/CB_00663.rtf>

Ullerich F. H. 1963. Geschlechtschromosomen ug geschlechtsbestimmung bei einigen Calliphorinen (Calliphoridae, Diptera). *Chromosoma (Berl.)* 14: 46-110.

Ullyett GC. 1950. Competition for food and allied phenomena in sheep-blowfly populations. *Biology Sciences* 234(610):77-174.

Zumpt F.1965. *Myiasis in man and animals in the old world*. London Butterworths, 267p

.

CAPÍTULO III

CRONOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO INTRAPUPAL DA MOSCA *Chrysomya albiceps* (WIEDEMANN, 1819) (DIPTERA: CALLIPHORIDAE): IMPLICAÇÕES NA ENTOMOLOGIA FORENSE

Cronologia do desenvolvimento intrapupal da mosca varejeira *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae): aplicação em entomologia forense

Mônica Salazar-Souza[1], Márcia Souto Couri[2,4] & Valéria Magalhães Aguiar[1,3]

[1] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical), Av. Pasteur, 458, Urca, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. CEP: 22.290-240.
[2] Departamento de Entomologia, Laboratório de Diptera, Museu Nacional/UFRJ. Quinta da Boa Vista, s.n., São Cristóvão, 20940-040, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
[3] Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Rua Frei Caneca, 94 - Centro, Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 20211-040.
[4] CNPq fellow

Resumo

Os insetos apresentam diferentes padrões de desenvolvimento e as moscas varejeiras estão entre os insetos cujo desenvolvimento pupal é mais especializado. Na entomologia forense, as pupas podem ser utilizadas como ferramenta na estimativa do intervalo pós morte (IPM). Por isso, foi analisado o desenvolvimento intrapupal de pupas de *Chrysomya albiceps* cujas larvas foram alimentadas em pulmão suíno, e mantidas em câmara climatizada a temperatura de 28ºC dia/26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase, com acompanhamento diário. Após o abandono das larvas de 3º estádio da dieta, estas foram monitoradas para a observação do processo de pupariação. Em horários preestabelecidos cinco pupas foram coletas, sacrificadas e fixadas em formaldeído a 5% em tubo de ensaio de polipropileno com rosca, sendo as primeiras, determinadas como pupas de 0 hora. Compreenderam-se doze coletas até a emergência do adulto realizadas em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96 e 99 horas (n = 84). As pupas fixadas foram dissecadas com auxílio de pinça anatômica e agulhas hipodérmicas sob estereomicroscópio, fotografadas em câmera fotográfica acoplada e software Motic® Ao término do procedimento, as pupas foram preservadas em etanol a 70% e depositadas na coleção entomológica do Laboratório de Estudo de Dípteros/UNIRIO. Foram identificadas, descritas e registradas as etapas da metamorfose e as alterações

morfológicas ocorridas no processo, ante e pós empupação cujas fases foram: pupariação, apólise larval-pupal, criptocefálica, fanerocefálica, adulto farado, emergência e adulto. A fase criptocefálica ocorreu de 4-6 horas após a pupariação, a fase fanerocefálica de 6-10 horas, a fase de adulto farado de 24 a 96 horas e a fase de imago/ emergência a 99 horas da pupariação.

Palavras-chave: biologia, morfologia, pupa, tempo de desenvolvimento, IPM

Abstract

Insects present different patterns of development and the flies are among insects whose pupal development is more specialized. In forensic entomology, pupae can be used as a tool in estimating the postmortem interval (PMI). Therefore, the intrapupal development of pupae of *Chrysomya albiceps* was studied. The larvae were fed swine lungs and kept in an air-conditioned room at 28ºC day/ 26ºC night, RH 70 ± 10% and 12h of photophase, with daily follow-up. After the abandonment of larvae of the third stage of the diet, these were monitored for observation of the pupariation process. At pre-established times five pupae were collected, sacrificed and fixed in 5% formaldehyde in a polypropylene threaded test tube, the former being determined as 0-hour pupae. Twelve collections were performed until adult emergence at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96 and 99 hours (n = 84). Fixed pupae were dissected using anatomical tweezers and hypodermic needles under stereomicroscope, photographed in a coupled camera and Motic® software. At the end of the procedure, the pupae were preserved in 70% ethanol and deposited in the entomological collection of the Laboratory of Diptera Study / UNIRIO. The stages of the metamorphosis and the morphological alterations occurred in the process, before and after empupation were identified, described and recorded. The phases were: pupariation, larval-pupal apolisys, cryptocephalic, phanerocephalic, adult pharate, emergency and adult phases. The cryptocephalic phase occurred 4-6 hours after pupation, the pharynocephalic phase of 6-10 hours, the adult pharate phase of 24 to 96 hours, and the imago / emergence phase at 99 hours of pupation.

Keywords: Biology, morphology, pupa, time of development, IPM

Introdução

Os insetos apresentam diferentes padrões de desenvolvimento, e o mais complexo é dos insetos que se desenvolvem em metamorfose completa (ovo, larva, pupa e adulto) chamados holometábolos (Byrd & Castner, 2009). O estágio pupal ocorre sempre na ontogenia entre o último estágio larval e o adulto. As moscas varejeiras estão entre os insetos cujo desenvolvimento pupal é mais especializado. No processo pupal todas as estruturas larvais são descartadas para que sejam adquiridas as estruturas externas características do imago (Hinton, 1948). Em função disso, as alterações na forma corporal apresentam crescimento diferenciado, com os orgãos internos e estruturas que serão essenciais para os adultos desenvolvendo-se em maior taxa de aceleração comparado ao tamanho corporal (Gullan & Cranston, 2007).

As moscas varejeiras do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy 1830 (Diptera: Calliphoridae) são de grande importância para saúde pública pela frequente associação das larvas em casos miíases, incluindo as miíases humanas (Ferraz et al., 2010) e dos adultos na veiculação de patógenos (Soulsby, 1969; Furlanetto et al., 1984; Correa et al., 2010), além de ser um dos gêneros amplamente estudados pelas ciências forenses.

Na entomologia forense, os imaturos das espécies são utilizados como ferramenta na estimativa do intervalo pós morte (IPM) (Goff, 1993; Leal et al., 2013; Vairo et al., 2014) já que os adultos utilizam o tecido cadáverico, rico em proteína para oviposição e alimentação das larvas (Kosman et al., 2011). Por isso, o estudo do desenvolvimento pós-embrionário e intrapupal das espécies em laboratório têm contribuído na tentativa de compôr dados que possibilitem a redução da imprecisão do cálculo de IPM quando realizado pelo método entomológico (Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo, 1998; Estrada et al., 2009; Richards et al., 2008; Barros-Cordeiro & Pujol-Luz, 2010; Ferraz et al., 2011; Rabêlo et al., 2011; Kosmann et al., 2011; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Beuter & Mendes, 2013; Proença et al., 2014; Dallavecchia et al., 2015). Da mesma forma, outros estudos relacionados à entomotoxicologia, têm auxiliado quanto à possíveis influências de substâncias químicas no tempo de desenvolvimento pós-embrionário, quando estas forem acrescidas ao substrato larval podendo, por exemplo, contribuir na elucidadação de mortes relacionadas a overdoses (Ferrari et al., 2008; Ferraz et al., 2012; Ferraz et al., 2014b; Ferraz et al., 2016).

Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819) se destaca entre as espécies do gênero por participar da primeira onda de colonização cadavéria, atraídas pelos odor produzido na decomposição (Oliveira-Costa, 2007), é observada colonizando cadáveres nas fases larval,

pré-pupa e pupal (Kosman et al., 2011; Leal et al., 2013). Logo, torna-se relevante ampliar o conhecimento a respeito das características da pupa e seu tempo de desenvolvimento em associação ao tecido.

Neste estudo, objetivou-se descrever o desenvolvimento intrapupal de *C. albiceps*, revelando a cronologia e alterações morfológicas observadas durante o estágio, esperando contribuir como ferramenta para os entomologistas forenses na estimativa do IPM, e com a possibilidade auxiliar nos casos judiciais.

Material e Métodos

Fêmeas de oitava geração de *Chrysomya albiceps* oriundas da colônia estoque localizada no Laboratório de Estudos de Dípteros da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (LED/UNIRIO), mantidas em gaiolas de criação de polipropileno (45 cm x 30 cm x 20 cm) e alimentadas diariamente com mel a 50% e H_2O *ad libitum* foram estimuladas a oviposição em 60 gramas de moela de frango 24 horas antes do início da etapa experimental.

