



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA MACHADO DA SILVA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS LARVAS DE *Paralucilia xanthogeneiates*
DEAR, 1985 (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)

CURITIBA

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA MACHADO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS LARVAS DE *Paralucilia xanthogeneiates*
DEAR, 1985 (DIPTERA: CALLIPHORIDAE)**

Monografia apresentada
como requisito parcial para obtenção do
título de bacharel em ciências biológicas,
setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr Mauricio Osvaldo
Moura

CURITIBA

2015

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura, por ter me acolhido no Laboratório de Dinâmicas Ecológicas e ter me dado todo o apoio necessário para a elaboração deste trabalho. Agradeço pelo carinho, as conversas e as brincadeiras.

A todos os meus colegas do Laboratório de Dinâmicas Ecológicas pela companhia e conversas, não tão extensas porém muito significativas. Agradeço principalmente à Karine Pinto e Vairo pela paciência e dedicação ao me ensinar a atividade de criação de moscas e a descrição dos imaturos. Além das fotos de microscopia eletrônica.

Aos meus pais Rozane e Claudemir e ao meu irmão Cleyton, que ao longo de toda a minha vida têm me apoiado fielmente em todas as minhas escolhas, tornando essa jornada mais acolhedora e feliz.

Aos meus amigos, em especial Sze Mei Lo e Karin Cristina Camargo, pela parceria em trabalhos, disciplinas e conversas e a Luana Soraia também pelas conversas, companhia e apoio. E um agradecimento especial pelo incentivo e companhia de Nilson Roberto Coblinski, que sempre foi um aluno exemplar e namorado dedicado.

A todas as moscas que contribuíram para a elaboração desta descrição.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confoca e a CAPES, pelas fotos em scanner de lâminas.

Ao Natural History of Denmark pelas fotos de microscopia eletrônica.

Ao Projeto Táxon-Line - Rede Paranaense de Coleções Biológicas, por parte das fotos.

A todos que contribuíram para elaboração deste trabalho.

RESUMO

A entomologia forense é a aplicação de informações biológicas de insetos na medicina legal, principalmente, para estimar o tempo de colonização dos insetos até a descoberta do cadáver. Nessa abordagem, o primeiro passo é a identificação dos insetos recuperados do corpo. *Paralucilia xanthogeneiates* Dear, 1985 (Calliphoridae) foi registrada em quatro casos de morte no estado do Paraná. Mas, como não possui dados morfológicos e biológicos disponíveis para os estágios imaturos foi impossível utilizar esta espécie em um contexto forense. Então, para começar a preencher esta lacuna o principal objetivo deste estudo foi descrever as fases larvais de *P. xanthogeneiates*. Para obter os exemplares larvais iniciamos uma colônia de adultos coletados em Curitiba (25°25' S, 49°14' W), no Estado do Paraná. Esta colônia foi mantida sob temperatura ambiente variável. Todas as larvas foram mortas em água destilada a 95°C, fixadas em AFA e preparadas de acordo com os métodos padronizados para microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Os imaturos possuem corpo cilíndrico com a extremidade anterior afilada. O pseudocéfalo é bilobado com dois órgãos sensoriais. No primeiro instar, a máscara facial tem uma fileira de microvilosidades e dois conjuntos de "cirri". No segundo e no terceiro instar as pontes orais são conspícuas e o órgão ventral é pequeno e arredondado. O lobo labial é arredondado no ápice e retangular na base e o par de órgãos labiais possuem sensila do tipo "sensillum". O cefaloesqueleto do primeiro instar tem um par de mandíbulas com pequenos dentes no ápice, com um labro longo e curvado e barra parastomal longa e fina. O esclerito intermediário tem forma de H quando em vista ventral e o "cornua" dorsal e ventral tem aproximadamente o mesmo tamanho. No segundo instar a mandíbula possui ganchos orais bem definidos e demais escleritos se tornam mais robustos e esclerotizados. No terceiro instar todos os escleritos se tornam ainda mais esclerotizados e robustos, neste estágio é possível a descrição do par de escleritos acessórios orais. O padrão de distribuição das bandas de espinhos não se modifica entre os instares. No entanto, há mudança no formato dos espinhos, número e disposição no interior da banda. Os espiráculos posteriores têm de uma, a três fendas, dependendo do estágio e peritrema incompleto com botão. A cavidade espiracular é rodeada por papilas com sensila apical e rodeada por espinhos que se assemelham à pelos. A descrição morfológica que fornecemos torna possível a identificação de *P. xanthogeneiates* e sua diferenciação de *P. paraensis* (Mello, 1972), *P. fulvinota* (Bigot, 1877), *P. wheeleri* (Deonier & Knipling, 1940). Contudo, a maioria dos principais caracteres são de microscopia óptica, é necessário uma especialização em entomologia para executar esta tarefa, permitindo sua aplicação na entomologia forense.

Palavras chave: entomologia forense, imaturos, IPM.

ABSTRACT

Forensic entomology is the application of biological information derived from insects in legal medicine, mainly to estimate the time from insect colonization until the discovery of the corpse. This framework implies, as the first step, the identification of the species recovered from the corpse. *Paralucilia xanthogeneiates* Dear, 1985 (Calliphoridae) were reared from samples of four death cases in the state of Paraná. But, because there isn't morphological and biological data available for immature stages, it was impossible to use this species in a forensic context. So, to start filling this gap the main goal of this study was to describe the larval stages of *P. xanthogeneiates*. To obtain larval samples we started a colony from adults collected in Curitiba (25°25' S, 49°14' W), in the state of Paraná. This colony was maintained under varying room temperatures. All larvae were killed in distilled water at 95°C, fixed in AFA and prepared following standard methods for light microscopy and scanning electron microscopy. All immature stages have a cylindrical body with the anterior end tapered. The pseudocephalon is bilobed with two sensory organs. In the first instar, the facial mask has a row of microvilli and two tufts of cirri. In the second and third instar the oral ridges are conspicuous and the ventral organ is small and rounded. The labial lobe is rounded at the apex and rectangular at the base and the pair of labial organs bears sensilla. The first instar cephaloeskeleton has a pair of hooks with small teeth on the end, with a long and curved labrum and a slender parastomal bar. The intermediary sclerite is H-shaped when seen from ventral view and the dorsal and ventral cornua have almost the same size. The second instar mouthhooks greatly resembles the first that of the first instar except that have well-defined oral hooks and more robust sclerites. In the third instar all sclerites became even more robust enabling the description of the accessory oral sclerites. The distributional pattern of spinose bands did not change among instars. However, spine shape, number and within band arrangement do change. The posterior spiracles have one to three slits, depending on the instar, and an incomplete peritreme. In the second and third instars the peritreme has a button. The spiracular cavity is surrounded by papillae with sensilla on the apex and enclosed by long spines. The morphological description we provide make possible the identification of *Paralucia xanthogeneiates* and its differentiation from *P. paraensis* (Mello, 1972), *P. fulvina* (Bigot, 1877) and *P. wheeleri* (Deonier & Knipling, 1940). Although, most of the key characters are from optical microscopy, it is necessary an expertise in entomology to perform this task.

Key Words: forensic entomology, PMI, immature

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Pseudocéfalo de primeiro instar de <i>P. xanthogeneiates</i> sob MEV.....	22
Figura 2. Cefalo esqueleto de primeiro instar de <i>P. xanthogeneiates</i> em vista dorsal e lateral	23
Figura 3. Vista ventral do formato dos espinhos do primeiro e do terceiro segmento torácico do primeiro instar de <i>P. xanthogeneiates</i>	24
Figura 4. Padrão de distribuição de espinhos em vista lateral e dorsal sob MO e MEV	25
Figura 5. Divisão anal do primeiro instar de <i>P.xanthogeneiates</i>	26
Figura 6. Vista ventral do pseudocéfalo e segmentos torácicos I e II do segundo instar de <i>P. xanthogeneiates</i>	27
Figura 7. Vista ventral e lateral do cefalo esqueleto do segundo instar de <i>P. xanthogeneiates</i> sob MO. A) Vista lateral do cefalo esqueleto de segundo instar de <i>P.xanthogeneiate</i>	28
Figura 8. Segmentos torácicos de segundo instar de <i>P.xanthogeneiates</i>	29
Figura 9. Segmentos abdominais de segundo instar de <i>P.xanthogeneiates</i> em vista ventral.	30
Figura 10. Divisão anal de <i>P.xanthogeneiates</i> sob MO e MEV.....	31
Figura 11. Pseudocéfalo de terceiro instar de <i>P.xanthogeneiates</i>	32
Figura 12. Cefalo esqueleto de primeiro instar de <i>P.xanthogeneiates</i> sob MO.....	33
Figura 13. Segmentos torácicos de <i>P. xanthogeneiates</i> sob MEV.....	34
Figura 14. Segmentos abdominais do terceiro instar de <i>P. xanthogeneiates</i> em vista ventral e dorsal sob MEV.	35
Figura 15. Divisão anal de terceiro instar de <i>P.xanthogeneiates</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLA

A1- Segmento abdominal 1

A2- Segmento abdominal 2

A3- Segmento abdominal 3

A4- Segmento abdominal 4

A5- Segmento abdominal 5

A6- Segmento abdominal 6

A7- Segmento abdominal 7

an -antena

ap- "anal pads"

bea - banda de espinhos anterior

bep- banda de espinhos posterior

cd- cornu dorsal

cir- cirri

cv- cornu ventral

da- divisão anal

d- dentes

ed- esclerito dental

ei- esclerito intermediário

IPM- Intervalo pós-morte mínimo

lcw-"lateral creeping welt"

l- labrum

ll- lobo labialm- mandíbulas

MEV-microscopia eletrônica de varredura

MO- microscopia óptica

pd- ponte dorsal

pm- palpo maxilar

pó- pontes orais

ol- órgão labial

TI- segmento torácico

vcw: "ventral creeping welt"

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
3.1. OBJETIVO GERAL	18
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1-Coleta dos adultos e obtenção das larvas	19
4.2- Microscopia Ótica	19
4.3- Microscopia Eletrônica de Varredura.....	20
4.4- Descrições e Fotografias	20
5. RESULTADOS	21
5.1- Descrição do primeiro instar de <i>P. xanthogeneiates</i> :.....	21
5.2 Descrição do Segundo Instar de <i>P. xanthoneiates</i> :	26
5.3 Descrição do Terceiro Instar de <i>P. xanthogeneiates</i> :	31
7. CONCLUSÃO.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

Os Insecta são considerados o grupo mais numeroso e diverso do planeta (CASTNER, 2000). Além disso, possuem uma grande diversidade morfológica e de histórias de vida que permite que ocupem quase todos os tipos de ambiente. Dentro dessa gama de possibilidades, algumas espécies de insetos são atraídas por corpos em decomposição, onde se alimentam, encontram parceiros para cópula e se reproduzem (BENECKE, 2001). Por utilizarem corpos em decomposição, os insetos necrófagos têm sido utilizados em um contexto criminal. A entomologia forense é o nome dado ao estudo e aplicação de informações biológicas de insetos e artrópodes em um contexto criminal, com o objetivo de levantar informações úteis para investigações. Em sua área médico-legal, com foco em casos de morte, tem como principal objetivo a análise da presença ou tempo de desenvolvimento dos insetos encontrados no cadáver e o tempo decorrido desde a colonização (ANDERSON, 1996; CATTI, 1990), determinando um intervalo pós-morte.

O método de intervalo pós-morte possui vantagem em relação aos métodos tradicionais de medicina legal, como a patologia forense. Isso porque pode ser aplicado 72 horas após a morte ainda com precisão, porque a confiabilidade estatística das estimativas baseadas em métodos tradicionais é baixa após o mesmo período de tempo. Além disso, também pode ser aplicado em estágios tardios de decomposição, onde as técnicas usuais de datação de tempo decorrido desde a morte (IPM) são pouco eficazes (BENECKE, 2004). O IPM baseado em insetos pode ser estimado de duas maneiras: a) a partir da determinação da idade dos imaturos encontrados em carcaças, que se baseia nas características do ciclo de vida em que se associa o tempo de desenvolvimento à idade do inseto e b) através da análise da sucessão entomológica. Isso porque, durante a decomposição, o cadáver passa por modificações físicas, como inchamento, apodrecimento, fermentação, mumificação e esqueletização (BENECKE, 2004). No geral, cada uma dessas fases atrai um conjunto diferente de espécies de acordo com suas preferências biológicas. Assim,

quando a sucessão de insetos é conhecida, a partir de observações prévias, é possível estimar o intervalo pós-morte máximo baseando-se neste padrão (CATTS & HASKELL, 1990).

A estimativa de IPM mínimo a partir da idade da larva é o método mais utilizado na entomologia forense porque a maioria dos corpos são encontrados poucos dias após a morte, neste contexto os imaturos são o estágio mais comum de serem coletados (AMENDT, 2010). Como informações sobre a morfologia de imaturos ainda são escassos, isso implica que, em muitos casos, se opte pela criação das larvas até o estágio adulto para a identificação da espécie e posterior busca por informações de tempo de desenvolvimento (CATTS, 1990). No entanto, é possível que o ciclo não se complete em laboratório, o que atrasa, ou mesmo impossibilita, o cálculo do IPM, resultado fundamental em investigações que envolvem a entomologia forense. Assim a identificação correta dos imaturos passa a ser um dos gargalos da entomologia forense.

Os insetos são atraídos pelo odor liberado durante a decomposição (ANDERSON, 1986) sendo que, entre os Diptera, várias espécies das famílias Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae são abundantes e colonizam o corpo após a morte (MOURA et al, 1997; OLIVEIRA & VASCONCELOS, 2010 SOUZA et. al 2008; VAIRO, 2011). Assim, essas famílias são consideradas de importância forense porque os imaturos se desenvolvem na carcaça constituindo, portanto, grande parte dos vestígios no local da morte. As espécies de Calliphoridae são as primeiras a chegar à carcaça, levando cerca de alguns minutos para realizar a oviposição após a morte (GOOF, 2000; BYRD & CASTNER, 2001; GREENBERG & KUNICH, 2002). Assim grande parte do vestígio entomológico encontrado em cenas de morte é composto por estágios imaturos de Diptera, o que os torna mais essenciais para a aplicação da entomologia forense.

A descrição morfológica é o primeiro passo para identificar e estimar a idade da larva encontrada em um corpo (AMENDT, 2004). No entanto, a identificação de imaturos depende da diferenciação a partir da interpretação de caracteres que não são fáceis de se observar até mesmo sob a preparação de microscopia óptica. Isso

acontece tanto pelo tamanho das larvas quanto pelo grau de dificuldade associado com a definição dos caracteres taxonômicos.

