

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIA CAROLINE FLISSAK

**Análise do Desenvolvimento Intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster*
(Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) para estimativa de Intervalo Pós-
morte (IPM)**

CURITIBA

2017

JULIA CAROLINE FLISSAK

**Análise do Desenvolvimento Intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster*
(Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) para estimativa de Intervalo Pós-
morte (IPM)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Osvaldo Moura

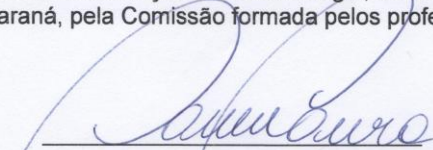
CURITIBA

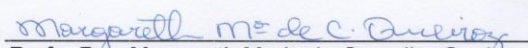
2017

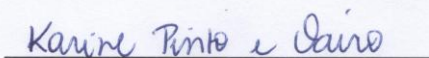
JULIA CAROLINE FLISSAK

“Análise do Desenvolvimento Intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster*
(Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) para estimativa de Intervalo Pós-
morte (IPM)”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre
em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal
do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Mauricio Osvaldo Moura (Orientador)
(UFPR)


Profa. Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz
(FIOCRUZ/RJ)


Profa. Dra. Karine Pinto e Vairo
(Universidade Positivo – UP/PR)

Curitiba, 20 de fevereiro de 2017.

*“Pesquisando a Natureza
Não se tem nada maior
Toda vida vai ao além
Toda matéria fica no pó”*

Alfredo Gregório de Melo

AGRADECIMENTOS

Agradeço sobre todas as coisas à Deus, por sempre me dar forças para a realização de todos os meus sonhos.

Aos meus avós maternos Elizário Cordeiro Marques e Sofia Marques (*in memoriam*) por toda base familiar e todo apoio até os últimos dias de suas vidas.

À minha mãe, Marinéia Marques, pelo cuidado exemplar com o meu bem mais precioso, minha filha, e por sempre me incentivar nos estudos.

À meu pai, Omar Estevão Flissak (*in memoriam*), pelo caráter concedido a mim.

Às minhas irmãs, Barbara Flissak e Fabiola Santore por todo apoio, carinho, conselhos, cuidados e principalmente o amor que sempre sentiram por mim.

À minha filha, Angela Neubauer, por reconhecer todo meu esforço, e entender a minha ausência nesses dois anos, e por ser a pessoa mais amável e carinhosa.

Ao meu namorado, Felipe, por toda compreensão e paciência, principalmente nas horas mais difíceis.

Aos meus sobrinhos, Camila, Matheus, Bárbara, John e Paola, pelo simples fato de me fazerem felizes em todos os momentos.

Aos demais familiares, Rosemari, Josias, Vania, Fernando, Fabi, Vivian, Simone por todo apoio.

Ao meu orientador, Mauricio Moura, que além de orientador, foi pai, psicólogo e um grande amigo, por todos os ensinamentos e conselhos para meu trabalho e pra vida.

À minha co-orientadora de graduação e amiga, Karine Vairo, pelo incentivo e dedicação na minha vida acadêmica.

Aos amigos de laboratório, Sabrina, Luana, Renatho, Peterson, Rudá e Lucas, pela agradável companhia ao longo do meu mestrado.

Agradeço à banca avaliadora, Margareth Queiroz e Karine Vairo, por terem aceitado o convite, e pela leitura do meu trabalho.

E por fim, a CNPq pela bolsa concedida nesses dois anos.