À medida que as larvas eclodiram da massa de ovos, 240 larvas de 1º estádio (L1) foram transferidas diretamente e individualmente com auxílio de pincel (número 0) para 254 gramas de pulmão suíno, descongelado 24 horas antes em temperatura ambiente, alocado em recipiente de polipropileno de 500 mL, introduzido em recipiente de 1000 mL de polipropileno previamente forrado com maravalha esterilizada. Este último recipiente foi vedado com tecido de náilon e elástico e acondicionado em câmara climatizada (BOD) a 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12 horas de fotofase. Seguiu-se uma proporção superior à recomendada por Aguiar-Coelho & Milward-de-Azevedo (1995) de 1 grama de dieta/ 1 grama de larva para suprir as necessidades nutricionais das larvas.

Após o abandono das larvas de 3º estádio da dieta, estas foram monitoradas para a observação do processo de pupariação até a empupação. Durante o processo de pupariação foram observadas as alterações do comportamento da pré-pupa e morfológicas, terminando com o início da esclerotização da cutícula, caracterizando a empupação. Iniciada a empupação, as pupas foram selecionadas tendo como critério a coloração e esclerotização da cutícula pupal, sacrificadas e fixadas em formaldeído a 5%, contido em tubo de ensaio de polipropileno com rosca, sendo as primeiras, determinadas como pupas de 0 hora.

Dentro das primeiras 12 horas de empupação, coletas foram realizadas com

intervalo de 2 horas (0, 2, 4, 6, 8 e 10 horas/ n = 30). Nos dias seguintes, as pupas foram sacrificadas em dois horários preestabelecidos as 10 e 16 horas, exceto no último dia, cuja última coleta aconteceu com diferença de 3 horas da primeira. O tempo de intervalo total de desenvolvimento, contabilizado a partir da primeira pupa até a emergência do adulto foi de 5 dias, compreendendo doze coletas realizadas em 0, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 54, 72, 78, 96 e 99 horas (n = 84).

As pupas fixadas foram dissecadas com auxílio de pinça anatômica e agulhas hipodérmicas de 25 mm x 0,7 mm (22G x 1") e 0,36 mm x 0,13 mm (28G ½) sob estereomicroscópio Olympus SZ51, fotografadas posteriormente, em estereomicroscópio com câmera acoplada e software Motic® para obtenção de imagem. Ao término do procedimento, as pupas foram preservadas em etanol a 70% e depositadas no LED/UNIRIO.

Na descrição do desenvolvimento intrapupal, foi utilizada a terminologia recomendada por Fraenkel & Bhaskaran (1973) e Cepeda-Palacios & Scholl (2000) com o reconhecimento de fases: pupariação, apólise larval-pupal, criptocefálica, fanerocefálica, adulto farado, imago e emergência.

Resultados

Cinco dias após a transferência para a dieta, as larvas de 3º estádio (L3) de *Chrysomya albiceps*, iniciaram o abandono da dieta. Determinadas alterações comportamentais e morfológicas foram observadas caracterizando o processo de pupariação visto a seguir.

Pupariação: Após o abandono da dieta, as larvas de 3º estádio (L3) (pré-pupas) mantiveram-se agrupadas e enterradas na maravalha. Ao longo do dia observou-se que a cutícula branca e lustrosa vista nas larvas de 2º estádio (L2), sofreu opacidade e escurecimento gradativo (na sequência: amarelo, castanho e marrom) e surgimento de pigmentação na parte ventral das larvas de 3º estádio. O processo de esclerorização da cutícula foi iniciado e o corpo, antes flexível e de aspecto fusiforme, tornou-se abaulado (convexo), gradativamente rígido, resultando em um encurtamento da larva, com retração do aparelho bucal, até perder completamente a mobilidade quando manipulado, em razão do enrijecimento da cutícula da pré-pupa e início da formação da cutícula do pupário. O processo de pupariação durou 1 dia (24 horas).

Primeiro dia: Ao serem dissecadas, as primeiras pupas de 0 hora e 2 horas (Figura 1 A; B) apresentaram uma cutícula fina e translúcida recobrindo o corpo, ainda com aspecto semelhante à forma larval, fortemente unida ao pupário, assim como a parte bucal, não sendo possível remoção completa da pupa de dentro do pupário durante o processo de dissecção na fase de apólise larval-pupal.

Cessada a apólise, rapidamente teve início a fase criptocefálica. As pupas observadas com 4 horas de desenvolvimento (Figura B) apresentaram cutícula pupal desprendida do pupário, corpo sem segmentação, sendo possível a visualização do aparelho cefalofaríngeo. Após 6 horas de desenvolvimento, as alterações visualizadas foram: a coloração da cutícula, antes translúcida, tornou-se amarelo e opaca; o corpo conserva a forma semelhante ao pupário (sem divisão) e o aparelho cefalofaríngeo ainda permanece unido aos segmentos torácicos, caracterizando a fase fanerocefálica (Figura 1 C; D). As fases de apólise larval-pupal, criptocefálica e fanerocefálica ocorreram com poucas horas de diferença no decorrer do primeiro dia.

Segundo dia: As pupas do segundo dia analisadas apresentaram o início da maturação da fase adulta, caracterizando-se a fase de adulto farado, a fase mais longa observada. Esta fase teve início no segundo dia, 24 horas após o início da pupariação e estendeu-se até parte o quinto dia, totalizando 96 horas de desenvolvimento. Entre as modificações morfológicas observadas estão à divisão corporal, a composição e as diferentes colorações dos olhos com variação de branco (translúcido) a vermelho.

As mudanças descritas a seguir foram observadas nas pupas com 24 horas de desenvolvimento: O corpo apresenta segmentação em três partes (cabeça, tórax e abdômen) e coloração uniforme. A cabeça se evagina do corpo com aparelho bucal fusionado e olhos diferenciados em duas partes, sem coloração (translúcidos). Pernas e asas estão diferenciadas na porção torácica (Figura 1 E; F). Tais segmentações foram as mesmas, observadas nas pupas com 30h de desenvolvimento.

Terceiro dia: Após 48 horas, os olhos antes separados em duas porções transparentes, começaram a apresentar delimitação característica de olhos compostos, com a formação dos omatídeos e coloração alaranjada; ocelos não visíveis; as antenas e sutura frontal da fronte estão aparentes; aparelho bucal fusionado. Uma pigmentação diferenciada começa a surgir no tórax e abdômen; pequenas cerdas recobrindo o abdômen e cerdas marginais escutelares visíveis. Observa-se também o início da formação da margem costal das asas (Figura 1 G; H).

Alguns segmentos antes fusionados estão individualizados nas pupas de 54 horas. Na cabeça estão visíveis os ocelos e as aristas, e tem início a divisão do aparelho bucal. No tórax, o surgimento das cerdas dorsocentrais, acrosticais, supralares e escutelares (marginais, pré-apicais e apicais); as pernas apresentam a segmentação característica definida (garras, tarso e tíbia visíveis), visivelmente cerdosa; formação do tegumento diferenciado (membranoso) nas asas, com a margem costal formada e cerdosa (Fig. 2 A; B).

Quarto dia: A coloração vermelha dos olhos característica do adulto pode ser vista nas pupas com 72 horas de desenvolvimento. As antenas e aristas desenvolvidas e visíveis; cerdas começam a surgir no aparelho bucal, já formado e individualizado (clípeo, haustelo, lábio, labela e palpo maxilar); tórax e abdômen cerdosos; cerdas quetotáxicas plenamente desenvolvidas e abdômen com listras horizontais características em desenvolvimento; asas com tegumento membranoso (Figura 2 C; D). A diferença observada nas pupas de 78 horas foi o início de escurecimento das listras abdominais.

Quinto dia: Com 96 horas de desenvolvimento, a região da face e olhos está plenamente desenvolvida; cerdas revestem todo o corpo, especialmente, torácica, que começa a apresentar uma coloração escurecida; listras abdominais e terminália desenvolvidas (Fig. 2 E; G). O término da fase de adulto farado foi observado nas pupas com 96h de desenvolvimento. Algumas pupas dissecadas com 99 horas de desenvolvimento apresentavam o adulto completamente desenvolvido e pronto para abandonar o pupário, sendo possível observar a projeção do saco ptilineal (Figura 3 H; I). Entretanto, também foi observado a presença de adultos recém emergidos (Figura 3 J).