Embora algumas espécies de Calliphoridae de interesse forense possuam descrições morfológicas para os estágios imaturos, como por exemplo: *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830), *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) e *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) (QUEIROZ, 1997; BONNATO & CARVALHO, 1996; ERZINCLIOGLU, 1989; THYSSEN, 2005), ainda existem espécies sem descrição dos imaturos, como por exemplo, *Paralucilia xanthogeneiates* Dear, 1985.

Paralucilia xanthogeneiates Dear, 1985 (Calliphoridae), está distribuída no Continente Sul-Americano (Brasil, Bolívia, Argentina e Paraguai). No Paraná larvas de, *P. xanthogeneiates* foram registradas em quatro casos de morte (Grupo de Entomologia Forense – UFPR, dados não publicados) e, como não existem dados disponíveis tanto sobre o tempo de desenvolvimento quanto sobre a descrição dos instares larvais, essa espécie não pode ser utilizada nos cálculos de IPM. Além disso, a identificação só foi possível deixando as larvas se desenvolverem até o estágio adulto. Um procedimento que, embora usualmente empregado, pode inviabilizar a identificação da espécie presente no corpo se as larvas não completarem o desenvolvimento.

Assim, o objetivo geral deste trabalho é descrever o primeiro, segundo e terceiro instar de *P. xanthogeneiates* permitindo, assim, a identificação dos imaturos que possam ser encontrados em cenas de crimes e conseqüentemente possibilitar a utilização dessa espécie como indício.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os insetos são considerados o grupo mais numeroso e diverso do planeta (CASTNER, 2000). Muitos artrópodes são atraídos por corpos em decomposição, entre estes os adultos e imaturos de Diptera e Coleoptera. Isso ocorre porque o corpo é um ambiente que permite que esses insetos se alimentem e se reproduzam (BENECKE, 2001), formando uma comunidade denominada efêmera (MOURA, 2004). Por exemplo, um porco em decomposição pode atrair até 400 espécies de insetos durante o processo de decomposição, incluindo necrófagos, predadores, parasitóides e espécies transientes (PAYNE, 1965).

Diptera é uma ordem megadiversa, cuja diversidade se refletiu tanto morfológica quanto aos aspectos comportamentais, possuindo adaptações para ocupar uma grande variedade de habitats e com diferentes hábitos, como parasitas, herbívoros e necrófagos, entre outros (COURTNEY et. al, 2000; WIEGMANN, TRAUTWEIN, WINKLER et. AL, 2011). Como existe sobreposição entre a presença de insetos necrófagos e locais de crime, há um campo vasto para a aplicação de conhecimentos sobre a ocorrência e a biologia dos insetos recuperados de cenas de crime e cadáveres para investigações criminais (BENECKE, 2001). Essa aplicação da entomologia é denominada de entomologia forense.

A entomologia forense baseia-se no estudo de insetos encontrados em cenas de crime e cadáveres com o objetivo de fornecer informações para a investigação criminal (KEH, 1985). Este campo de estudo pode ser dividido em três categorias: urbana, produtos armazenados e médico-legal (LORD & STEVENSON, 1986). A primeira área, urbana, trata de insetos que afetam o ambiente ocupado pelo homem, como por exemplo, imóveis ou qualquer outro bem estrutural. Já, a segunda, foca em produtos armazenados e tem importância econômica, pois relaciona os insetos com a contaminação de alimentos. E, por último, o estudo de insetos necrófagos que atuam na decomposição de corpos e que por isso, possuem importância ecológica e para entomologia forense.

O uso de insetos como informação forense foi descrito pela primeira vez na literatura em um caso do século XIII na China, em que um lavrador foi assassinado

perto de uma plantação de arroz com uma foice. No dia seguinte, um investigador pediu que todos os trabalhadores colocassem suas ferramentas no chão sendo que apenas uma dessas foices atraiu moscas. Esse comportamento indicava que a ferramenta possuía vestígios de sangue e, quando o dono da foice foi confrontado com essa informação, acabou por confessar o crime (BENECKE, 2001; PUJOL-LUZ, 2008). Mais recentemente, no século XVIII, um famoso médico francês, Dr. Orfila, percebeu a presença de vários artrópodes enquanto observava exumações e entendeu a importância das larvas para a decomposição (BENECKE, 2001). Em 1855 Bergeret utilizou evidências entomológicas para o cálculo do IPM, sendo esta descrição considerada o primeiro caso moderno de entomologia forense (BENECKE, 2001; AMENDT, 2004). Outra grande contribuição para entomologia forense é o livro “*Le Faune des Cadavres*” publicado por Mégnin em 1894 onde o autor além de relatar cerca de 19 casos também inicia uma fundamentação teórica sobre entomologia forense, descrições de insetos, fauna cadavérica e sobre a sucessão entomológica (BENECKE, 2001). Entre 1960 e a metade da década de 1980 as principais contribuições para entomologia forense foram, principalmente, do Dr. Marcel Leclercq, da Bélgica, que publicou o livro intitulado “*Entomology & Legal Medicine*” (BENECKE, 2001) e do Dr. Pekka Nuorteva que publicou vários estudos de casos e, posteriormente, Smith em 1986 que publicou o livro “*A Manual Of Forensic Entomology*” (BENECKE, 2001). Em 2002 o Dr. Bernard Greenberg em parceria com John Charles Kunich contribuiu para a área de entomologia forense com o livro intitulado “*Entomology and Law – Flies as Forensic Indicators*”, onde fornecem um mapa detalhado sobre a aplicação dos insetos encontrados em cenas de crime e ainda uma análise das leis e aplicabilidade na entomologia forense como ferramenta jurídica (GREENBERG & KUNICH, 2002). No fim do século XIX a aplicação da entomologia forense se tornou rotina em países da América do Norte e Europa (BENECK, 2001; PUJOL-LUZ, 2008).

No final do século XX vários países reconheceram que a entomologia forense é uma ferramenta importante em investigações criminais (GOFF 1991; GREENBERG 1991; CATTS e GOFF 1992; ANDERSON, 1995; INTRONA, 1998). O uso de insetos para a determinação do intervalo pós-morte é uma abordagem complementar as tradicionais (alterações físicas como *algor mortis*, *livor mortis* e

alterações químicas) que são mais imprecisas a medida que o intervalo de tempo a ser estimado aumenta. Assim, o cálculo do IPM passa a ser uma ferramenta essencial nesses casos, porque pode fornecer informações com confiabilidade até três meses após a morte (KASHYAP & PILLAI, 1989; AMENDT, 2004). Como em alguns casos o único vestígio encontrado nos cadáveres são imaturos de moscas, a identificação correta a partir de caracteres morfológicos é fundamental, principalmente em casos onde o número de exemplares coletados no corpo é pequeno (SMITH, 1986; ANDERSON 1999, BYRD & CASTNER 2000).

Os insetos, principalmente moscas, são atraídos para o corpo em decomposição pelo odor, alguns minutos após a morte (SMITH 1986; HASKELL al. 1997; ANDERSON, 2001). As espécies de Calliphoridae são consideradas as primeiras a chegar à carcaça, levando cerca de alguns minutos para a oviposição após a morte (GOFF, 2000; BYRD & CASTNER, 2001; GREENBERG & KUNICH, 2002). No cadáver os insetos podem ocupar quatro categorias, os necrófagos, que utilizam a carcaça para alimentação e criação de imaturos; os predadores de espécies necrófagas e larvas; onívoros que se alimentam do cadáver e de seus colonizadores e outros artrópodes que fazem da carcaça uma extensão de seu ambiente (Smith, 1986). As espécies que compõem essa comunidade variam de acordo com a região geográfica e padrão climático do local (BORNEMISSZA 1957; PAYNE 1965; ANDERSON & VAN LAERHOVEN, 1996; ANDERSON, 2001; GRASSBERG & FRANK, 2003). Logo, os dados coletados em uma região só podem ser usados para regiões semelhantes e ainda assim com cautela. Isso porque as características ecológicas, umidade, precipitação e grau de exposição ao sol em que se encontra o corpo em decomposição influenciam no padrão de colonização de insetos (SMITH, 1986; ERZINCLIOGLU, 1996; CARVALHO & LINHARES, 2001).

A partir do momento que as moscas encontram o corpo em decomposição e realizam a oviposição inicia-se a contagem para determinação da idade de desenvolvimento da larva que é a informação primordial para o cálculo do IPM mínimo (CATTS & GOFF, 1992). Alguns procedimentos podem ser utilizados para determinar a idade da larva recuperada de um cadáver, como mensurar o tamanho e o peso da larva e compará-los com dados da literatura (GRASSBERG & REITER, 2001). Também pode ser usada uma abordagem térmica (WIGGLESWORTH, 1972),

a estimativa de graus-hora acumulados (GHA) ou graus-dia acumulados (GDA). Esse método é baseado na existência de uma relação positiva entre a taxa de desenvolvimento e a temperatura e que existe um limite mínimo de temperatura para que o desenvolvimento ocorra (GREENBERG & KUNICH, 2002). O IPM mínimo quando baseado no desenvolvimento de artrópodes em carcaças é feito a partir de vários pressupostos, que incluem: observação e anotações relevantes, como por exemplo, o lugar onde há maior concentração de insetos no corpo e ao redor do corpo; dados climatológicos do corpo, ambiente e massa larval; coleta de espécimes no corpo e ao redor do corpo e ainda coleta de espécimes da região abaixo do corpo o que pode gerar desvios do IPM real caso sejam coletados de forma insuficiente ou de modo impreciso (CATTS, 1990; SINGH, 2008).

A Associação Europeia de Entomologia Forense reconhece que nem sempre o tempo de colonização dos artrópodes corresponde ao intervalo decorrido desde a morte e que ocorrem casos em que a colonização (míase p. ex) ocorre mesmo sem a morte (AMENDT, 2007). Recentemente o período de atividade do inseto (PIA) foi considerado uma ferramenta importante para entender como ocorre a colonização de carcaças e delimitar um intervalo denominado de pré-colonização. Esse intervalo envolve as fases de exposição do cadáver e de detecção e um intervalo de pós-colonização que é composto pelas fases de descobrimento, consumo e dispersão da carcaça pelos insetos. O uso do método de IPM considerando as etapas de PIA pode representar uma melhor interpretação dos resultados porque reconhecer as características de colonização ajuda aumentar a confiabilidade das estimativas (TOMBERLIN, 2011). No entanto, embora seja um avanço teórico, a operacionalização da divisão da colonização do cadáver em fases ainda não é usual (WELLS, 2014).

No Brasil a entomologia forense é um campo de pesquisa que cresce, apesar da falta de informações sobre a morfologia e biologia de vários grupos de interesse forense (SALES, 2013). Os primeiros estudos com foco em entomologia forense no Brasil se iniciaram em 1908 com Edgard Roquette Pinto e Oscar Freire nos Estados do Rio de Janeiro e Bahia (PUJOL-LUZ et al, 2008). Além deles Herman Lüderwaldt, Samuel Pessôa e Frederico Lane descreveram pouco tempo depois, principalmente, a fauna de besouros escarabeídeos do Estado de São Paulo

(PÊSSOA & LANE, 1941). Em 1914 Oscar Freire publicou o artigo “Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia” (FREIRE, 1914) e em 1919 Belfort de Mattos publicou, sob a orientação de Oscar Freire, um estudo sobre os sarcófagídeos de São Paulo (MATTOS 1919; PESSÕA & LANE 1941). Em 1923 foi publicada postumamente a obra de Oscar Freire “Fauna Cadavérica Brasileira” (FREIRE 1923; PESSÕA & LANE 1941). Os estudos na área continuaram com Pessôa & Lane (1941) com uma abordagem completa sobre os escarabeídeos de São Paulo.

Após um período de latência entre 1940 e 1980 alguns autores se destacaram na produção de estudos básicos sobre a entomologia forense, entre eles Hugo de Souza Lopes (Sarcophagidae), Rubens Pinto de Mello (Calliphoridae), José Henrique Guimarães e Nelson Papavero (Calliphoridae). Posteriormente, outros grupos contribuíram para o conhecimento de morfologia, biologia e ecologia de insetos necrófagos (SOUZA & LINHARES; MOURA et al. 1997; CARVALHO et al. 2000 e CARVALHO & MELLO-PATIU, 2008).

No entanto, a consolidação da entomologia forense no Brasil depende ainda de uma maior interação entre a realidade acadêmica e a demanda da polícia (Pujol-luz et al, 2006). A utilização de insetos em práticas forenses tem aumentado e ocorre com mais frequência em alguns estados brasileiros (OLIVEIRA COSTA & MELLO-PATIU, 2004; PUJOL-LUZ et al, 2006; VAIRO, et al 2015). Embora a interação tenha aumentado, ainda não existem normas (procedimentos) específicas que atestem a confiabilidade das evidências entomológicas para que possam ser incluídas em casos judiciais, como ocorre na Europa e Estados Unidos (PUJOL-LUZ, 2008). Nesse contexto, a Universidade Federal do Paraná conta com uma parceria entre o Grupo de Entomologia Forense e o Instituto de Investigação Criminal do Paraná (IC-PR) onde insetos coletados por peritos são enviados ao Grupo de Entomologia Forense que realiza o procedimento de identificação, criação e levantamento de informações biológicas sobre os espécimes recebidos. Esse conjunto de informações pode ser utilizado para o cálculo do IPM, como ocorreu, por exemplo, em um caso publicado em 2015 (VAIRO, et. al, 2015). No entanto, em outros casos analisados pelo grupo da UFPR os insetos coletados na cena do crime

não puderam ser utilizados porque não existiam dados biológicos ou morfológicos disponíveis, como aconteceu com *Paralucilia xanthogeneiates* Dear, 1985.

Paralucilia xanthogeneiates Dear, 1985 foi descrita pela primeira vez em 1985 com mais 19 espécies da família Calliphoridae endêmicas da América do Sul (Dear, 1985). Embora os adultos tenham sido descritos, *P. xanthogeneiates* não possui descrição de dados biológicos e morfológicos dos imaturos até o momento. De maneira geral, o gênero *Paralucilia* possui poucas espécies com descrição e/ou informações biológicas de imaturos, como *Paralucilia paraensis* (Mello 1972) e *P. fulvinota* (Bigot, 1877) que possui dados a descrição morfológica do primeiro, segundo e terceiro instar larval (SALES, 2013; GREENBERG & SKYZA, 1984)

3 OBJETIVO GERAL

Descrever morfológicamente os estágios imaturos de *Paralucilia xanthogeneiates* Dear, 1985.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrição dos caracteres morfológicos do primeiro, segundo e terceiro instar de *P. xanthogeneiates*.
- Determinar características capazes de diferenciar *P. xanthogeneiates* Dear, 1985 das demais espécies necrófagas usualmente encontradas em carcaças.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Coleta dos adultos e obtenção das larvas

As fêmeas e machos de *P. xanthogeneiates* foram coletados no Campus Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná. As armadilhas foram montadas como descrito por Ferreira (1978) modificada utilizando como substrato de atração carne ou peixe putrefeito.