RESUMO

Sarconesia chlorogaster (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) é uma espécie de importância forense endêmica da região Sul que possui a morfologia dos estágios imaturos descrita e os tempos de desenvolvimento em seis temperaturas já registrados na literatura. A duração de seu desenvolvimento pupal é cerca de 70% do tempo do desenvolvimento total do imaturo. Portanto, em um contexto forense, as mudanças que acontecem nesse estágio, se refinadas, podem fornecer maior acurácia e confiabilidade ao cálculo do IPM mínimo usando imaturos de *S. chlorogaster*. Considerando a importância desta espécie, o objetivo principal deste trabalho foi identificar e descrever as mudanças morfológicas temporais do desenvolvimento das pupas de *S. chlorogaster*. Para isso, foi acompanhado o desenvolvimento de *S. chlorogaster* em dieta artificial em duas temperaturas constantes (20 e 25°C). A partir do momento em que a larva de terceiro instar se enterrou, foram mortas e fixadas 10 pupas a cada oito (8) horas. De cada uma das 10 pupas, a morfologia externa foi descrita e fotografada, a cada oito (8) horas, durante às 416 horas que durou o estágio de pupa. Foram definidos, baseado em caracteres morfológicos, sete fases de desenvolvimento intrapuparial, pupariação, apólise larva-pupa, pupa criptocefálica, pupa fanerocefálica, apólise adulto-pupa, adulto farado e emergência. Das 45 características descritas morfológicamente, 15 são potencialmente informativas para estimar a idade de *S. chlorogaster*. De maneira geral, o formato do corpo (presença ou ausência de tagmatização), a coloração geral, a presença visível do gancho do cefaloesqueleto (porção da mandíbula), os apêndices torácicos, a mudança na coloração dos olhos e a formação das cerdas são caracteres que podem ser usados para definir idades específicas. Com estes resultados, é possível estimar o intervalo pós-morte de um corpo, utilizando características morfológicas intrapupariais. A descrição detalhada, que aumenta o grau de confiabilidade, derivada de uma técnica de análise morfológica de rotina, tende a permitir uma utilização mais ampla e confiável dessas informações para a estimativa do IPM.

Palavras-chaves: Entomologia forense, morfologia interna, moscas necrófagas

ABSTRACT

Sarconesia chlorogaster (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) is a key forensic species endemic to the Southern region which has the immature stages morphology described and the development larval rate at six temperatures estimated. The duration of the pupal stage is about 70% of the time of total immature development. Thus, in a forensic context, changes occurring at this stage, if refined, can add accuracy and reliability to estimates of the minimum IPM using immature *S. chlorogaster*. Considering the importance of *S. chlorogaster*, the main objective of this work was to identify and to describe the temporal changes in the intrapupal development of *S. chlorogaster*. The intrapupal development were described for immatures reared in artificial diet in two constant temperatures (20 and 25°C). From the moment the third instar larvae were buried, 10 pupae were killed and fixed in a eight (8) hours interval. From each of the 10 pupae, the external morphology was described and photographed during the 416 hours of the pupal stage. Based on morphological characters, seven stages of intrapuparial development, pupariation, larval-pupal apolysis, cryptocephalic pupa, phanerocephalic pupa, pupal-adult apolysis, pharate adult and emergence were defined. Of the 45 morphological diagnostic characteristics described, 15 are potentially informative to estimate *S. chlorogaster* age of. In general, the shape of the body (presence or absence of tagmatization), immature color, the presence of the mouth hook (portion of the jaw), the presence of thoracic appendages, the change in the color of the eyes and the formation of the bristles are characters useful to estimate specific ages. With these chronological changes in morphology it is possible to estimate the postmortem interval of a body, using intrapuparial morphology. A detailed morphological analysis, which enhances reliability and is based on routine techniques such as microscopy, tends to allow a wider use of this information to estimate post mortem interval.

Keywords: Forensic entomology, internal morphology, necrophagous flies

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. Estabelecimento da colônia	15
2.2. Desenho experimental	15
2.3. Fixação das Pupas	16
2.4. Desenvolvimento intrapuparial	16
2.5. Análises	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Desenvolvimento intrapuparial à 20°C	17
3.2 Efeito da temperatura no desenvolvimento intrapuparial	23
4 DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vista dorsal do desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* à 20°C.....20
- Figura 2.** Vista ventral do desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* à 20°C.....21
- Figura 3.** Desenvolvimento da cabeça em vista ventral de *Sarconesia chlorogaster* à 20°C.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempo médio de duração (média \pm desvio padrão), valores máximos e mínimos (range) de cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* (Wied.) em duas temperaturas, 20 e 25°C.....23