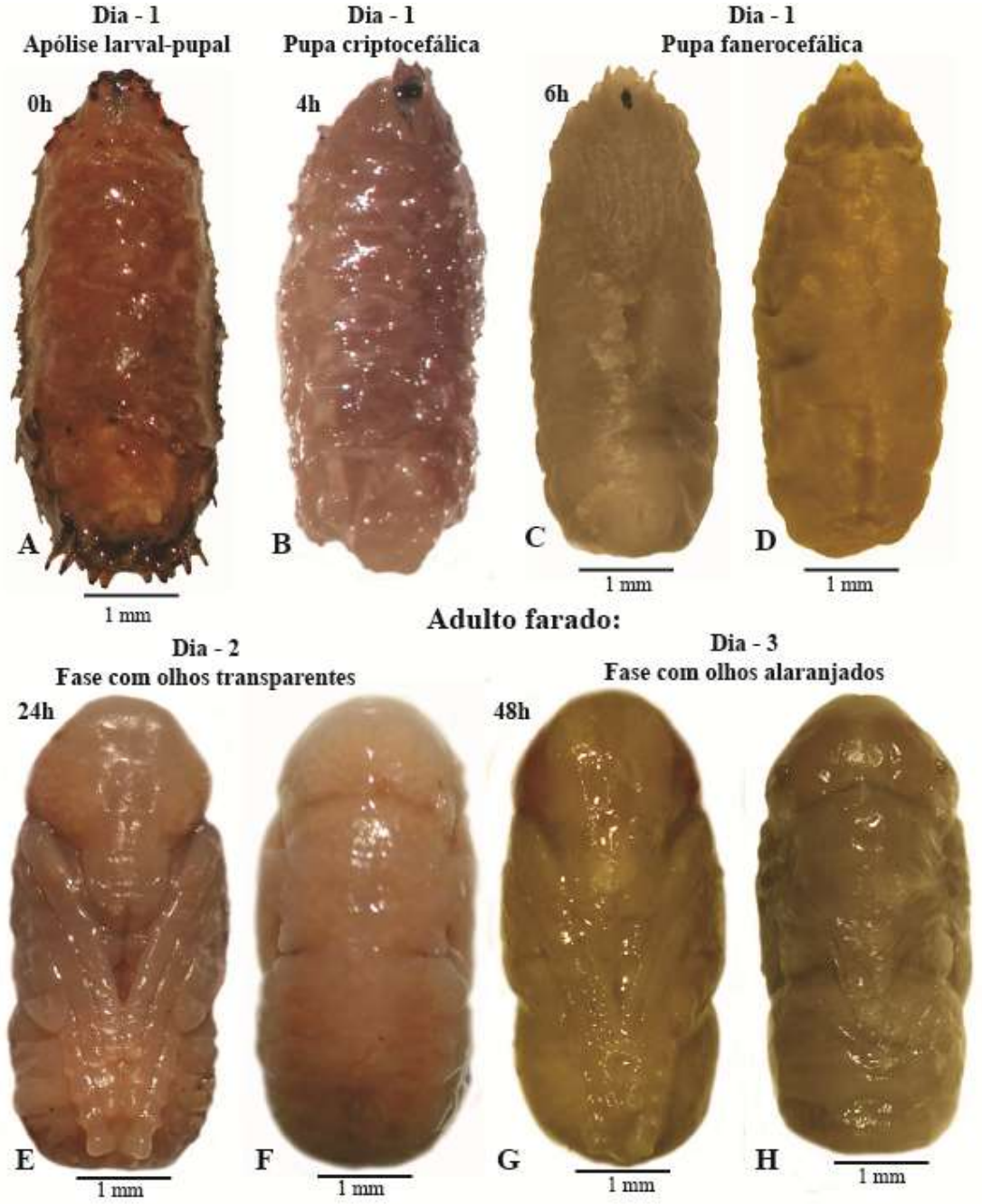

Figura 1: Desenvolvimento intrapupal de *Chrysomya albiceps* sob temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Pupa de 0h em vista ventral (A); de 4h em vista ventral (B); de 6h em vista frontal (C) e dorsal (D); de 24h em vista ventral (E) e dorsal (F); de 48h em vista ventral (G) e dorsal (H).

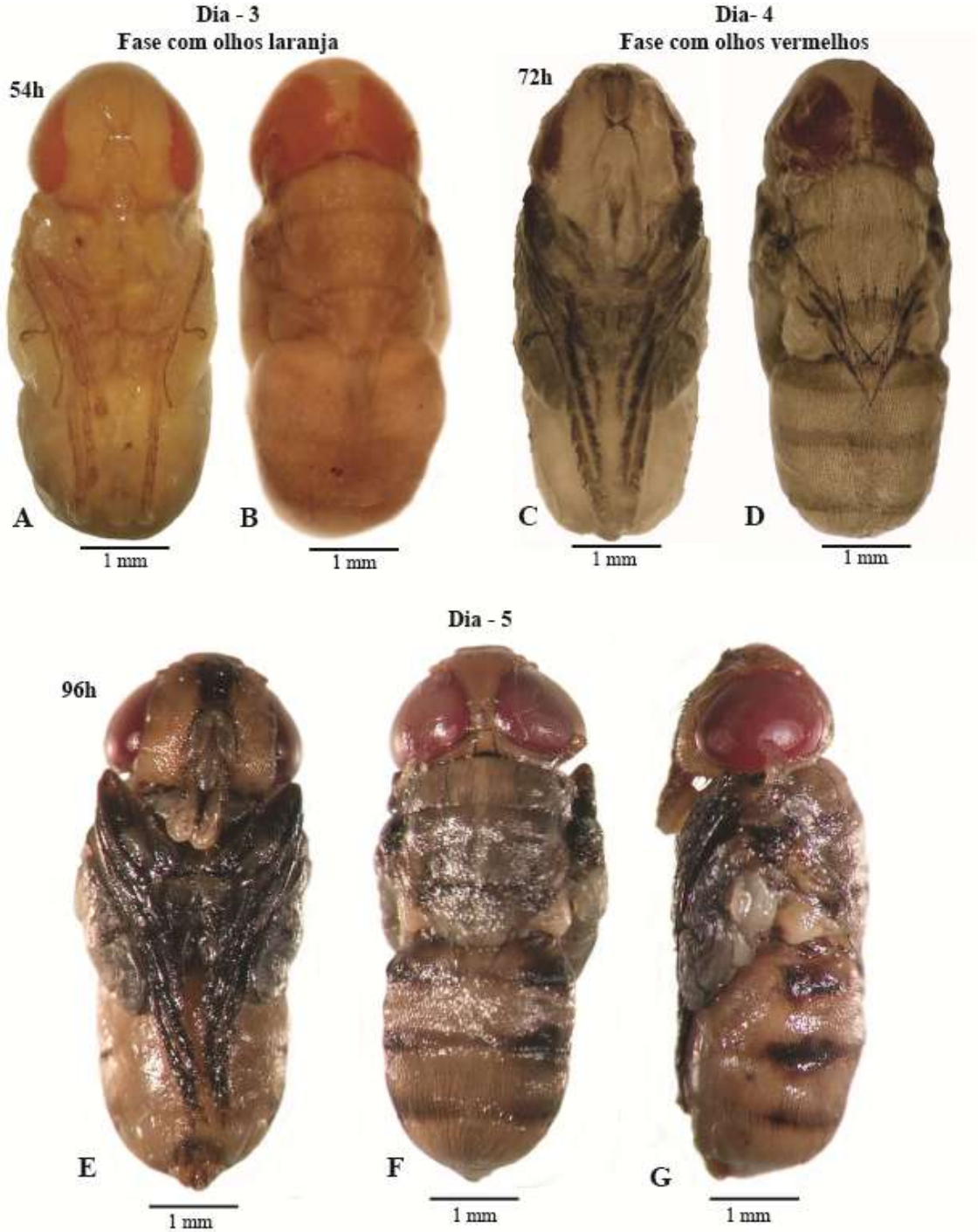

Figura 2: Desenvolvimento intrapupal de *Chrysomya albiceps* sob temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Pupas de 54h em vista ventral (A) e dorsal (B); de 72h em vista frontal (C) e dorsal (D); de 96h em vista ventral (E), dorsal (F) e lateral (G).