Os casais coletados foram então colocados em gaiolas de plástico e criados com uma dieta composta por sacarose, água e carne bovina para maturação dos gametas e oviposição. Após a oviposição, os ovos foram inseridos em um pote com capacidade para 500 mL contendo dieta para a eclosão e acompanhamento do desenvolvimento larval. Os potes contendo os ovos foram colocados dentro de potes maiores transparentes contendo vermiculita para pupação das larvas errantes. A medida que os ovos eclodiam e entravam em primeiro instar, uma parte destas larvas foi fixada para análise, o mesmo foi realizado para o segundo e terceiro instar com confirmação de instar sob lupa.

4.2- Microscopia Ótica

As análises morfológicas foram realizadas com a geração F6. As larvas retiradas da criação foram lavadas em água destilada, sacrificadas em água quente (aproximadamente 95°C), para que o tegumento não ficasse retraído, por aproximadamente cinco minutos e fixadas em álcool AFA . Para a observação, o material correspondente a cada instar larval foi diafanizado em KOH a 10%. Este procedimento foi realizado em temperatura ambiente e os exemplares de primeiro e segundo instar foram verificados ao longo do dia quanto à rigidez do tegumento da larva. Os mesmos foram dissecados a partir da verificação do amolecimento dos tecidos, o que facilita a dissecação e montagem do material. O terceiro instar foi deixado durante 24 horas em KOH para facilitar a dissecação. O tempo apropriado para dissecação pode variar de acordo com a temperatura e concentração do KOH. Para realizar a dissecação as larvas foram lavadas em ácido acético 5% e depois

em água destilada. As larvas foram dissecadas e suas estruturas montadas em lâminas escavadas e lamínulas contendo meio Hoyers.

4.3- Microscopia Eletrônica de Varredura

As larvas retiradas da criação foram lavadas em água destilada, sacrificadas em água quente (95 °C) por aproximadamente cinco minutos e fixadas em AFA. O material foi desidratado em séries crescentes de etanol e submetido ao método de secagem pelo ponto crítico, utilizando CO₂ super-seco em aparelho de Balzers. Posteriormente, estas larvas foram aderidas em fita condutora de carbono, montadas em suportes metálicos e cobertas por ouro para permitir a visualização no microscópio eletrônico de varredura do Natural History of Denmark.

4.4- Descrições e Fotografias

A terminologia para imaturos (Calliphoridae) utilizada foi a de Courtney et al. 2000 e Szpila, 2014, especificamente para os palpos maxilares. As fotos foram obtidas com o apoio do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal feitas a partir de microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE) motorizado, equipado com scanner automático VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE). Sob microscopia eletrônica de varredura as fotos foram obtidas com o apoio do Natural History of Denmark A Figura 2a foi obtida com o apoio do Projeto Taxon Line. As imagens foram editadas utilizando o programa Adobe Photo ShopCS4®.

5. RESULTADOS

Os imaturos de *P. xanthogeneiates* Dear, 1985 possuem o formato e divisão do corpo característicos da família Calliphoridae. As larvas são cilíndricas e afiladas na região anterior. O corpo possui um pseudocéfalo membranoso bilobado com complexo antenal e um par de palpos maxilares com sensilas e cavidade oral. Internamente, possui um cefaloesqueleto esclerotizado composto por um grupo de escleritos que ocupam a região do pseudocéfalo e podem chegar até a metade do segundo segmento torácico. A larva possui três segmentos torácicos, o primeiro segmento torácico, no segundo e no terceiro instar, carrega os espiráculos anteriores. Na região ventral há um par de órgão de Keilin em cada um dos segmentos torácicos e oito segmentos abdominais com um padrão de distribuição de espinhos em bandas anteriores e posteriores. A divisão anal contém os espiráculos posteriores rodeados de 7 pares de papilas e “anal pads” na parte ventral.

5.1- Descrição do primeiro instar de *P. xanthogeneiates* (n:20):

Pseudocéfalo: O pseudocéfalo é bilobado e possui um complexo antenal e um par de palpos maxilares (Fig.1a). O complexo antenal possui um anel basal e um pequeno domínio apical cônico (Fig.1b). Os palpos maxilares estão localizados na porção anterior de cada lobo do pseudocéfalo, possuem três sensilas coleocônicas e três sensilas basicônicas no agrupamento central e latero-dorsalmente a esse agrupamento central, duas sensilas com formato típico de sensila coleocônica (Fig. 1.c). O lobo labial é arredondado na porção superior e reto na porção inferior; cada órgão labial possui uma sensila apical do tipo “sensillum”. A máscara facial é lisa e tem, na extremidade superior, uma única fileira de pontes orais com microvilosidades que alcançam o lado dorsal do pseudocéfalo. Além disso, a máscara facial tem dois agrupamentos de “cirri” com formato triangular na porção externa da cavidade oral

Cefaloesqueleto: os escleritos são pouco esclerotizados. O labro é robusto e se assemelha ao formato de um triângulo, com base alargada e ápice afilado, este com formato gancho curvado para baixo, ápice bem esclerotizado (Fig.2b). As mandíbulas possuem fileiras com número variado de dentes apontados para baixo,

as barras parastomais são longas e finas (Fig.2b) e o esclerito intermediário possui formato de H em vista ventral (e em vista dorsal no primeiro instar) (Fig.2a).

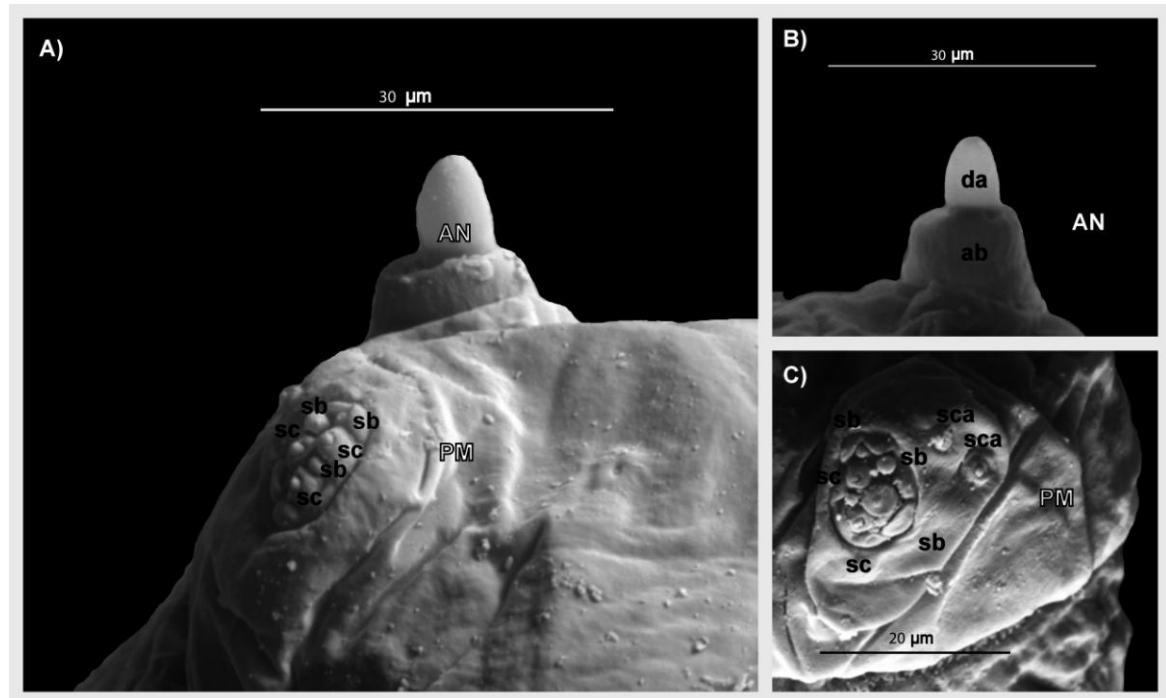


Figura 1. Pseudocéfalo de primeiro instar de *P. xanthogeneiates* sob MEV. A) Visão geral do pseudocéfalo de primeiro instar de *Paralucilia xanthogeneiates*, B) detalhe do pseudocéfalo com foco no complexo antenal direito. C) detalhe do pseudocéfalo com foco no palpo maxilar. Nesse conjunto de imagens é possível observar a estrutura da antena (an) e do palpo maxilar composto por sensilas basicônicas (sb) e sensilas coeloconicas (sc).

A placa vertical mede 1,5 vezes mais do que o comprimento do labro quando observado lateralmente e o “cornua” dorsal é aproximadamente do mesmo tamanho que o “cornua” ventral. O par de “cornua” ventral é ligado por uma ponte transversal e a ponte dorsal é afilada e esclerotizada (Fig. 2b)

Segmentos torácicos: Os segmentos torácicos possuem banda anterior de espinhos completa (Fig.2a e 2b) sendo que os espinhos são robustos com base alargada e ápice afilado nas bandas TII e TIII (Fig.3b). No segmento TI os espinhos são ainda mais robustos, com ápice formando um gancho e base mais alargada, arranjados, ventralmente, de forma densa e com 6-7 fileiras em vista dorsal (Fig.3a). O par de Orgão de Keilin é visível na superfície dos segmentos torácicos na região ventral. O restante da superfície não possui pilosidade, pontes, tubérculos ou processos.

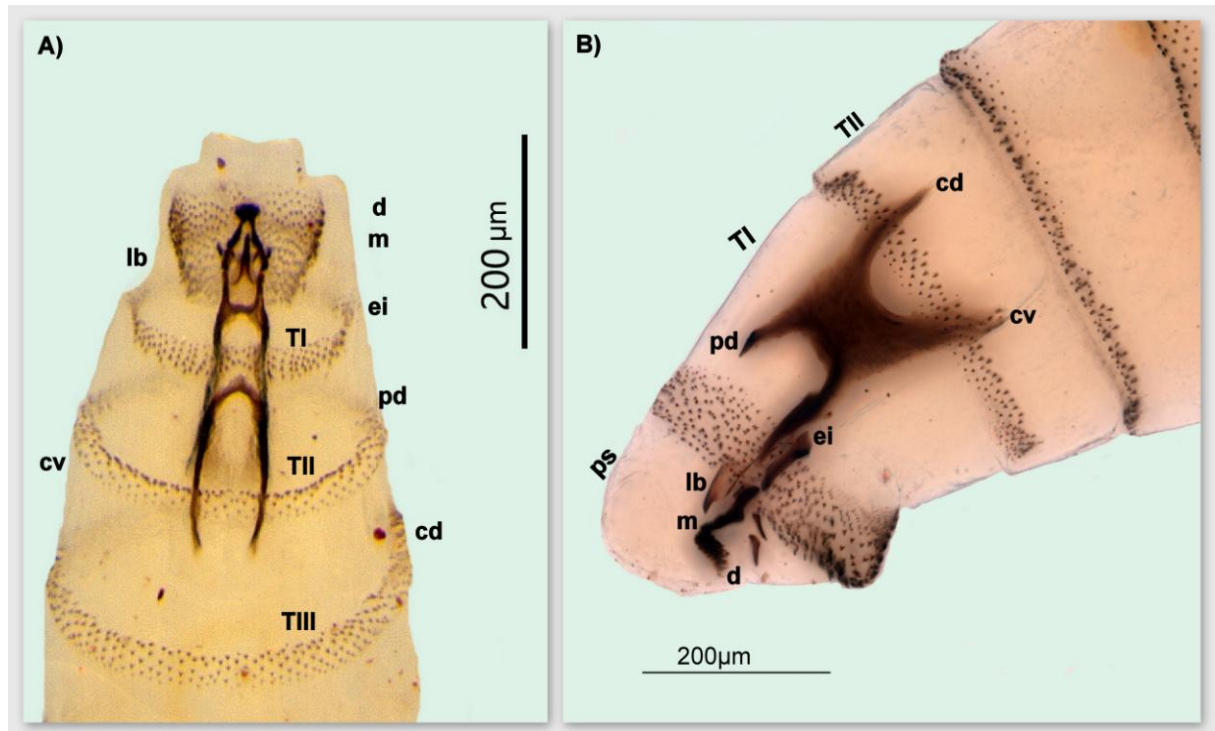


Figura 2. Cefaloesqueleto de primeiro instar de *P. xanthogeneiates* em vista dorsal e lateral. A) Cefaloesqueleto de primeiro instar de *P. xanthogeneiates* em vista lateral. B) Cefaloesqueleto de primeiro instar de *P. xanthogeneiates* em vista dorsal. No cefaloesqueleto destacam-se alguns escleritos como o labro (lb); os pequenos dentes (d) na mandíbula; o formato da barra parastomal (bp) o esclerito intermediário (ei) e o tamanho do cornu dorsal (cd) em relação ao cornu ventral (cv). Além disso algumas estruturas como o pseudocéfalo (ps) e segmentos torácicos (TI, TII e TIII) podem ser observados.

Segmentos abdominais: A superfície dos segmentos A1-A7 é lisa na região central e possui espinhos de porte médio nas extremidades (comparar com o tamanho dos espinhos dos segmentos abdominais do segundo instar Fig.9 b e c). Esses espinhos possuem uma ou duas pontas e são distribuídos espaçadamente em vista dorsal e de forma mais densa em vista ventral. Os segmentos A1 à A5 possuem banda anterior de espinhos densa e completa. A banda anterior de espinhos do segmento A6 tem espinhos dispersos e possui aproximadamente a metade da quantidade de espinhos presentes em A5. A banda anterior do segmento A7 possui espinhos apenas na região ventral, até a metade do corpo da larva (Fig 4.b). Cada banda de espinhos anterior possui, em vista ventral, uma região transversal de formato fusiforme com menor quantidade de espinhos denominada “ventral creeping welt” (Fig 4.c) e, em vista lateral, um conjunto de espinhos de aproximadamente três

fileiras irregulares que delimitam uma área de formato fusiforme chamado “lateral creeping welt” (Fig.4c).