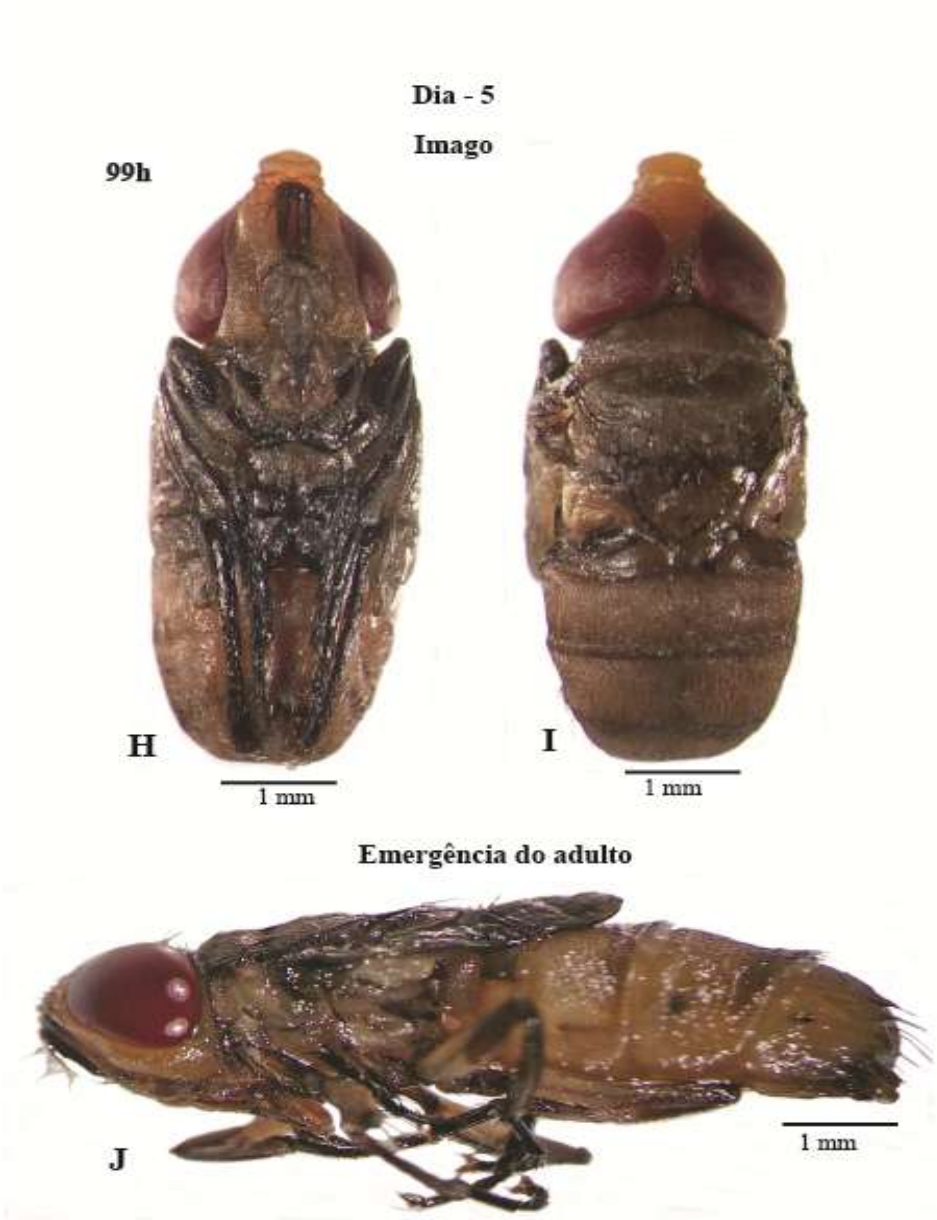

Figura 3: Desenvolvimento intrapupal de *Chrysomya albiceps* sob temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase. Pupas de 99h em vista ventral (H), dorsal (I) e adulto recém emergido em vista lateral (J).

Discussão

A metamorfose é uma das estratégias evolutivas mais utilizadas pelos animais, e contribuiu para dispersão de muitos, especialmente, os insetos. Entre os holometábolos, graças à possibilidade de exploração de diferentes habitas, a metamorfose contribuiu para que não houvesse uma competição por recursos necessários à sua reprodução das espécies entre as fases de larva e adulto (Truman & Riddiford, 1999).

Estudos envolvendo o desenvolvimento larval de espécies de interesse forense têm crescido nos últimos anos. Assim como, os estudos relacionados à morfologia e cronologia

das pupas (Tabela 1). O conhecimento a respeito das modificações ocorridas durante o processo intrapupal e a comparação da cronologia das diferentes espécies forenses, podem contribuir como importantes ferramentas na tentativa de redução da imprecisão do cálculo de IPM, quando realizado pelo método entomológico, já que diversos estudos do gênero relatam a presença de imaturos de espécies necrófagas em diferentes fases de desenvolvimento (Kosman et al., 2011; Leal et al., 2013; Li et al., 2016).

Neste estudo, descrevemos o desenvolvimento intrapupal de *C. albiceps*, uma das espécies de califorídeo de grande importância para a entomologia forense, narrando às alterações morfológicas inerentes das fases de desenvolvimento da pupa usando a cronologia em dias e utilizando uma temperatura constante com variação de dois graus entre o dia/noite, simulando o que normalmente registra-se na natureza em nossa região geográfica com a descrição das fases de desenvolvimento intrapupal de acordo com as etapas de desenvolvimento vistas no estudo de Fraenkel & Bhaskaran (1973), definidas como apólise larval-pupal, pupa criptocefálica, pupa fanerocefálica, adulto farado e emergência.

Trabalho semelhante foi realizado para caracterizar o desenvolvimento intrapupal de *C. albiceps* em horas (Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012) criada em carne moída a 26ºC±1.0ºC UR 60±10% e 12 horas de fotofase. Alguns aspectos metodológicos entre o presente estudo e do estudo supracitado diferem, como: a dieta larval, as condições ambientais, o método de conservação das pupas, entre outros, o que resultou em diferenças como as características morfológicas intrapupais e a cronologia observada em Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012), a respeito das fases de pré-pupa, que ocorreu em 36 horas, adulto farado em 81 horas e tempo total de desenvolvimento em 90 horas, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo. Observou-se no presente estudo uma fase de pupariação mais curta de 1 dia (24 horas), uma fase de adulto farado e emergência mais longa de 5 dias (96 horas) e (99 horas).

Em estudos relacionados à biologia de *C. albiceps* em carne equina, Queiroz & Milward-de-Azevedo (1991), trabalhando com temperaturas de 27ºC e 32ºC UR 60±10% e 14 horas de fotofase, observaram que a 27ºC, a fase de pré-pupa variou de 1 a 2 dias e de pupa entre 4 a 7 dias. Queiroz (1996) utilizando diferentes temperaturas, entre elas, 27ºC UR 60±10% e 14 horas de fotofase, observou a fase de pré-pupa com duração de 1 dia e desenvolvimento pupal entre 4 a 5 dias.

Em estudos com outras três espécies do gênero revelaram diferenças no tempo de desenvolvimento pupal, o que já era esperado. Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010) ao estudarem o desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) alimentada em

carne bovina moída a 26±24ºC UR 62±8,4% e 14 horas de fotofase, obtiveram uma fase pupal com duração de 4 dias, enquanto Gabre et al., (2005) também utilizando carne bovina como substrato a 26ºC UR 60±70% e 14 horas fotofase, obtiveram uma fase pupal de 5,3 dias. Flores et al., (2014) analisando o desenvolvimento de *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842) em três substratos e três temperaturas, entre elas, 28,3ºC UR 75-80% e 14:10 horas de fotofase, observaram que o desenvolvimento pupal em músculo suíno ocorreu em menor tempo (84 horas), enquanto em músculo canino e músculo equino ocorreu em 90 horas e 104 horas, respectivamente. Proença et al., (2014) no estudo intrapupal de *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1819) utilizando moela de frango como substrato a 27ºC dia/25ºC noite UR 60±10% e 14:10 horas de fotofase, observaram o desenvolvimento das pupas em 5 dias. Porém, o tempo de desenvolvimento das fases foi maior do que o visto em ambos os estudos de *C. albiceps* (Tabela 1).

Determinados fatores relacionados à criação dos dípteros em laboratório, como o substrato larval e as diferentes latitudes geográficas em que as populações se encontram podem influenciar nos resultados do desenvolvimento de uma mesma espécie (Richards et al., 2008, Li et al., 2016). Entre os estudos supracitados com as espécies do gênero *Chrysomya*, considerando o tempo de desenvolvimento pupal total, as variações de temperatura e substratos (bovino e frango), foi observado um tempo médio de desenvolvimento de aproximadamente 5 dias. Essa média pode estar relacionada ao fato de as espécies pertencerem ao mesmo gênero e apresentarem os mesmos hábitos alimentares (Proença et al., 2014).

Em outros estudos com diferentes espécies de califorídeos e de outras famílias, em diferentes condições de temperaturas e substratos larvais (Tabela 1), é possível observar uma variação no tempo de desenvolvimento, consideravelmente mais longo em *Sarcophaga (Neobellieria) bulata* Parker, 1916 (Fraenkel & Bhaskaran, 1973); *Oestrus ovis* (Linnaeus, 1758) (Cepeda-Palacios & Sholl, 2000); *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Karabery & Sert, 2014) e *Sarcophaga dux* Thomson, 1869 (Kanti-Sinha & Mahato, 2016), com maior ciclo visto em *S. bulata* (Fraenkel & Bhaskaran, 1973). Uma fase de adulto farado, mais curta foi observada em *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Fraenkel & Bhaskaran, 1973), em *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Hodgetts et al., 1977), e em *Peckia (Pattonella) intermutans* (Walker, 1861) e *Peckia (Sarcodexia) lambens* (Wiedemann, 1830) (Souza-Cunha, 2014).

Tabela 1: Comparação entre a cronologia do desenvolvimento intrapupal (em horas) de *Chrysomya albiceps* após a pupariação com a de outros califorídeos e muscóides de interesse forense em diferentes temperaturas e substratos larvais.

	Etapas de desenvolvimento (horas)				
Espécies/ Temperatura (ºC)/dieta larval	**Criptocefálica**	**Fanerocefálica**	**Adulto farado**	**Imago/Emergência**	**Referências**
Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819) (28ºC dia/26ºC noite)/ pulmão suíno	4-6	6-10	24-96	99	Presente estudo
Musca domestica Linnaeus, 1758 (30ºC)/ não citado	4-9	16-18	28-30	96-110	Fraenkel & Bhaskaran (1973)
Sarcophaga (Neobellieria) bulata Parker, 1916 (24ºC)/ não citado	20-28	46-48	72-96	324-348	Fraenkel & Bhaskaran (1973)
Drosophila melanogaster Meigen, 1830 (25ºC)/pasta de levedura	4-6	12	24	76	Hodgetts et al., (1977)
Oestrus ovis (Linnaeus, 1758) (24ºC)/ carne de cabra	48	120	310	528	Cepeda-Palacios & Sholl (2000)
Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819) (26ºC±1ºC)/ carne bovina	3-6	6-9	81	90	Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012)
Chrysomya putoria (Wiedemann, 1830) (27ºC dia/25ºC noite)/ moela de frango	18	24-48	66-96	116	Proença et al., (2014)
Lucilia sericata (Meigen, 1826) (25ºC)/ fígado	11-21	22-47	69-167	175	Karabey & Sert (2014)
Peckia (Pattonella) intermutans (Walker, 1861) (26ºC)/ carne moída	6	30	24-68	180	Souza-Cunha (2014)
Peckia (Sarcodexia) lambens Wiedemann, 1830 (26ºC)/ carne moída	3	3	6-54	252	Souza-Cunha (2014)
Cochliomya macellaria (Fabricius, 1775) (23ºC)/ carne bovina	6	3	105	120	Barros-Cordeiro et al., (2016)
Hermetia illucens (Fabricius, 1775) (23ºC)/ carne bovina	6	3	105	120	Barros-Cordeiro et al., (2016)
Lucilia cuprina Wiedemann, 1830 (23ºC)/ carne bovina	9	3	192	210	Barros-Cordeiro et al., (2016)
Sarcophaga dux Thomson, 1869 (22ºC)/ carne de frango	24	48	192	240	Kanti-Sinha & Mahato (2016)

As divergências observadas são importantes e podem contribuir como dados básicos a serem aplicados na entomologia forense na tentativa de reduzir a imprecisão estimativa do IPM quando as pupas de *C. albiceps* forem utilizadas. Importante salientar que a dispersão após o abandono da dieta é um comportamento comum da maioria das espécies necrófagas e faz parte do processo de pupariação. Se elas não conseguirem ambiente propício para empuparem, esse tempo de pupariação pode ser retardado (Li et al., 2016). Outro fator importante, relacionado a essa dispersão e que pode contribuir para um cálculo de IPM reduzido por parte do entomologista forense, é incapacidade de recuperação das pupas que estiverem afastadas do cadáver (Greenberg, 1991).

Agradecimentos

A Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical) da UNIRIO, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), ao Laboratório de Diptera do Museu Nacional (UFRJ), ao Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro de Agentes Zoonóticos e Antroponóticos (LIPHAZA/UNIRIO) e ao Jardim Zoológico do Rio de Janeiro (RIOZOO).

Referências bibliográficas

Aguiar-Coelho VM, Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. 1995. Associações entre larvas de *Cochllomyia macellaria* (Fabricius) e *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoologia* 12(4): 983-990.

Aguiar-Coelho VM & Milward-de-Azevedo EMV. 1998. Combined rearing of *Cuchliomyia macellaria* (Fabr.), *Chrysomya megacephala* (Fabr.) and *Chrysomya albiceps* (Wied.) (Dipt., Calliphoridae) under laboratory conditions. *Journal Applied Entomology* 122: 551-554.

Barros-Cordeiro KB & PuJol-Luz JR. 2010. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. *Papéis Avulsos de Zoologia* 50(47): 709-717.

Barros-Cordeiros KB, Pujol-Luz JR, Name KPO & Báo SN. 2016. Intra-puparial development of the *Cochliomyia macellaria* and *Lucillia cuprina* (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 60(4): 1-7. http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.06.009

Beuter L & Mendes J. 2013. Development of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) in Different Pig Tissues. *Neotropical Entomology* 43(4): 426-430.

Byrd JH & Castner JL. 2009. *Forensic Entomology: the utility of Arthropods in legal investigations*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC. 418p.

Cepeda-Palacios R & Scholl PJ. 2000. Intra-puparial development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). *Journal Medical Entomology* 37: 239-245.

Corrêa EC, Koller WW & Barros ATM. 2010. Abundância relativa e sazonalidade de espécies de *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Pantanal Sul-Mato-Grossense, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 19 (2): 85-88.

Costa C, Ide S & Simonka CE. 2006. *Insetos Imautos: metamorfose e identificação*. Holos Ed. 249p.

Dallavecchia DL, Ferraz ACP, Miranda GS, Silva AS & Magalhães-de-Aguiar V. 2015. Comparative Study Between Chicken Gizzards and Beef as Diets and it's Influences on the Post Embryonic Development and Longevity of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *EntomoBrasilis* 8 (1): 17-23.

Estrada DA, Grella MND, Thyssen PJ & Linhares AX. 2009. Taxa de Desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em Dieta Artificial Acrescida de Tecido Animal para Uso Forense. *Neotropical Entomology* 38(2): 203-207.

Ferrari AC, Soares ATC, Guimarães MA & Thyssen PJ. 2008. Efeito da testosterona no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Medicina de Ribeirão Preto* 41 (1): 30-4.

Ferraz ACP, Dellavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Silva Filho RG & Aguiar-Coelho VM. 2011. Alternative diets for *Chrysomya putoria*, an Old World screwworm fly. *Journal Insect Science* 12:43.

Ferraz ACP. 2012. *Avaliação de novas dietas e o efeito da adição de antibióticos no desenvolvimento de Chrysomya albiceps (Wiedemann, 1819) e Chrysomya putoria (Wiedemann, 1818) (Diptera: Calliphoridae).* [Dissertação]. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Silva-Filho RG & Aguiar-Coelho VM. 2014a. Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of an Old World screwworm fly, *Chrysomya putoria*. *Journal Insect Science* 14(3): 1-11.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Figueiredo AL, Proença B, Silva-Filho RG & Aguiar VM. 2014b. Evaluation of the Effects of the Antibiotics Gentamicin on the Postembryonic Development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal Insect Science* 14(279): 1-5.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Silva-Filho RG & Aguiar VM. 2016. Post-embriononic development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) on a diet containing ampicillin in different concentrations. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 88 (1); 106-116.