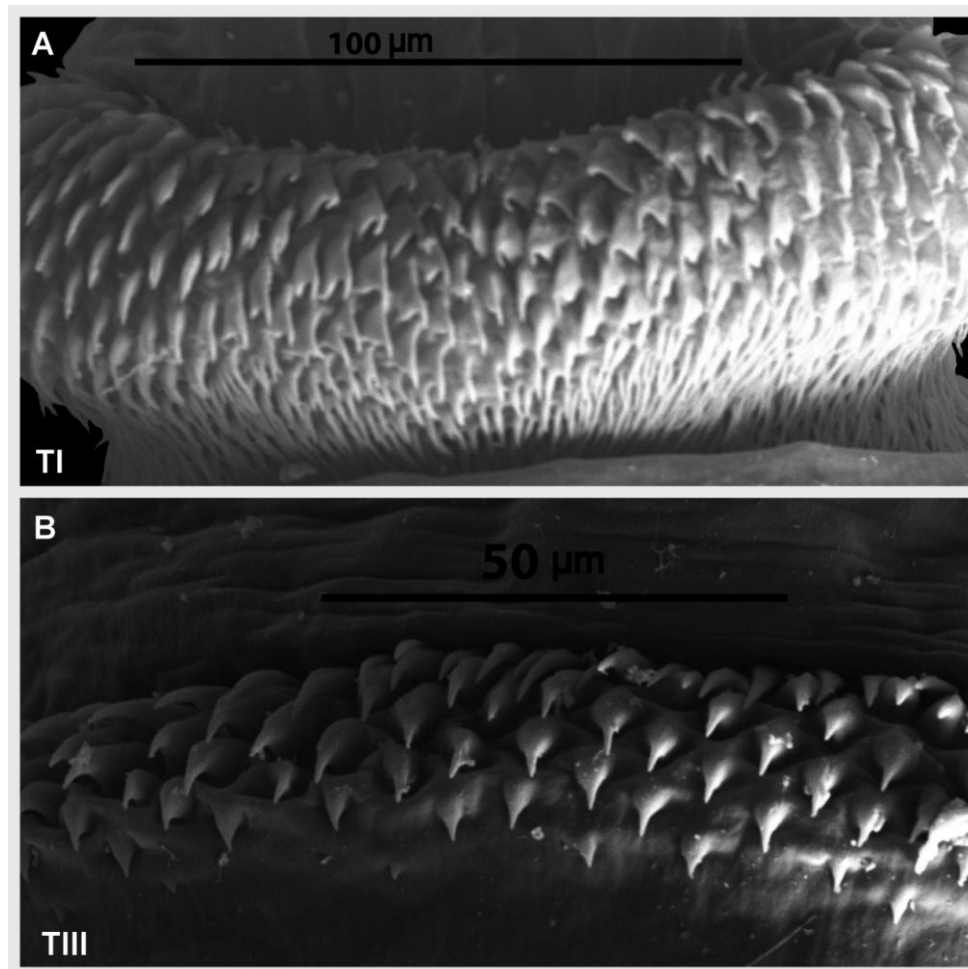


Figura 3. Vista ventral do formato dos espinhos do primeiro e do terceiro segmento torácico do primeiro instar de *P. xanthogeneiates*. A) Vista ventral do formato dos espinhos do primeiro segmento torácico do primeiro instar de *P. xanthogeneiates*; B) Formato dos espinhos do terceiro segmento torácico em vista ventral de *P. xanthogeneiates*. As escalas estão sendo representadas em micrometros e possuem valor diferente em A e B.

As bandas de espinhos posteriores ocorrem ventralmente nos segmentos abdominais do segmento A1 até o segmento A7 (Fig 4.a, b e c)

Divisão Anal: Os espinhos da banda anterior tem distribuição esparsa na região latero-ventral e estão ausentes no dorso. Na região ventral ocupam uma área maior (maior número de espinhos e mais robustos) quando comparada aos demais segmentos (Fig. 4c). O par de espiráculos posteriores é de difícil observação, porém distinguíveis quando observados com a larva em vista lateral e, quando observados

em microscopia de varredura, são observados tufos espiraculares compostos por ramificações espiraculares (Fig 5). A cavidade espiracular é rodeada por seis pares de papilas cônicas de tamanho similar (P1-P6) com uma sensila no ápice de cada papila e um par de pequenas papilas anais (P7), neste instar menores em relação a largura ocupada pelas demais papilas, abaixo do espiráculo posterior. Os “anal pads” possuem formato de cone na base e são arredondados no ápice. Toda a estrutura é rodeada de espinhos que se assemelham à pelos (Fig. 5)

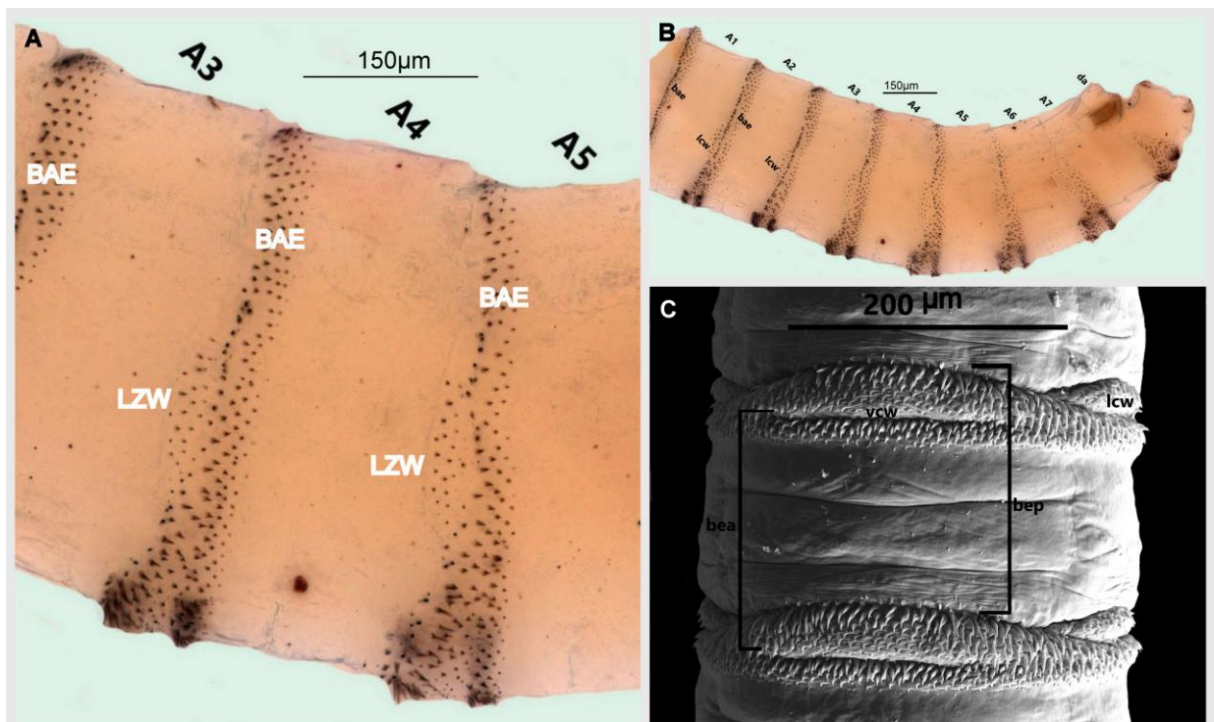


Figura 4. Padrão de distribuição de espinhos em vista lateral e dorsal sob MO e MEV. A) Padrão de distribuição das bandas de espinhos em segmentos abdominais do primeiro instar de *P. xanthogeneiates* em vista lateral sob MO; B) Detalhes dos segmento abdominais (A3,A4 e A5) em vista lateral sob MO; C) Detalhes dos segmentos abdominais em vista ventral sob MEV. Nesse conjunto de imagens observamos a distribuição da banda anterior de espinhos (bae), a região de espinhos fusiforme (lcw) em vista lateral e ventral e sob as duas técnicas. Além da banda posterior de espinhos (bpe) e a área fusiforme ventral (vcw) sob MEV.

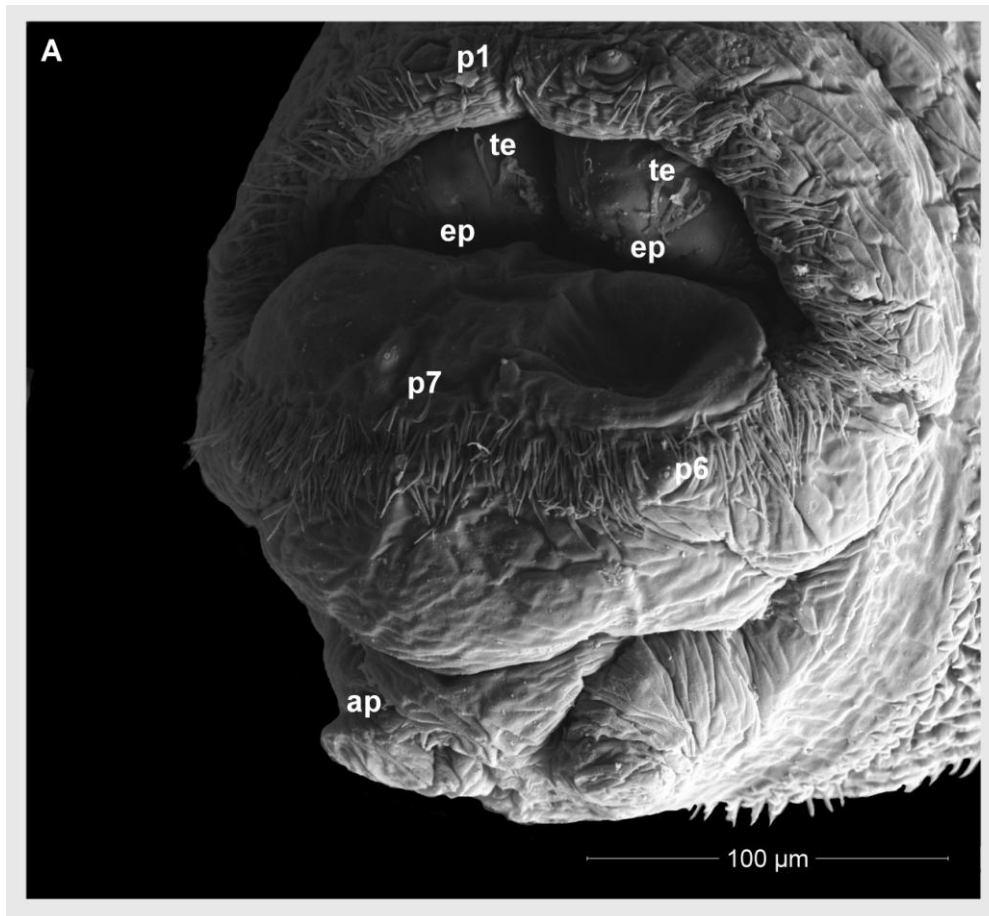


Figura 5. Divisão anal do primeiro instar de *P.xanthogeneiates*. O par de espiráculos posteriores (ep) tem suas fendas (f) rodeadas por tufos espiraculares. Essa cavidade espiracular é rodeada por papilas (p1 a p7) além de espinhos alongados. Na porção abaixo dessa cavidade há um par de “anal pads” (ap).

5.2 Descrição do Segundo Instar (n:10)

Pseudocéfalo: O pseudocéfalo é bilobado e possui dois tipos de órgãos sensoriais: o complexo antenal e os palpos maxilares. O complexo antenal e estruturas que compõe os palpos maxilares são iguais as observadas no pseudocéfalo do primeiro instar (Fig. 6 a e b). O lobo labial tem o ápice arredondado e a porção basal reta além de um órgão labial de cada lado, com sensila no ápice. A máscara facial possui pontes orais conspícuas e não há “cirri”. O órgão ventral é pequeno, arredondado e inconspícuo (Fig.6 a)

Cefaloesqueleto: Todos os escleritos são bem esclerotizados. Os ganchos das mandíbulas são curvados na região anterior e retangulares na região posterior. O esclerito dental está localizado abaixo da parte posterior da mandíbula (Fig. 7a). O

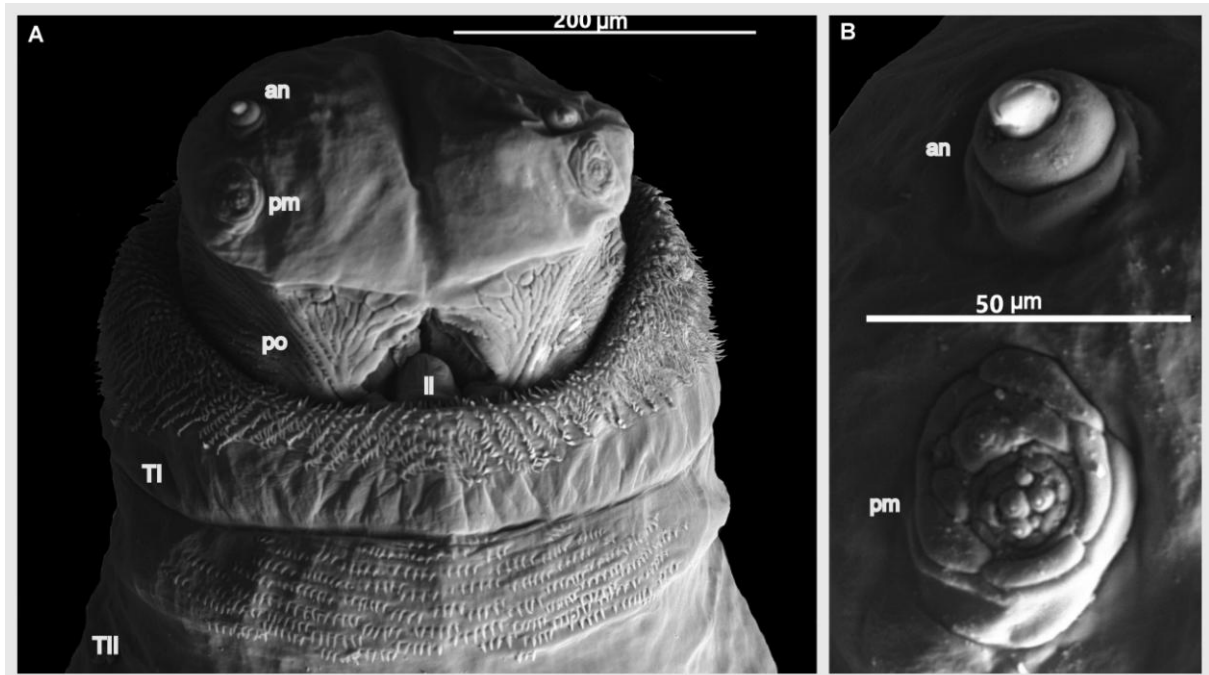


Figura 6. Vista ventral do pseudocéfalo e segmentos torácicos I e II do segundo instar de *P. xanthogeneiates*. 6. A) Vista ventral do pseudocéfalo e segmentos torácicos de segundo instar de *P. xanthogeneiates* sob MEV. B) Detalhe da estrutura do complexo antenal (an) e palpo maxilar (pm) do segundo instar. No pseudocéfalo de segundo instar há o desenvolvimento de pontes orais (po).

esclerito intermediário tem o formato de H em vista ventral (Fig. 7b) e é alongado com limite superior reto e limite inferior côncavo na porção central quando visto lateralmente (Fig. 7a). A barra parastomal é longa e fina. O par de escleritos labiais está presente antero-ventralmente próximo ao esclerito intermediário e pode ser observado apenas em vista ventral. A ponte dorsal é afilada e fortemente esclerotizada. A placa vertical é duas vezes o tamanho da barra parastomal e o cornu dorsal é maior que o cornu ventral. O cornu dorsal é 2,5 vezes o tamanho da placa vertical, enquanto que o cornu ventral mede aproximadamente a metade do tamanho da placa vertical (Fig. 7a).