Flores M, Longnecker M & Tomberlin JK. 2014. Effects of temperature and tissue type on *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) (Macquart) development. *Forensic Science* 245: 24-29.

Furlanetto SMP, Campos MLC, Hársi CM, Buralli GM & Ishiata GK. 1984. Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae) no Brasil. *Revista de Microbiologia* 15:170-174.

Fraenkel G & Bhaskaran G. 1973. Pupariation and Pupation in Cyclorrhaphous Flies (Diptera): Terminology and Interpretation. *Annals of the Entomologial Society of America* 66: 418-422.

Gabre RM, Adham FK & Chi H. 2005. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). *Acta Oecologica* 27: 179-183.

Goff ML. 1993. Estimation of postmortem interval using arthropod development and succession patterns. *Forensic Science Review* 5:81-94.

Gullan PJ & Cranston PS. 2007. *Os Insetos: um resumo de entomologia*. 3rd ed. Roca. 440p.

Greenberg B. 1991. Flies as Forensic Indicators. *Journal Medical Entomology* 28(5): 565-577.

Hinton HE. 1948. On the origin and function of the pupal stage. *Ecological Entomology* 99(12): 395-409.

Hodgetts RB, Sage B & O'Connor JD. 1977. Ecdysone titers during postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 60: 310-317.

Leal JLF, Oliveira TC, Carneiro SCAS, Santos ABR & Vasconcelos BCE. 2013. Estimativa do intervalo pós-morte em cadáveres congelados através da entomologia. *Revista Cirúrgica de Traumatologia Buco-Maxilo-Facial* 13(3):41-48.

Li L, Wang Y & Wang J. 2016. Intra-puparial development and age estimation of forensically important *Hermetia illucens* (L.). *Journal Asian-Pacific Entomology* 19: 233-237. http://dx.doi.org/10.1016/j.aspen.2016.01.006

Queiroz MMC & Milward-de-Azevedo EMV. 1991. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. *Revista Brasileira de Zoologia* 8 (1/2/3/4): 75-84.

Queiroz MMC. 1996. Temperature requirements of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) under laboratory conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91(6): 785-788.

Kanti-Sinha S & Mahato S. 2016. Intra-puparial development of flesh fly *Sarcophaga dux* (Thomson) (Diptera, Sarcophagidae). *Current Science* 111(6): 1063-1070.

Karabey T & Sert O. 2014. The analysis of pupal development period in Lucilia sericata (Diptera: Calliphoridae) forensically important insect. *International Journal of Legal Medicine* doi:10.1007/s00414-014-0968-2

Kosmann C, Macedo MP, Barbosa TAF & Pujol-Luz JR. 2011. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. Ver. Bras. Entomologia 55(4): 621-623.

Rabêlo KCN, Thyssen PJ, Salgado RL, Araújo MSC & Vasconcelos SD. 2011. Bionomics of two forensically important blowfly species *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) reared on four types of diet. *Forensic Science International* 210: 257-262.

Richards CS, Paterson ID & Villet MH. 2008. Estimating the age of immature *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae), correcting for temperature and geographical latitude. *International Journal of Legal Medicine* 122: 271–279.

Proença B, Ribeiro AC, Luz RT, Magalhães-de-Aguiar VM, Maia VC & Couri MS. 2014. Intrapuparial Development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal Medical Entomology* 51(5): 908-914.

Pujol-Luz JR & Barros-Cordeiros KB. 2012. Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 56(3): 269–272.

Soulsby EJL. 1969. *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. London: Tyndall and Cassell. 824p.

Souza-Cunha AMJ & Pujol-Luz JR. 2014. *Desenvolvimento intra-pupal de Peckia intermutans e Peckia lambens (Diptera, Sarcophagidae)*. [Dissertação]. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. 42p.

Truman & Riddiford. 1999. The origins of insects metamorphosis. *Nature* 401: 447-452.

Vairo KP, Corr RC, Lecheta MC, Caneparo MF, Mise K M, Preti D, Carvalho CJB, Almeida LM & Moura MO. 2014. Forensic Use of A Subtropical Blowfly: The First Case Indicating Minimum Postmortem Interval (mPMI) in Southern Brazil and First Record of *Sarconesia Chlorogaster* from a Human Corpse. *Journal Forensic Science* 60(1): 257-260.

Discussão Geral

A desaceleração no desenvolvimento das larvas criadas em fígado suíno (T1), pode estar relacionada à função do órgão. Por atuar na filtração de toxinas, hormônios e drogas carreadas pelo sangue, é possível que a presença de eventuais resíduos no tecido utilizado, tenha influenciado na taxa de desenvolvimento do estágio larval e total (de neolarva a adulto).

Levot et al., 1979, ao estudarem o desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* e *C. rufifacies*, a 27ºC/28°C, criadas em fígado bovino, observaram que larvas maduras com massa corporal de 40.2 mg não puparam. Não completando o ciclo de desenvolvimento.

Posteriormente, Queiroz & Milward-de-Azevedo (1991) estudaram o desenvolvimento de *C. albiceps*, em carne equina a 27ºC e, observaram que larvas maduras com peso entre 38-42 mg, puparam, mas não originariam adultos, estabelecendo a partir deste resultado, em reforço ao observado por Levot et al., (1979), o valor de massa corporal mínima necessária para originar a adultos em 42 mg.

Diferente dos resultados obtidos por Levot et al., (1979) e Queiroz & Milward-de-Azevedo (1991), neste estudo, as larvas de *C. putoria* criadas em fígado suíno (T1), com massa corporal (40.1 mg), puparam e originaram adultos, mantendo a viabilidade de adultos, com 100% de normalidade, acima de 60%. Embora sejam do mesmo gênero, devemos considerar o fato de serem espécies diferentes, testadas sob diferentes condições ambientais e substratos.

No estudo de C. albiceps, foi observada alteração da taxa de desenvolvimento larval e total (de neolarva a adulto), e massa corporal, das larvas alimentadas na dieta controle (músculo bovino), com tempo de desenvolvimento de larvas em 7,9 dias e adultos em 12,2 dias, mantendo-se acima do esperado. Outros ensaios utilizando condições de temperatura próximas às utilizadas, e carne moída (bovina e suína) como substrato, obtiveram menor tempo de desenvolvimento larval e maior valor de massa corporal.

Mello et al., (2012) analisaram *C. albiceps* em carne moída bovina, a 27±1ºC UR 60±10% e 12h de fotofase, e obtiveram desenvolvimento larval de 5,7 dias e massa corporal de 70,0 mg. Estrada et al., (2009) estudou *C. albiceps* em carne moída bovina a 27±1ºC UR 70±10% e 12h de fotofase, e obtiveram desenvolvimento larval de 5 dias e massa corporal 84,9 mg. Beuter & Mendes (2013) compararam o desempenho de *C. albiceps* em quatro tecidos de suíno, entre eles, carne de suíno moída, a 25±1ºC UR 70±10%; 12h de fotofase, e observaram desenvolvimento larval de 4 dias e massa corporal de 62,5 mg.

O menor tempo de desenvolvimento observado em estudos anteriores pode estar relacionado à consistência do tecido testado, já que a carne foi utilizada em cubos. Neste caso, a carne moída bovina pode ter sido mais facilmente digerida pelas larvas.

Outro possível fator pode estar relacionado à maior quantidade de lipídios presente na carne moída bovina, que pode ter favorecido a diluição de vitaminas lipossolúveis contribuído para maior assimilação de determinados nutrientes (Flemming et al., 2003).

Os maiores percentuais de fêmeas em ambas as dietas, pode ter sido influenciado pela monogenia da espécie, podendo ocorrer em uma mesma geração apenas machos ou apenas fêmeas (Ullerich, 1953; Queiroz, 1991; Queiroz et al., 1996).

No estudo do desenvolvimento intrapupal de *C. albiceps*, a fase criptocefálica ocorreu de 4-6 horas após a pupariação, a fase fanerocefálica de 6-10 horas, a fase de adulto farado de 24 a 96 horas e a fase de imago/ emergência a 99 horas da pupariação.

Em trabalho semelhante, Pujol-Luz & Barros-Cordeiro (2012) utilizando carne moída como dieta larval, a 26ºC±1.0ºC, UR 60±10% e 12h de fotoperíodo, obtiveram cronologia diferente da observado no presente estudo. As fases de pré-pupa, adulto farado e desenvolvimento total ocorrem em 36h, 81h e 90h, respectivamente.

Analizando o desenvolvimento de *C. albiceps* a 27ºC 60±10% UR e 14h de fotoperíodo, Queiroz & Milward-de-Azevedo (1991), obtiveram a fase de pré-pupa variando de 1 a 2 dias e de pupa entre 4 a 7 dias. Queiroz (1996), em estudo posterior com *C. albicpes*, a 27ºC, UR 60±10% e 14h de fotoperíodo, observou a fase de pré-pupa com duração de 1 dia e desenvolvimento pupal entre 4 a 5 dias.

Proença et al., (2014) no estudo intrapupal de *C. putoria* utilizando moela de frango a 27ºC dia/25ºC noite, UR 60±10% e 14:10h de fotoperíodo, observaram o desenvolvimento das pupas em 5 dias. Porém, o tempo de desenvolvimento das fases foi maior do que o visto em ambos os estudos de *C. albiceps*.

Conclusões Gerais

a) No estudo dos diferentes tecidos de origem animal: fígado suíno, pulmão suíno, coração suíno, músculo suíno, coração bovino, pulmão bovino e músculo bovino a temperatura de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase, revela que o fígado suíno alterou significativamente a taxa de desenvolvimento larval e duração total comparado aos insetos criados nos demais tratamentos. Larvas alimentadas com pulmão suíno apresentam-se significativamente mais pesadas em relação a larvas alimentadas em fígado suíno, músculo suíno, pulmão bovino e músculo bovino.

b) Dos os sete tecidos testados, pulmão suíno, coração suíno, músculo suíno, coração bovino, pulmão bovino e músculo bovino, demonstram potencial nutricional e influência positiva para o desenvolvimento de imaturos de *C. putoria* sob condições artificiais, baseado no desenvolvimento larval, pupal e total, massa corporal das lavas maduras e percentual de viabilidade e razão sexual.

c) No desenvolvimento pós-embrionário de *C. albiceps* em músculo suíno e pulmão suíno sob as temperaturas 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10% e 12h de fotofase, indica que pulmão suíno apresenta melhor desempenho comparado à dieta controle (músculo bovino) obtendo o menor desenvolvimento larval, pupal e total, maior média de massa corporal, e percentual de viabilidade em todos os estágios, comparado à dieta controle (músculo bovino).

d) Evidencia-se a necessidade de se levar em consideração os tecidos em que desenvolveram as larvas nos cadáveres para maior precisão para o cálculo do IPM.

e) Na caracterização do desenvolvimento intrapupal de *C. albiceps*, cujas larvas foram alimentadas em pulmão suíno, mantidas até a emergência dos adultos sob temperatura controlada de 28ºC dia/ 26ºC noite, UR 70±10 % e 12h de fotofase, a fase criptocefálica ocorre de 4-6 horas após a pupariação, a fase fanerocefálica de 6-10 horas, a fase de adulto farado de 24 a 96 horas e a fase de adulto/emergência a 99 horas da pupariação.

Referências Bibliográficas Gerais

Alves ACF, Santos WE & Creão-Duarte AJ. 2014. Diptera (Insecta) de importância forense da região Neotropical. *Entomotropica* 29 (2): 77-94.

Amendt J, Krette KR & Zehner R. 2004. *Forensic Entomolgy* 91: 51-65. doi 10.1007/s00114-003-0493-5

Andrade HA, Varela-Freire AA, Batista MJA & Medeiros JF. 2005. Calliphoridae (Diptera) Coletados em Cadáveres Humanos no Rio Grande do Norte. *Neotropical Entomology* 34 (5): 855-856.

Avancini RMP. 1986. Fases de desenvolvimento ovariano em seis espécies de Calliphoridae (Diptera). *Revista Brasileira de Entomologia* 30 (2): 359-364.

Baltazar FN, Cavallari ML, Carvalho E, Tolezano JE & Muñoz DR. 2011. Entomologia forense e saúde pública: relevância e aplicabilidade. *Boletim Epidemiológico Paulista* 8 (87): 14-25.

Barros-Cordeiros KB, Pujol-Luz JR, Name KPO & Báo SN. 2016. Intra-puparial development of the *Cochliomyia macellaria* and *Lucillia cuprina* (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 60 (4): 1-7. doi.org/10.1016/j.rbe.2016.06.009

Beuter L & Mendes J. 2013. Development of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) in Different Pig Tissues. *Neotropical Entomology* 43(4): 426-430.

Carvalho ML & Linhares X. 2001. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest area in Southeastern Brazil. *Journal of Forensic Sciences* 46 (3): 604-608. doi.org/10.1520/JFS15011J

Carvalho CJB De, Rafael JA, Couri MS & Silva VC. 2012. Diptera Linnaeus, 1758 pp.701-744. In: Rafael JA, Melo GAR, Carvalho CJB De, Casari SA & Constantino R. (eds.). *Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia*. Ribeirão Preto: Holos Editora. 810p.

Carvalho CJB De & Mello-Patiu CA. 2008. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. *Revista Brasileira de Entomologia* 52 (3): 396-406.

Carvalho LML, Linhares AX & Palhares FAB. 2012. The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera:

Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. *Forensic Science International* 220: 27-32.

Castañeda-Vildózola A, Equiua-Martínez A, Valdés-Carrasco J, Barrientos-Priego AF, Ish-Am G & Gazit S. 1999. Insectos polinizadores del aguacatero em lós estados do México y Michoacán. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 129-136.

Cavalcante ANP, Dal-Bó D, Creão-Duarte AJ & Farias RCAP. 2015. Espécies de Calliphoridae (Diptera) associadas a carcaças de *Sus scrofa* Linnaeus,1758 em área de restinga na Paraíba, Brasil, e espécies de importância forense para a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM). *Entomotropica* 30 (15): 150-159.

Centeio NAG. 2011. Entomologia forense da vida selvagem: morfologia comparada de estádios imaturos e adultos de Calliphoridae recolhidos em cadáveres de fauna selvagem. Dissertação de Mestrado. Universidade de Lisboa. 77p.

Centeno N, Serrán M, Gomez-Otero J & Weiler N. 2009. An ancient assemblage of scavenger insects in Patagonia (Argentina). *Entomologica Americana* 115 (1): 77-80.

Clark K, Evans L & Wall R. 2006. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Science International* 156: 145-149.

Cruz JD, Silva CC & Raposo-Filho JR. 2014. Dipterofauna associada a cadáver de porco domestico *Sus scrofa domesticus* (Linnaeus, 1758) na cidade de Itabaianinha, estado de Sergipe. *Caderno de Graduação - Ciências Biológicas e da Saúde Unit* 2 (1): 155-173.

Dallavecchia DL, Proença BN & Coelho VMA. 2011. Bioterapia: uma Alternativa Eficiente para o Tratamento de Lesões Cutâneas. *Revista de Pesquisa; cuidado é fundamental online* 3 (3): 2071-79.

Dear JPA. 1985. Revision of the new world Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Zoologia* 3 (3): 109-169.

Denlinger DL & Zdárek J. 1994. Metamorphosis behavior of flies. *Annual Review of Entomology* 39: 243-266.

Echeverri MIW, Álvarez CR, Higuita SEH, Idárraga JCW & Franco MME. 2010. *Lucilia eximia* (Diptera: Calliphoridae), una nueva alternativa para la terapia larval y reporte de casos en Colombia. *IATREIA* 23 (2): 107-116.

Fares NH, Melo DV, Stucchi N, Carvalhosa AA, Castro PHS & Siqueira CRB. 2005. Miíase em paciente com 10 anos de idade: relato de caso clínico e revisão de literatura. *Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica* 1 (4): 49-54.

Favretto MA, Santos EB & Geuster CJ. 2013. *Insetos do Oeste de Santa Catarina*. 1 ed., Campos Novos: Ed. dos Autores. 317p.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Carvalho RP, Silva-Filho RG & Aguiar-Coelho VM. 2014. Evaluation of the influence of the antibiotic ciprofloxacin in the development of an Old World screwworm fly, *Chrysomya putoria*. *Journal Insect Sciences* 14(3): 1-11.

Ferraz ACP, Dallavecchia DL, Silva DC, Figueiredo AL, Proença B, Silva-Filho RG & Aguiar VM. 2014. Evaluation of the Effects of the Antibiotics Gentamicin on the Postembryonic Development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal Insect Sciences* 14(279): 1-5.