Segmentos torácicos: A distribuição das bandas de espinhos é a mesma do primeiro instar. Contudo, os espinhos são pequenos, possuem entre uma e três pontas e são distribuídos aleatoriamente (Fig 8 b, c e d). O primeiro segmento torácico contém o espiráculo anterior, que é composto por 10 a 13 lobos com formato digitiformes, arranjados em uma única fileira, facilmente observados em microscopia óptica e MEV (Fig. 8a). A superfície de todos os segmentos torácicos é glabra.

Segmentos abdominais: A superfície dos segmentos A1 a A7 é lisa na região central e com espinhos nas extremidades. Os espinhos são pequenos e de base robusta com ápice afilado (Fig. 9 b e c). Particularmente na banda anterior, possuem uma, duas ou três pontas, dispostos de forma individual sua distribuição é esparsa em ambas as vistas, ventral e dorsal. Os segmentos A1 – A5 possuem banda anterior de espinhos completa. O segmento A6 tem espinhos dispersos. A banda anterior possui aproximadamente metade da quantidade de espinhos presentes do que em A5.

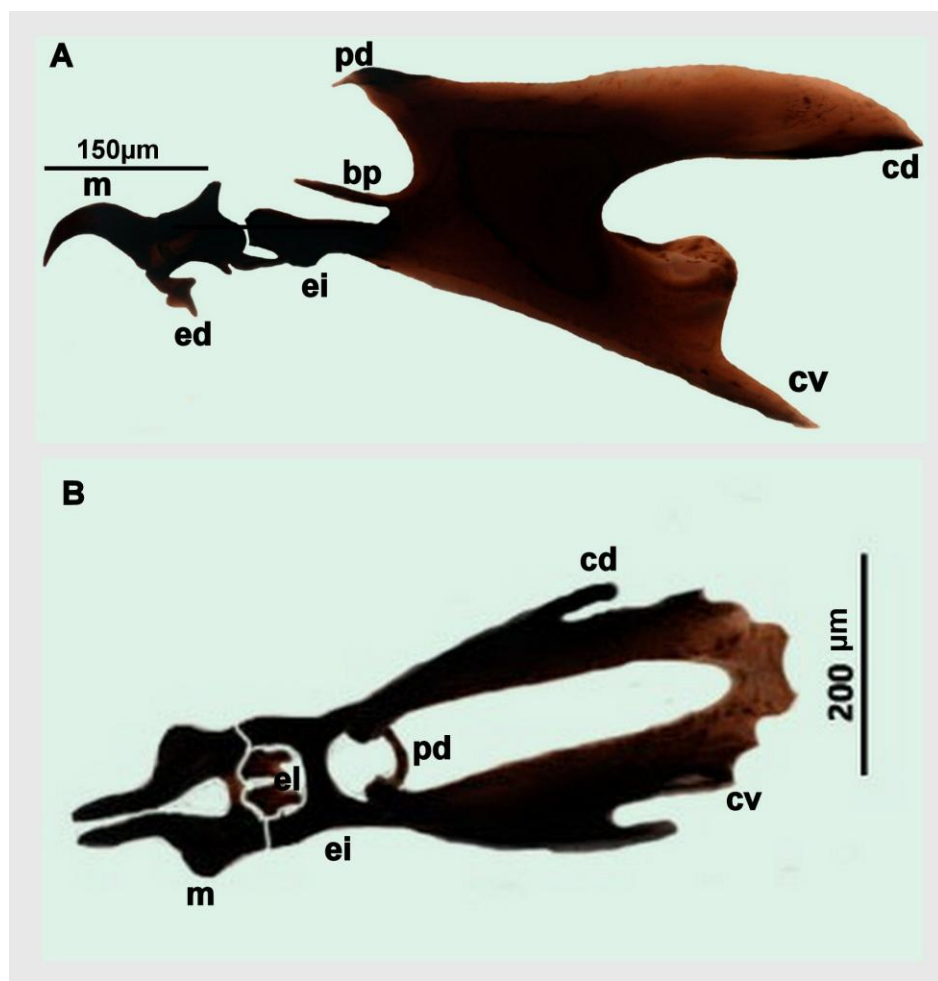


Figura 7. Vista ventral e lateral do cefaloesqueleto do segundo instar de *P. xanthogeneiates* sob MO. A) Vista lateral do cefaloesqueleto de segundo instar de *P.xanthogeneiates*. B) cefaloesqueleto de segundo instar de *P.xanthogeneiates* em vista ventral, ambas as fotos sob técnica de microscopia óptica. O cefaloesqueleto é composto por um par de mandíbulas (m), seguido de esclerito intermediário (ei), acima do esclerito intermediário há um par de barras parastomais (bp) e na extremidade inferior da mandíbula o esclerito dental (ed). A placa vertical é composta por uma ponte dorsal (pd) além de um par de cornus dorsais (cd) maiores que os cornus ventrais (cv).

A banda anterior de espinhos em A7 possui espinhos apenas até a metade do corpo da larva. As bandas de espinhos posteriores ocorrem ventralmente nos segmentos abdominais do segmento A1 até o segmento A7. Cada banda de espinhos anterior possui, em vista ventral, uma região transversal de formato fusiforme com menor quantidade de espinhos denominada “ventral creeping welt” e, em vista lateral, um conjunto de espinhos de aproximadamente três fileiras irregulares que delimitam uma área de formato fusiforme chamado “lateral creeping welt” (Fig. 9 a).

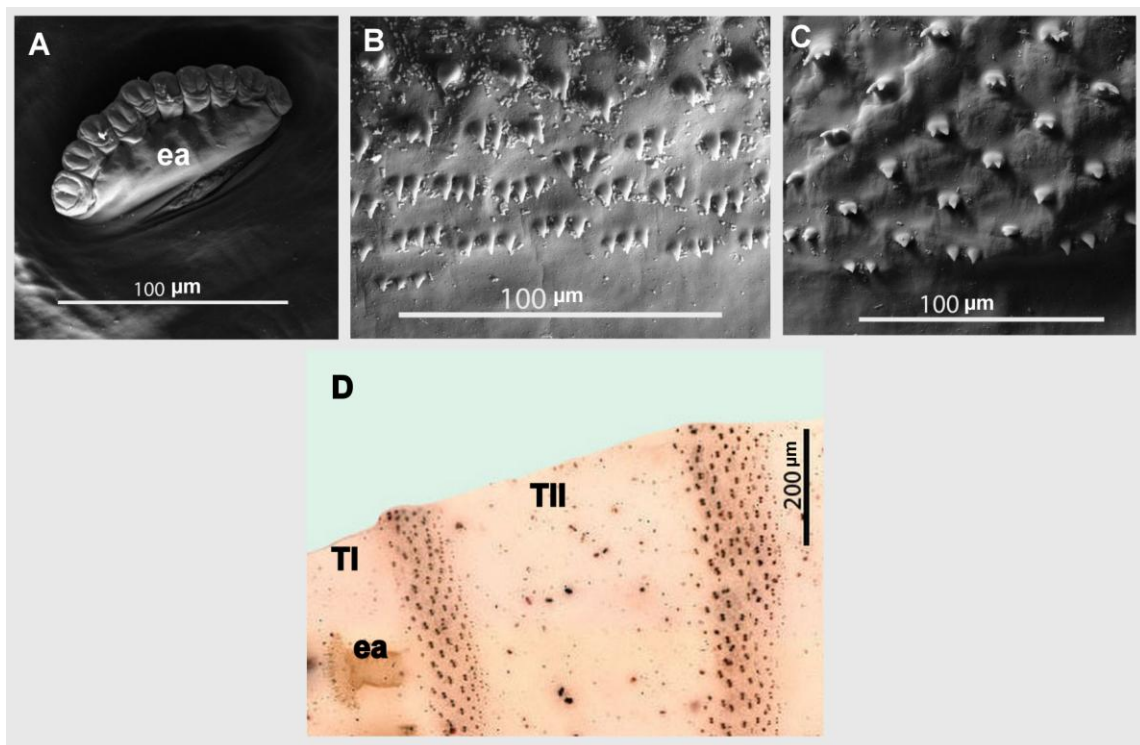


Figura 8. Segmentos torácicos de segundo instar de *P.xanthogeneiates* A) espiráculo anterior de segundo instar, sob MEV; B) segundo segmento torácico com detalhe em espinhos da região ventral sob MEV ; C) segundo segmento abdominal com detalhe em espinhos da região dorsal, sob MEV; D) detalhe do primeiro e segundo segmento torácico com detalhe nos espinhos e espiráculo anterior. O primeiro segmento torácico (TI) carrega o espiráculo anterior (ea).

Divisão anal: Os espinhos da banda anterior tem distribuição esparsa latero-ventralmente e não há espinhos na região dorsal, embora, na região ventral, o espaço ocupado pelos espinhos seja maior do que nos demais segmentos, como mostrado no primeiro instar. O espiráculo posterior possui peritrema incompleto com duas fendas na vertical, inclinadas para esquerda e um botão (Fig.10 a). A cavidade espiracular é rodeada por seis pares de papilas cônicas de tamanho similar (P1-P6) com sensila no ápice e um par de pequenas papilas anais (P7), neste instar são

menores em relação à altura e largura das demais papilas estão localizadas abaixo do espiráculo posterior. Os “anal pads” são protusos, cônicos e possuem forma definida. Toda a estrutura é circundada por espinhos que se assemelham a pelos. (Fig. 10b)

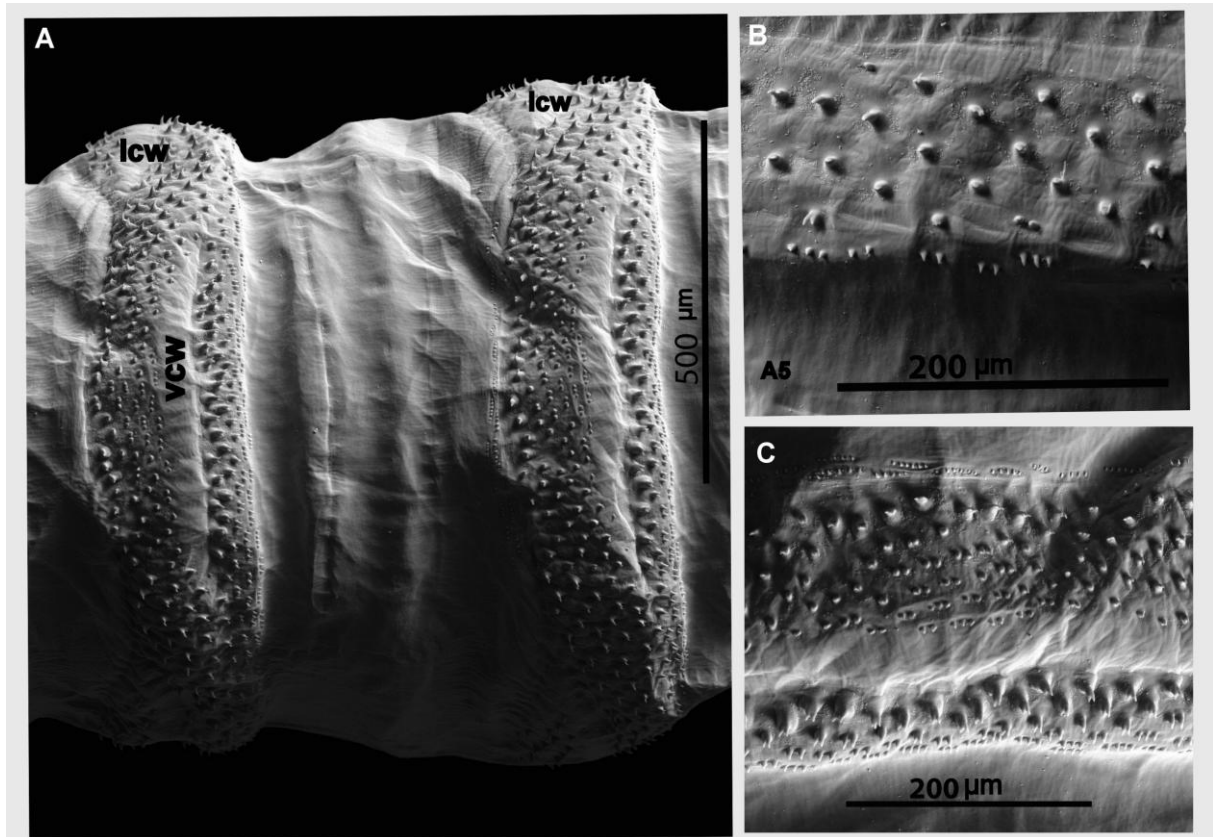


Figura 9. Segmentos abdominais de segundo instar de *P.xanthogeneiates* em vista ventral. A) Segmentos abdominais de segundo instar de *P. xanthogeneiates* em vista ventral. B) Detalhe dos espinhos da região dorsal do quinto segmento abdominal C) Detalhe dos espinhos da região ventral do quinto segmento abdominal. Em vista ventral os segmentos torácicos permitem a visualização da área ventral sem espinhos ou “ventral creeping welt” (vcw) e parte da área lateral sem espinhos a “lateral creeping welt” (lcw).