Ferraz ACP, Proença B, Gadelha BQ, Faria LM, Barbalho MGM, Aguiar-Coelho VM & Lessa CSS. 2010. First record of human myiasis caused by association of the species *Chrysomya megacephala* (Diptera:Calliphoridae), *Sarcophaga* (Liopygia) *ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 47 (3): 487-490.

Ferrari AC, Soares ATC, Guimarães MA & Thyssen P. 2008. Efeito da testosterona no desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). *Medicina (Ribeirão Preto)* 41 (1): 30-4.

Figueroa L, Uherek F, Yusef P, López L & Flores J. 2006. Experiencia de terapia larval en pacientes con úlceras crônicas. *Parasitología Latino americana* 61: 160-164.

Gagné RJ. 1981. *Chrysomya* spp., Old world blowflies (Diptera, Calliphoridae), recently established in the Americas. *Entomological Society of America* 27 (1): 21-22.

Guimarães JH & Amorim DS. 2006. Diptera Pp. 147 In: Costa, C.; Ide, S. & Simonka, C. E. (eds). *Insetos Imaturos: metamorfose e identificação*. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 249p.

Guimarães JH, Papavero N & Prado AP. 1983. As miíases na região Neotropical (Identificação, Biologia, Bibliografia). *Revista Brasileira de Zoologia* 1 (4): 239-416.

Guimarães JH, Prado AP & Buralli GM. 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 JH, Prado AP & Linhares AX. 1978. Three newly introduced blowfly species in Southern Brazil (Diptera: Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 22 (1): 53-60.

Goff ML. 2000. *A fly for the prosecution: How insect evidence helps solve crimes*. Cambridge: Harvard University Press. 225p.

Karabey T & Sert O. 2014. The analysis of pupal development period in *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) forensically important insect. International *Journal of Legal Medicine* doi 10.1007/s00414-014-0968-2

Kosmann C, Mello PR, Harterreiten-Souza SE & Pujol-Luz RJ. 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 (1): 74-85.

Kosmann C, Macedo MP, Barbosa TAF & Pujol-Luz JR. 2011. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia* 55 (4): 621-623.

Leal JLF, Oliveira TC, Carneiro SCAS, Santos ABR & Vasconcelos BCE. 2013. Estimativa do intervalo pós-morte em cadáveres congelados através da entomologia. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilofacial* 13 (3): 41-48.

Li L, Wang Y & Wang J. 2016. Intra-puparial development and age estimation of forensically important *Hermetia illucens* (L.). *Journal of Asian-Pacific Entomology* 19: 233-237. doi.org/10.1016/j.aspen.2016.01.006

Luna TC, Arcaya E & Velásquez Y. 2014. Primer registro de Lucilia eximia (Wiedemann, 1819) (Diptera: Calliphoridae) asociada com *Stapelia gigantea* L. (Apocynaceae) em Venezuela. *Entomotropica* 29 (1): 53-56.

Ma T, Huang J & Wang JF. 2015. Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) for postmortem interval estimation. Forensic Science International 253 (2015): 88-93.

Martins G, Santos WE, Creão-Duarte AJ, Silva LBG & Oliveira AAF. 2013. Estimativa do intervalo pós-morte em um canino (*Canis lupus familiaris* Linnaeus 1758) pela entomologia forense em Cabedelo-PB, Brasil: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65(4): 1107-1110.

Mello-Patiu CA. 2007. Diptera pp. 29 In: Oliveira-Costa J. (editora). *Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios*. 2. ed., Campinas, SP: Millennium Editora. 456 p.

Mello RS, Borja-Moya GE. & Queiroz MMC. 2012. How photoperiods affect the immature development of forensically important species *Chrysomya albiceps* (Calliphoridae). *Parasitology Research* 111: 1067-1073.

Norris KR. 1965. The bionomics of blow flies. *Annual Review Entomology* 10: 47-68.

Oliveira-Costa J, Oliveira RG & Bastos CS. 2013. Diptera Calliphoridae de importância forense no Rio de Janeiro. *Revista Eletronica Novo Enfoque* 16 (16): 41-52.

Oliveira-Costa J & Queiroz MMC. 2007. Bionomia de dípteros de interesse forense pp. 203-204 In: Oliveira-Costa J. (ed). *Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios*. 2. ed., Campinas, SP: Millennium Editora. 456 p.

Oliveira TC & Vasconcelos SD. 2010. Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology. *Forensic Science Intomology* 198: 97-102.

Oliveira VC, Mello RP & D'almeida JM. 2002. Dípteros muscóides como vetores mecânicos de ovos de helmintos no jardim zoológico, Brasil. *Revista de Saúde Publica* 36 (5): 614-620.

Pinheiro DS, Reis AAS, Jenuino RSA & Silva HMV. 2012. Variáveis na estimativa do intervalo pós-morte por métodos de entomologia forense. *Enciclopédia Biosfera* 8 (14): 1442-1458.

Prado AP & Guimarães JH. 1982. Current state of the distribuition and dispersal of the species *Chrysomya* R-D genus in the Neotropical region (Diptera, Calliphoridae). *Revista Brasileira de Entomologia* 26 (3-4): 225-231.

Proença B, Ribeiro AC, Luz RT, Magalhães-De-Aguiar VM, Maia VC & Couri MS. 2014. Intrapuparial Development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of Medical Entomology* 51(5): 908-914.

Pujol-Luz JR, Arantes LC & Constantino R. 2008. Cem anos de Entomologia Forense (1908-2008). *Revista Brasileira de Entomologia* 52(4): 485-492.

Rebelo MT, Meireles J, Moreira A & Fonseca IP. 2014. Entomologia Forense Médico-Veterinária. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias 109 (591-592): 62-69.

Salazar JL. 2006. Insectos de importancia Forense em Cadáveres de ratas, Carabobo - Venezuela. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 23 (1): 33-38.

Salazar-Ortega J. 2008. Estudio de la entomofauna sucesional asociada a la descomposición de un cadáver de cerdo doméstico (*Sus scrofa*) en condiciones de campo. *Revista de la Facultad de Ciencias* 13 (1): 21-32.

Santos MN & Teixeira MLF. 2009. Espécies de Calliphoridae (Diptera) visitando flores de *Antidesma bunius* (Euphorbiaceae) no arboreto do Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Revista da FZVA* 16 (1): 86-94.

Salviano RJB, Mello RP, Santos RFS, Beck LCNH & Ferreira A. 1996. Calliphoridae (Diptera) associated with human corpses in Rio de Janeiro, Brazil. *Entomologia y Vectores* 3 (5-6): 145-156.

Souza ER, Rafael JA, Filho FFX, Da-Silva-Freitas JO, Oliveira-Costa J & Ururay-Rodrigues A. 2014. First medicolegal forensic entomology case of central Amazon: a suicide by hanging with incomplete suspension. *EntomoBrasilis* 7 (1): 12-15.

Shewell GE. 1993. Calliphoridae pp. 1136 In: Mcalpine JF, Peterson BV, Shewell GE, Teskey HJ, Vockeroth JR & Wood DM. *Manual of Nearctic Diptera*. Vol. 2, Research Branch, Agriculture Canada, Monograph n. 28, Ottawa: Canada, Canada Communication Group. 1332p.

Thyssen PJ, Moretti TC, Ueta MT & Ribeiro OB. 2004. O papel de insetos (Blattodea, Diptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. *Caderno de. Saúde Pública* 20 (4): 1096-1102.

Ullerich FH. 1963. Geschlechtschromosomen und geschlechtsbestimmung bei einigen Calliphorinen (Calliphoridae, Diptera). *Chromosoma (Berl.)*14: 45-110.

Vairo KP, Correa RC, Lecheta MC, Caneparo MF, Mise KM, Preti D, Carvalho CJB, Almeida LM & Moura MO. 2014. Forensic use of a subtropical blowfly: The first case indicating minimum postmortem interval (mPMI) in Southern Brazil and first record of *Sarconesia*

chlorogaster from a human corpse. *Journal of Forensic Sciences* doi: 10.1111/1556-4029.12596

Vargas J & Wood DM. 2010 Calliphoridae (Blow flies) 1297-1304 In: Brown BV, Borkent A, Cumming JM, Wood DM, Woodley NE & Zumbado MA. 2010. *Manual of Central American Diptera*. Vol. 2, NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada. 728 p.

Yates I, Fox M, Crewdson M & Woodyer AB. 2003. Larvae - a key member of the multidisciplinary foot team? *The Diabetic Foot Journal* 6 (4): 166-171.