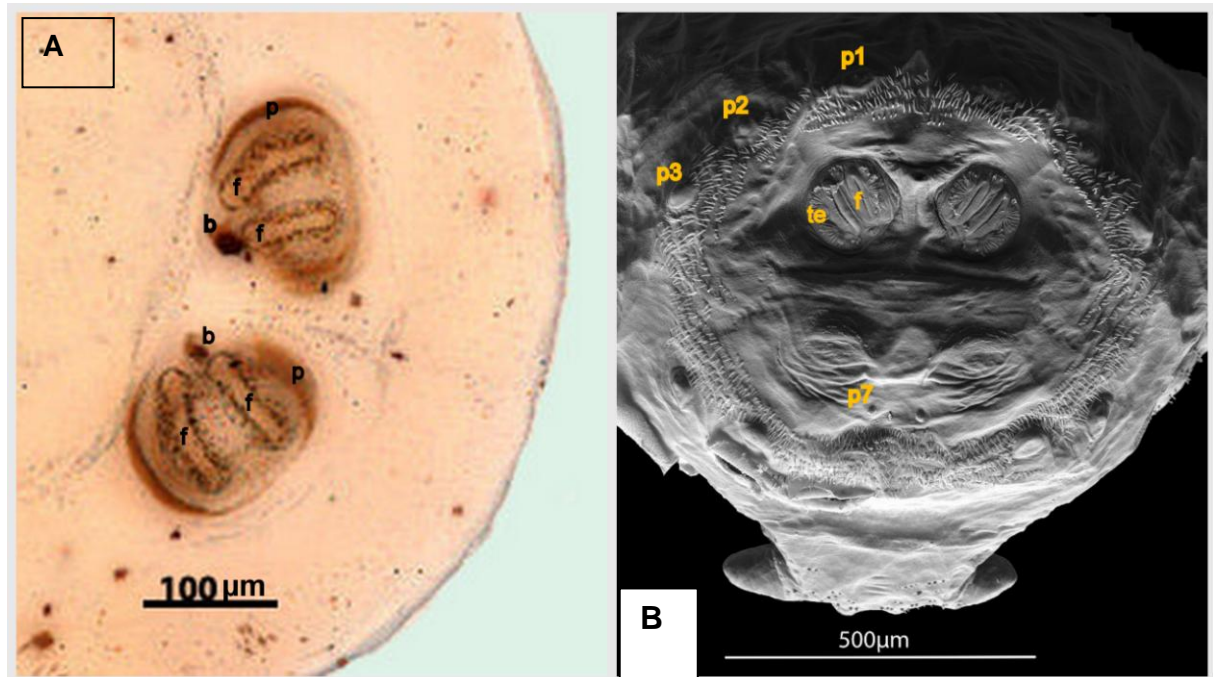


Figura 10. Divisão anal de *P.xanthogeneiates* sob MO e MEV. A) divisão anal sob microscopia óptica; B) divisão anal sob MEV. A divisão anal contém um par de espiráculos posteriores (ep) que neste instar possui duas fendas (f) rodeadas por tufos espiraculares (te) ainda por peritrema incompleto (p) com botão (b). Toda a cavidade espiracular é rodeada por papilas (p1 a p7) e abaixo há um par de anal pads (ap)

5.3 Descrição do Terceiro Instar (n:10):

Pseudocéfalo: O pseudocéfalo é bilobado e possui dois tipos de órgãos sensoriais: o complexo antenal e os palpos maxilares. O complexo antenal e palpos maxilares possuem o mesmo padrão estrutural descrito para o primeiro e segundo instar (Fig 11 b e c). O lobo labial é igual ao descrito para os demais instares (Fig. 11a). A máscara facial possui pontes orais conspícuas e o órgão ventral é arredondado e se localiza entre as pontes orais. Não há cirri. (Fig. 11a)

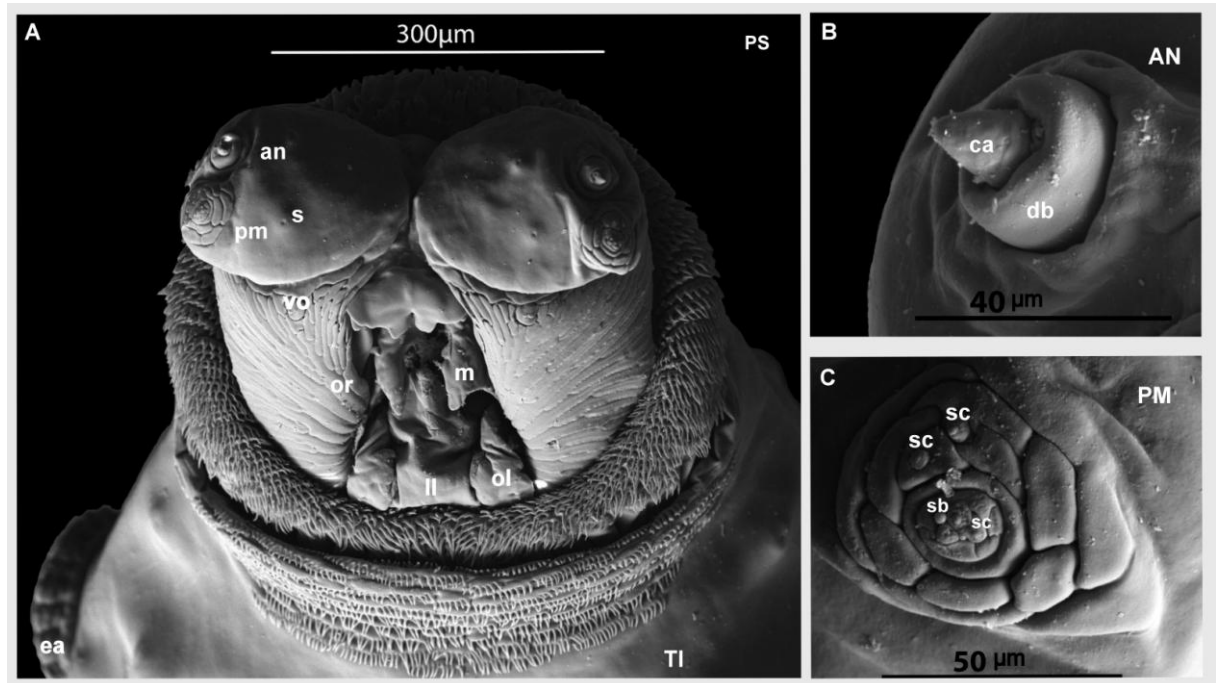


Figura 11. Pseudocéfalo de terceiro instar de *P.xanthogeneiates*. A) pseudocéfalo em vista mesma região encontra-se o órgão ventral (ov), na cavidade oral o lobo labial e par de órgãos labiais (ol) ; B) detalhe do complexo antenal (an); C) detalhe do palpo maxilar (pm) com sensilas coelocônicas (sc) e sensilas básicônicas

Cefaloesqueleto: Todos os escleritos são fortemente esclerotinizados O esclerito acessório oral é menos esclerotinado do que o esclerito dental e possui formato de vírgula, é pigmentado e se localiza abaixo e entre os ganchos (Fig. 12). O esclerito intermediário possui forma de H em vista ventral. Em vista lateral, a porção superior é reta e a porção inferior é côncava na região central. As barras parastomais são longas e finas com a ponta voltada para cima. O par de escleritos labiais está em posição antero-ventral entre os dois braços do esclerito intermediário. A ponte dorsal é pontiaguda e fortemente esclerotizada. A placa vertical tem 2,5 vezes o comprimento da barra parastomal. O cornu dorsal é 2,5 vezes o tamanho da placa vertical, enquanto que o cornu ventral mede aproximadamente a metade do tamanho da placa vertical (Fig. 12a)

Segmentos Torácicos: O padrão de distribuição dos espinhos e das bandas de espinhos é o mesmo descrito para os demais instares. Os espinhos são pequenos, com base alargada, com o mesmo tamanho porem afilados no ápice, que possui uma, duas ou três pontas achatadas dorso-ventralmente (Fig. 13 a e b). Em vista ventral os espinhos são amplos na base e afilados no ápice (Fig.13c). O espiráculo

anterior está em T1 e é composto por 10 a 11 lobos com formato digitiformes dispostos em uma única fileira (Fig. 13 d). Neste instar o tegumento possui algumas papilas do tipo distribuídas ventralmente sem um padrão (Fig 13.e)

Segmentos Abdominais: A superfície dos segmentos A1-A7 é lisa na região central, mas possui espinhos nas extremidades. Os espinhos, que são distribuídos espaçadamente em ambas as vistas, são pequenos, robustos na base e possuem uma, duas, três ou quatro pontas (Fig. 14 a e b). A distribuição das bandas de espinhos ao longo do corpo é o mesmo observado nos instares descritos anteriormente.

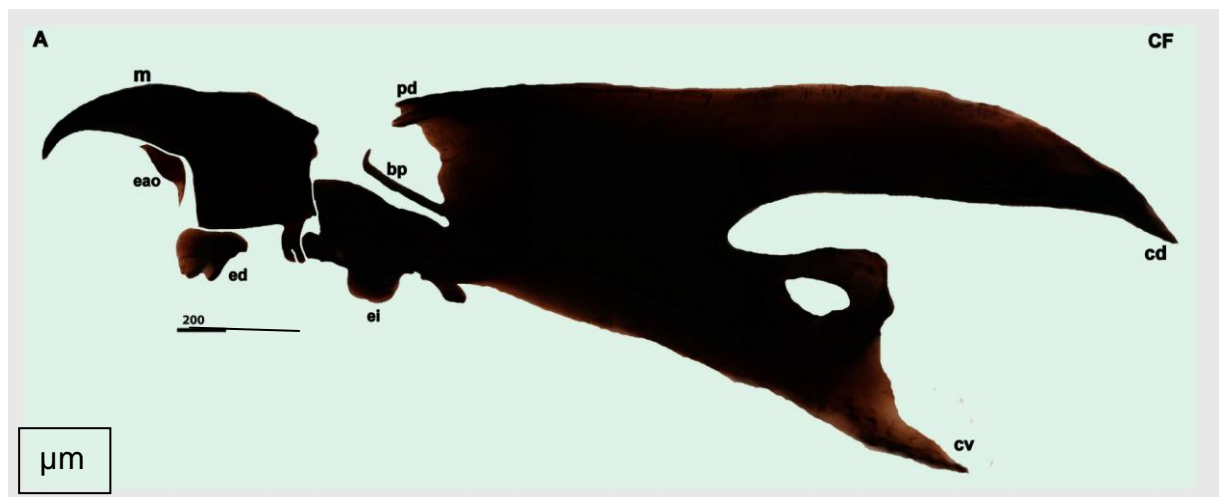


Figura 12. Cefaloesqueleto de primeiro instar de *P.xanthogeneiates* sob MO. Neste instar o cefaloesqueleto é composto por um par de mandíbulas (m), há um par de escleritos acessórios orais (eao) abaixo dos ganchos das mandíbulas e abaixo na região posterior da mandíbula o esclerito dental (ed). Em seguida o esclerito intermediário (ei), acima as barras parastomais (bp). A placa vertical contém ponte dorsal (pd) afiladas e cornus dorsais (cd) maiores que os cornus ventrais (cv).

Cada banda de espinhos possui, em vista ventral, uma região transversal de formato fusiforme com menor quantidade de espinhos denominada “ventral creeping welt” (Fig. 14 a) e, em vista lateral, um conjunto de espinhos de aproximadamente três fileiras irregulares que delimitam uma área de formato fusiforme chamado “lateral creeping welt”.

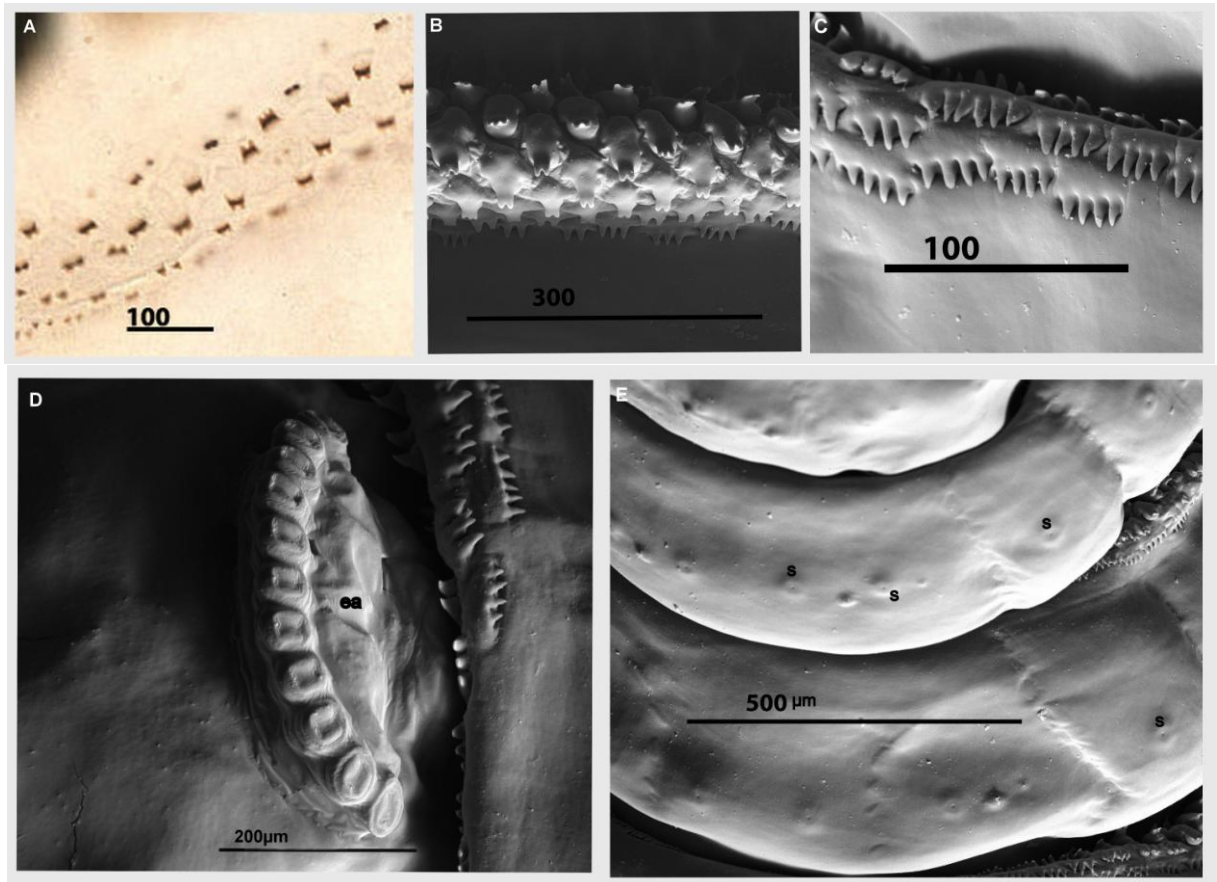


Figura 13. Segmentos torácicos de *P. xanthogeneiates* sob MEV. A) detalhe dos espinhos do primeiro segmento torácico; B) detalhe dos espinhos da região dorsal do segundo segmento torácico; C) detalhe dos espinhos da região ventral do primeiro segmento torácico. D) detalhe do espiráculo anterior no primeiro segmento torácico (ea) D) detalhe do tegumento ventral com sensilas (s).

Divisão Anal: A banda anterior, formato e posição dos “anal pads” é o mesmo descrito para os demais instares. No espiráculo posterior o peritrema é incompleto com três fendas e um botão. A cavidade espiracular é rodeada por seis pares de papilas (P1 – P6), com o dobro do tamanho em relação aos demais instares, formato cônico, com sensila no ápice e um par de papilas anais (P7) bem menores, mais do que a metade, em relação ao tamanho e área ocupada pelas demais papilas, P7 se

localiza abaixo dos espiráculos posteriores. Toda essa estrutura é rodeada por espinhos que se assemelham a pelos. (Fig. 15)

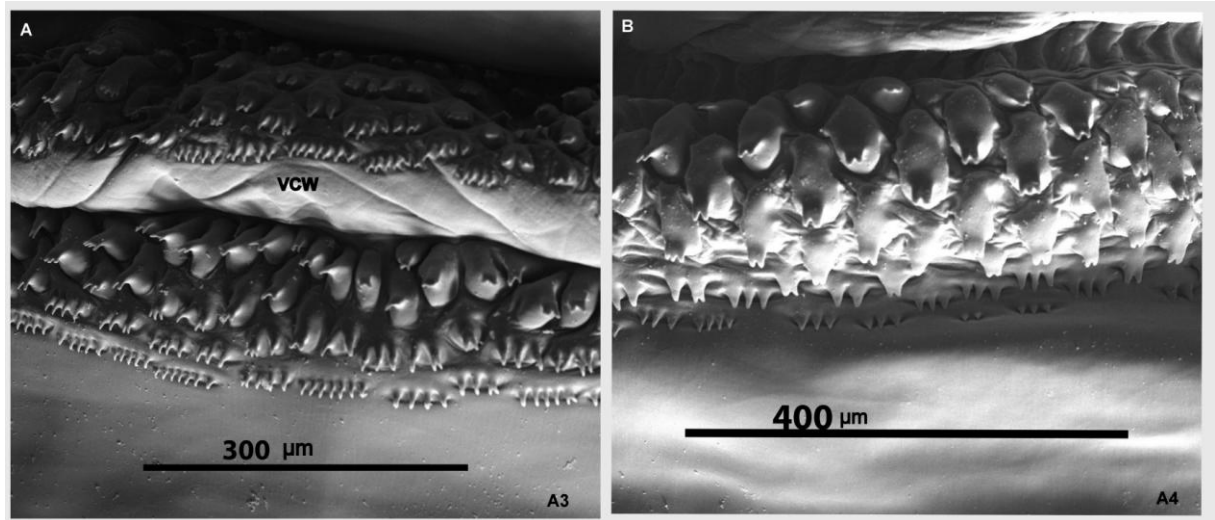


Figura 14. Segmentos abdominais do terceiro instar de *P. xanthogeneiates* em vista ventral e dorsal sob MEV. A) vista ventral do terceiro segmento abdominal onde é possível observar a região sem espinhos “ventral creeping welt” (vcw). B) vista dorsal do quarto segmento abdominal com detalhe para o formato dos espinhos.

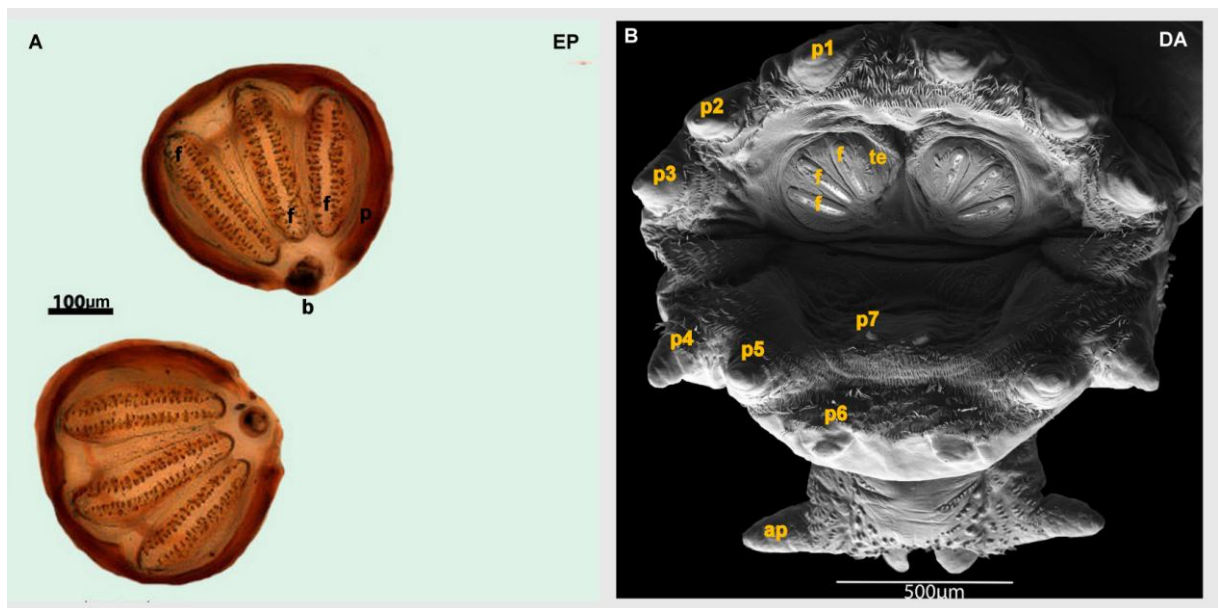


Figura 15. Divisão anal de terceiro instar de *P. xanthogeneiates*. A) par de espiráculos posteriores com peritrema incompleto (p) e botão (b), neste instar o espiráculo posterior possui três fendas (f), foto sob MO. B) divisão anal com par de espiráculos posteriores (ep) com três fendas (f) rodeadas por tufos espiraculares (te) e peritrema incompleto (p) e botão (b) rodeado por sete pares de papilas (p1 a p7) e espinhos. Abaixo da cavidade espiracular há um par de anal pads (ap).

6. DISCUSSÃO

A entomologia forense tem como principal premissa a identificação correta dos exemplares para que possa ser aplicada, neste caso, no cálculo de IPM. Os resultados desse trabalho fornecem as descrições morfológicas necessárias para que *Paralucilia xanthogeneaites* possa ser identificada, com segurança, mesmo se encontrada justamente com outras espécies. Os caracteres foram descritos a partir das duas técnicas, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia óptica (MO), porque elas tornam possível e facilitam o processo de identificação e diferenciação dos caracteres. Algumas espécies possuem características marcantes, passíveis de serem observadas apenas com microscopia óptica, enquanto outras são consideradas de difícil observação com essa técnica (QUEIROZ et al., 1997). Assim o uso conjunto da microscopia de varredura, e a tradicional microscopia óptica fornece caracteres que ajudam na tarefa de diferenciação e identificação de *P. xanthogeneaites*.

As características conspícuas de *P. xanthogeneaites* variam de acordo com o instar. No primeiro instar a máscara facial (pseudocéfalo), o padrão de espinhos, o cefaloesqueleto e o espiráculo posterior separam *P. xanthogeneaites* de outras espécies de Calliphoridae, quanto de outras famílias de hábito necrófago. Por exemplo, os imaturos de *Synthesiomyia nudiseta* (Diptera, Muscidae) (Velasquez, 2013) possuem projeções do “cirri” que se estendem por toda a extremidade superior da máscara facial. Em *Calliphora vomitoria* (SZPILA, 2014), *Chrysomia albiceps* e *Lucilia sericata* (SZPILA, 2013) as projeções do “cirri” se limitam a região superior da cavidade oral e, embora, o mesmo padrão ocorra em *P. xanthogeneaites*, a quantidade de projeções do cirri é maior em *C. vomitoria* do que em *P. xanthogeneaites*.

Outro caráter diagnóstico do primeiro instar é o padrão de espinhos, já que apresenta grande variação interespecífica porém com diferenças bem distintas na maioria das espécies (SALES, 2013; GREENBERG and SKYZA, 1984 e DEONIER & KINIPLING, 1940). Em *P. xanthogeneaites* os segmentos torácicos possuem a

banda anterior de espinhos completa, com uma quantidade maior de espinhos no primeiro segmento. Esse padrão é o mesmo nas espécies do gênero. No entanto, os segmentos abdominais possuem a banda anterior de espinhos completa apenas do segmento A1 a A6. O segmento A6 possui metade da quantidade de espinhos de A5 e o segmento A7 tem sua banda anterior limitada apenas à porção ventral e até a metade do corpo da larva. Já em *P. fulvinota* os segmentos abdominais possuem banda anterior de espinhos completa de A1 a A6 e o segmento A7 é incompleto. Embora essas duas espécies possuam padrão de distribuição de espinhos similares, possuem diferenças marcantes no cefaloesqueleto de terceiro instar. Em *P. paraensis* a banda anterior de espinhos é completa nos segmentos torácicos e nos abdominais de A1 a A5, sendo em A6, A7 e A8 incompleta. Já, *P. wheeleri* possui a banda anterior de espinhos completas de A1 a A5 assim como em *P. paraensis*, A6 é incompleta no dorso e A7 ocupa apenas a região ventral. Assim, o padrão de espinhos é um caráter muito útil na diferenciação destas espécies necrófagas.

O cefaloesqueleto, assim como o padrão de espinhos é descrito para todas as espécies necrófagas e pode ser uma característica importante para a identificação (SZPILA et. al. 2013, 2014). Em *P. xanthogeneiates* a análise da morfologia do primeiro instar mostrou que o cefaloesqueleto segue o padrão descrito para a família Calliphoridae, como pode ser observado em *C. putoria*; *C. macellaria* e *P. fulvinota* (GREENBERG & SKYZA, 1984), *S. chlorogaster* (BONATTO, 1996); *Hemilucilia semidiaphana*, *H. segmentaria* e *Lucilia sericata* (FLOREZ, 2009). Mas, em *P. xanthogeneiates* há três fileiras com número irregular de dentes (máximo de 5) em cada ápice da mandíbula. No entanto, para as demais espécies do gênero *Paralucilia* essa característica não foi descrita com detalhes, provavelmente devido à difícil observação em ambas as técnicas (MEV e MO), impossibilitando a determinação da importância dessa diferença. O uso do cefaloesqueleto neste instar pode ser otimizado se aplicado a ferramenta de microscopia confocal de escaneamento a laser, que mostra o posicionamento e detalhes do formato dos escleritos com maior precisão (GRZYWACZ, 2014).

O segundo instar não possui características que permitam a diferenciação das espécies porque os escleritos não possuem características específicas, ou seja, são similares em muitas espécies. Logo, se sugere que a descrição deste instar seja

usada apenas quando os demais instares não fornecerem informações suficientes ou no caso deste ser o único instar coletado.

No terceiro instar os caracteres mais conspícuos são: a presença de esclerito acessório oral pigmentado, o formato da ponte dorsal, o espiráculo anterior e posterior e a distribuição dos espinhos. Dentro do gênero *Paralucilia* apenas *P.xanthogeneiates* e *P. wheleeri* possuem esclerito acessório oral no terceiro instar larval. Em *P. xanthogeneiates*, esse esclerito tem pigmentação fraca, com formato triangular (ou de vírgula) ao passo que em *P. wheleeri* possui maior esclerotização, é maior em relação ao tamanho e na porção inferior possui dois pequenos lobos arredondados e achatados. Em *P. xanthogeneiates*, *P.fulvinota* e *P.wheleeri* a ponte dorsal é afilada enquanto que em *P. paraensis* é arredondada. O espiráculo posterior em *P.xanthogeneiates*, *P.fulvinota* e *P. paraensis* possui peritrema incompleto com botão; enquanto que *P. wheleeri* o peritrema é incompleto e há apenas a área em que estaria o botão. O espiráculo anterior possui de 10 a 11 lobos digitiformes em *P.xanthogeneiates*; 9-12 em *P. fulvinota*; 11-13 em *P. wheleeri* e 9-12 em *P. fulvinota*. Essa carater apresenta grande variação entre espécies, gêneros e famílias, por exemplo, *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) possui 7 lobos digitiformes, *S. nudiseta* (Wulp, 1883) possui 5 lobos e *Ravinia pernix* (Harris, 1780) (SZPILA, 2015) possui 16 lobos.

A análise morfológica permitiu o levantamento de caracteres chaves para a identificação dos imaturos de *P. xanthogeneiates* e sua diferenciação de outras espécies necrófagas. Na microscopia óptica, o padrão de distribuição das bandas de espinhos, o formato dos espinhos e o formato dos escleritos do cefaloesqueleto podem ser facilmente observados. A técnica de microscopia eletrônica de varredura permitiu a visualização detalhada do tegumento da larva, órgãos sensoriais e do conjunto de "cirri". No geral, a descrição dos caracteres através da microscopia óptica é mais efetiva, tanto pela facilidade de observação dos caracteres quanto pela possibilidade da utilização destes caracteres na identificação de *P. xanthogeneiates*. Os caracteres descritos a partir da microscopia eletrônica de varredura não são essenciais para identificação e diferenciação interespecífica. Porém, são importantes para fornecer uma descrição completa dos exemplares.

A descrição geral do padrão de distribuição de espinhos é uma característica que pode ser observada em microscópio óptico, possui grande variação entre espécies e se mostrou um dos caracteres mais importante na diferenciação e caracterização dos imaturos, ainda que não possa ser utilizado isoladamente.

7. CONCLUSÃO

No primeiro, segundo e terceiro instar a distribuição de espinhos é um caráter capaz de separar essa espécie das demais com morfologia larval previamente descritas dentro do gênero *Paralucilia* e, e de alguns outros gêneros de Calliphoridae. A observação dos demais caracteres como o formato do labro, quantidade de dentes e o cirri também fornecem informações que auxiliam nesta diferenciação. No terceiro instar, em conjunto com a distribuição de espinhos, a presença de esclerito acessório oral e seu formato além do número de lobos digitiformes que compõe o espiráculo anterior é suficiente para separar *P. xanthogeneiates* tanto das espécies dentro de Calliphoridae quanto de outras pertencentes a outras famílias.

Contudo, a identificação de *P. xanthogeneiates* requer uma comparação com outras descrições o que implica em um treinamento adequado em entomologia. Assim, ainda que as características necessárias para identificação tenham sido descritas, como é o caso, essa tarefa deve ser realizada por um entomólogo para evitar erros de identificação, tornando possível a aplicação dessa espécie na entomologia forense.

8. REFERÊNCIAS

ADAMS, Z.J.O. & HALL, M.J.R. 2003. Methods used for the killing and preservation of blowfly larvae, and their effect on post-mortem larval length. ***Forensic Science International***, **138**, 50–61.

AMENDT, J; KRETTEK, R. ZEHNER, R. 2004. Forensic Entomology. ***Naturwissenschaften*** (2004) 91:51–65.

AMENDT, J; CAMPOBASSO, C.P, REITER, C., LEBLANC, H.N., HALL M.J. 2007. Best practice in forensic entomology--standards and guidelines. *Int J Legal Med.* 2007 Mar;121(2):90-104. Epub 2006 Apr 22.

AMENDT, J; GOFF, M.L; CAMPOBASSO, C.P; GRASSBERG, M. 2010. Current Concepts in Forensic Entomology.

ANDERSON, G & DILLON, L 1995. Forensic Entomology. The use of Insects in Death Investigations to Determine Elapsed Time Since Death In Interior and Northern British Columbia Regions. **Technical Report**, Simon Fraser University.

ANDERSON, G. S. 1995. The use of insects in death investigations: a n analysis of forensic entomology cases in British Columbia over a five year period. **Canadian Society of Forensic Sciences Journal**. 28(4):277-292.

ANDERSON, G. S. 1999. Forensic entomology: the use of insects in death investigations. *Case Studies in Forensic Anthropology*. S. Fairgreave. Toronto, Charles C. Thomas.

ANDERSON, GS (2001.) Succession on carrion and its relationship to determining time of death. In: Byrd JH, Castner JL (eds) *Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations*. **CRC, Boca Raton, Fla.**, pp 143–175

ANDERSON GS, VAN LAERHOVEN, SL .1996. Initial studies on insect succession on carrion in southwestern British Columbia. **JForensic Sci** 41:617–625

MATTOS, W. B. 1919. As sarcophagas de São Paulo (These, Faculdade de Medicina e Cirurgia de São Paulo), iii + 116 +xii pp., 3 pls. São Paulo.

BENECKE, M, 2001. A brief history of entomology. Elsevier . Forensic Entmology International. 120 (2001)2-14

BENECKE, M.2004. Forensic Entomology: Artropods and Corpses. In: Tsokos M.(Ed.) **Forensic Patch Rev. Vol. II. Humana Press**, Totowa (NJ, USA), p. 207-240.

BERGERET, 1885. Determination of postmortem interval by the use of insects larvae and their metamorphosis. **Ann. Hyg. Méd. Leg.** 4 .442-452 (in French)

BONATTO, S.R.& CARVALHO, C.J.B. de. 1996. Ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae), criada sob condições de laboratório em dieta artificial. Rev. **Bras. Zool. [online]**., vol.13, n.3, p. 685-706.

BOMEMISSZA, G. F. 1 957 . An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. Aust. 1. Zool. 5:1-12

BYRD, J.H., CASTNER, J.L., 2001. Insects of forensic importance. In: Byrd, J.H., Castner, J.L. (Eds.), Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. **CRC Press**, Florida, pp. 43–79.

CARVALHO, L. M. L.; THYSSEN, P. J.; LINHARES, A. X & PALHARES F. A. B. 2000. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 95: 135–138

CARVALHO, L.M & LINHARES, A.X. 2001. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest área in Southeastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**.

CARVALHO, C. J. B. de & MELLO-PATIU C. A. 2008. Keys to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. Revista Brasileira de Entomologia 52: 390–406.

CASTNER, J, L. 2000. General entomology and arthropod biology. In: Byrd JH, Castner JL, orgs. **Forensic Entomology**. Washington: CRC Press 2000. P.17-42.

CATTS, E. P. & N. H. HASKELL. 1990. Entomology and Death: A procedural guide. E. P. Catts and N. H. Haskell, Eds. Forensic entomology specialties. Clemson, SC. 9-37.

CATTS, E. P. & M. L. GOFF. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. Annual Review of Entomology. 37: 253-272.

COURTNEY; G W, SINCLAIR, B J; MEIER R. 2000. Morphology and terminology of Diptera larvae. In: Contributions to a Manual of Palaearctic Diptera (with special reference to flies of economic importance) (eds. Papp L, Darvas B). **Science Herald Press**, Budapest, pp. 85-161.

DEAR, JP. 1985. A revision of the New World Chrysomyini (Diptera: Calliphoridae). **Rev..Bras. Zool** 3: 109-169.

DEONIER, C.C & KNIPLING, E.F. 1940. The Biology of *Comptosomyiops Wheeleri* (Hough) and Description of the Larva. **Entomological Society of America**. Volume 33, Issue 3, 1 September 1940

ERZINCLIOGLU, Y.Z. 1989. The early larval instars of *Lucilia sericata* and *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae): myiasis blowflies of Africa and Australia. **Journal of Natural History**. Volume 23, Issue 5.

ERZINCLIOGLU, Z. 1996. **Bowflies**. Slough, The Richmond Publishing Co. Ltd Great Britain, 71 p.

FLOREZ, E. & WOLFF, M. 2009. Descripción y Chave de Los Estadios Inmaduros de las Principales Especies de Calliphoridae (Diptera) de Importancia Forense em Colombia. **Neotropical Entomology** 38(3).

FRAGA, NJ. 2004. Comportamento de oviposição de adultos, tempo de desenvolvimento e morfologia dos imaturos de *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius), *H. semidiaphana* (Rondoni) e *Lucilia eximia* (Wiedemann) (Diptera:

Calliphoridae) na Reserva Florestal Adolpho Ducke, Manaus, AM. Brasil. **Dissertação de Mestrado em Entomologia. INPA/UFAM**

FERREIRA, MJM. 1979. Sinantropia de Dipteros Muscoideos de Curitiba. II: Sarcophagidae. **Rev. Brasil. Biol.** 39 (4): 773-781.

FREIRE, O. 1914. Algumas notas para o estudo da fauna cadavérica da Bahia. *Gazeta Médica da Bahia* 46: 149–162.

FREIRE, O. 1923. Fauna cadavérica brasileira. *Revista de Medicina* 3-4: 15–40.

GRASSBERGER, M; FRANK C 2003. Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat.. **J Med Entomol**:40

GRASSBERGER, M; REITER C .2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int* **120**:32–36

GREENBERG, B., KUNICH, J.C., 2002. Entomology and the Law. Flies as Forensic Indicators. **Cambridge University Press**, Cambridge, UK.

GREENBERG B; SZYSKA, M.L. 1984. Immature stages and biology of fifteen species of Peruvian Calliphoridae (Diptera). **Annals Entomol Soc Am.** 77:488 –517

Greenberg, B. 1991. Flies as forensic indicators. *Journal of Medical Entomology.* 28(5): 565-77.

GRZYWACZ, A., GÓRAL, T., SZPILA, K., HALL, M.J.R 2014. Confocal laser scanning microscopy as a valuable tool in Diptera.larval morphology studies. **Parasitol Res** (2014) 113:4297–4302

GOFF, M. L. and M. M. FLYNN. 1991. Determination of postmortem interval by arthropod succession: A case study from the Hawaiian Islands. *Journal of Forensic Sciences.* 36(2): 607-614.

GOOF, M.L., 2000. A Fly for the Prosecution. **Harvard University Press**, Cambridge, MA.

HASKELL, NH, HALL RD, CERVENKA VJ, CLARK, MA .1997. On the body: insect's life stage presence, their postmortem artifacts. In: Haglund WD, Sorg MH (eds) *Forensic taphonomy: the postmortem fate of human remains*. CRC, Boca Raton, Fla., pp 415–448

INTRONA F, CAMPOBASSO, C.P, DI FAZIO, A. 1998. Three case studies in forensic entomology from southern Italy. **J Forensic Sci** 43:210–214

KASHYAP, VP; PILLAI, V.V.1989. Efficacy of entomology method in estimation of postmortem interval: a comparative analysis. **For Sci Int**;40:245-50.

KEH,B.1985. Scope and Applications of forensic entomology. **Annu. Rev. Entomol.**30:137-54

KRAHMER, FL.1857. *Handbuch der gerichtlichen Medizin*. 2. Aufl. Berlin

LENKO, K. & N. PAPAVERO (1996). *Insetos no Folclore*, 2a ed., Plêiade/FAPESP, 468 p.

LORD, W. D., STEVENSON, J. R. 1986. *Directory of Forensic Entomologists*. Washington DC: **Am. Reg. Prof. Entomol.** 42 pp. 2nd ed

MEGNIN, JP .1894. *La faune des cadavres: application de l'entomologie a la médecine gale*. Masson et Gauthiers-Villars, Paris.

MCKINGHT, BE .1981. *The washing away of wrongs: forensic medicine in thirteenth-century China*. University of Michigan, Ann Arbor

MOURA, M. O.; CARVALHO, C. J. B. de; MONTEIRO-FILHO, E. L. de A.. 1997 . A preliminary analysis of insects of medico-legal importance in Curitiba, Parana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** , Rio de Janeiro, v. 92, n.2, p. 269-274, 1997.

MOURA, M. O. ; MONTEIRO-FILHO, E. L. de A.; CARVALHO, C. J. B. de . Heterotrophic succession in carrion arthropod assemblages . Brazilian Archives of Biology and Technology , Curitiba, v. 48, n.3, p. 473-482, 2005.

NUORTEVA. P. 1974. Studies on the possibilities of using blowflies (Diptera: Calliphoridae) as medicolegal indicators in Finland. *Annales Entomologici Fennici*. 40:70-74.

OLIVEIRA-COSTA, J, MELLO-PATIU, C. A. 2004. Application of forensic entomology to estimation of PMI in homicide investigation by the Rio de Janeiro Police Department in Brazil. **Journal of Forensic Medicine and Toxicology**, v.5, n.1, p. 40-44.

OLIVEIRA-DA-SILVA, A; ALE-ROCHA, R, Rafael J. A. 2006. Bionomia dos Estágios Imaturos de Duas Espécies de *Peckia* (Diptera, Sarcophagidae) em Suíno em Decomposição em áreas de Floresta no Norte do Brasil. **Rev Bras de Entomol**, v.50, n.4, p.524–527.

ORFILA, M.J & LESUEUR 1831. Traite des exhumations juridiques, et considerations sur les changements physiques que les cadavers eprouvent en se pourrissant dan las terres, dan l'eau, dan les fosses d'aisance et dans le fumier, Vols1-2. Paris, France: Bechet Jeune.

OLIVEIRA, T. C. & VASCONCELOS, S. D. Insects (Diptera) associated with cadavers at the Institute of Legal Medicine in Pernambuco, Brazil: Implications for forensic entomology. **Forensic Science International**.vol.CXXVIII, p.97–102, 2010.

PAYNE, JA. 1965. A summer carrion study of the baby pig *Sus scrofa* Linnaeus. **Ecology** 46:592–602

PESSÔA, S. & F. LANE. 1941. Coleópteros de interesse médico-legal. Ensaio monográfico sobre a família Scarabaeidae de S. Paulo e regiões vizinhas. Arquivos de Zoologia do Estado de São Paulo 2: 389–504.

PONT, A. C. 1980. Family Calliphoridae, pp. 779-800. In:Catalogue of the Diptera of the Afrotropical region. Ed.Flectcher and Ltd. Norwich, London, 1437 p.

PUJOL-LUZ, J.R.; Marques, H.; Ururahy- Rodrigues, A.; Rafael, J. A; Santana, F.H. A; Arantes, L. C.; Constantino, R. 2006. A Forensic Entomology Case from the Amazon Rain Forest of Brazil. **Journal of Forensic Science**. 51:1-3.

PUJOL-LUZ, J.; P. Francez; A. Ururahy-Rodrigues & R. Constantino.2008. The black-soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera, Stratiomyidae), used to estimate the postmortem interval in a case in Amapá State, Brazil. **Journal of Forensic Sciences** 53: 476–478.

QUEIROZ, M.M.C; Mello, P.M; Lima, M.M., 1997. Morphological Aspects of the Larval Instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) Reared in the Laboratory. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz [online]**. , vol.92, n.2, pp. 187-196.

SALES, T; RL FERREIRA-KEPPLER, A OLIVEIRA-DA-SILVA, ASB SOUZA. 2013. Description of Immature Stages and Development Time of *Paralucilia paraensis* (Mello) (Diptera: Calliphoridae) Associated with the Decomposition of a Partially Submerged Swine Carcass. **Neotrop Entomol.** 42:211–215.

SINGH, J. 2008. Forensic Entomology: A Supplement to Forensic death investigation. **JPAFMAT** 2008; 8(1).

SHEWELL, G. E. (1987) Calliphoridae. In: Manual of Nearctic Diptera. Research Branch Agriculture Canada. 2 : 1133-1145.

SMITH, K.G.V. 1986. A manual for forensic entomology. **British Museum (Nat.Hls)**. Cornell University Press. 205 pp.

SOUZA, AS. 2008. Calliphoridae (Diptera) associados a cadáver de porco doméstico *Sus scrofa* (L.) na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. **Dissertação de Mestrado**, Programa Integrado de Pós-Graduação INPA/UFAM Manaus Amazonas

SZPILA, K. 2013. Morphology and identification of first instars of the European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part I: Chrysomyinae

S Z P I L A K, S., PAPE, T., HALL & MADRA, A. Morphology and identification of first instars of European and Mediterranean blowflies of forensic importance. Part III: Calliphorinae *Medical and Veterinary Entomology* (2014) 28, 133–142

SZPILA, 2015. Third instar larvae of flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) of forensic importance—critical review of characters and key for European species ***Parasitol Res* (2015) 114:2279–2289**

THYSSEN, P. J 2005. Caracterização das formas imaturas e determinação das exigências térmicas de duas espécies de califorídeos (Diptera) de importância Forense Biblioteca digital da Universidade Estadual de Campinas.

TOMBERLIN, 2011. A roadmap for bridging basic and applied research in forensic entomology. ***Annu Rev Entomol.*** 2011;56:401-21.

URURAHY, RA.2008. Distribuição temporal dos Calliphoridae (Diptera) associados á decomposição de *Sus scrofa* Linnaeus (Suidae) na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Amazonas. **Tese de Doutorado**, INPA/UFAM, Manaus, AM

VAIRO, K.P. 2011. SARCOPHAGIDAE (DIPTERA) DE POTENCIAL INTERESSE FORENSE DE CURITIBA, PARANÁ: chave pictórica para as espécies e morfologia dos estágios imaturos de *Sarcodexia lambens* (Wiedemann). Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação de Entomologia. Universidade Federal do Paraná.

VAIRO, K.P; CORRÊA, R.C; LECHETA, M.C; CANEPARO, M.F; MISE, K.M; PRETli, D; Carvalho, C.J.B. de; ALMEIDA, L.M; MOURA, M.O. 2015. 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.*** Vol. 60, n. S1. P. S257–S260.

YOVANOVICH, P .1888. Entomologie applique la Mdecine Igale. Olliver-Henry, Paris

WIEGMANN, B.M; TRAUTWEIN, M.D; WINKLER, I.S. 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. ***PNAS.*** April 5, 2011. vol. 108 no. 14. 5691WELLS, J.D. 2014. Misstatements Concerning Forensic Entomology Practice in Recent Publications. ***J. Med. Entomol.*** 51(3): 489–490 (2014)

WIGGLESWOTH, VB. 1972. The principles of insect physiology. Chapman and Hall, London