Tabela 2. Características chaves no desenvolvimento potencialmente informativas para estimar a idade de *Sarconesia chlorogaster* nas temperaturas constantes de 20 e 25°C.....25

1 INTRODUÇÃO

A entomologia forense se baseia na utilização de insetos e outros artrópodes como indício em investigações criminais (Smith, 1986; Catts & Goff, 1992). Essa possibilidade de aplicação ocorre porque os insetos necrófagos são os primeiros animais a chegar ao corpo, minutos após a morte, atraídos por compostos químicos que indicam um substrato para oviposição/larviposição, alimentação e de cópula (Smith, 1986; Carvalho & Linhares, 2001).

Durante o processo de decomposição de um cadáver, há a liberação de muitos compostos orgânicos voláteis (VOCs), que são usados pelos insetos para detectar o corpo (Dekeirsschieter et al., 2009; Hoermann et al., 2011). Como, tanto os adultos quanto os imaturos permanecem no corpo ao longo do período de decomposição (Catts & Goff, 1992), podem ser usados para indicar períodos específicos de tempo de ocorrência. Essas estimativas de tempo de permanência em um corpo, assumem uma importância fundamental para a determinação do intervalo pós-morte (IPM) (Schoenly et al., 1996), que corresponde ao período de tempo entre a ocorrência da morte e o momento em que o corpo é encontrado (Greenberg, 2002; Toberlin et al., 2011; Wells et al., 2015).

A estimativa do IPM envolve a definição do intervalo de tempo máximo e mínimo provável entre a morte e a descoberta do cadáver. O limite máximo é determinado pelas espécies de insetos e seus hábitos que pode ser usado para dar uma estimativa do tempo de exposição de um cadáver. Já o limite mínimo é determinado em grande parte pela estimativa do desenvolvendo de insetos imaturos no momento da descoberta do cadáver (Catts, 1992).

Da mesma maneira, através dos padrões de sucessão e hábitos das espécies pode-se inferir o intervalo de tempo que o cadáver ficou exposto ao ambiente. Os padrões de sucessão indicam o período que determinada espécie permanece no corpo. Assim, é possível estimar tanto um período mínimo quanto máximo de IPM (Schoenly et al., 1992). Como por exemplo, Goff (1991), analisando 35 casos em corpos em fases diferentes de decomposição no Havaí, encontrou uma variedade de espécies restritas a estágios iniciais de decomposição, assim como as que eram restritas aos estágios finais de decomposição.

No entanto, ambas as formas de análise de vestígios entomológicos dependem de uma base de dados acurada, derivada de estudos experimentais, para que a confiabilidade das estimativas possa ser determinada (Amendt et al., 2004; Tomberlin et al., 2011;

Michaud et al., 2012). A determinação do IPM mínimo é, usualmente, feita utilizando-se o tempo de desenvolvimento dos imaturos encontrados em um corpo (Voss et al., 2011), já que a maioria dos corpos é encontrado poucos dias após a morte (Anderson, 2005). A duração do desenvolvimento do período larval pode ser estimada de várias formas, como pela estimativa da idade da larva através do tamanho (comprimento ou peso) (Costa et al., 2006), pela análise da morfologia e duração de cada fase do desenvolvimento (Oliveira et al., 2007, Lecheta et al., 2015) e também de acordo com o número de aberturas espiraculares, e a presença ou ausência dos espiráculos anteriores (Queiroz et al., 1997).

Como as variáveis abióticas influenciam tanto as taxas de crescimento dos insetos como, também, as taxas de decomposição de um corpo, elas são fundamentais para uma estimativa mais acurada do IPM mínimo (Wells & Lamotte, 2010). Por exemplo, temperaturas altas tendem a acelerar o desenvolvimento de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae), reduzindo o tempo de seu desenvolvimento ao passo que, temperaturas baixas tendem a diminuir a taxa de desenvolvimento, levando a um aumento no tempo do desenvolvimento de cada estágio (Lecheta et al., 2015). Da mesma forma, altas temperaturas tendem a aumentar a taxa de decomposição dos corpos (Mann et al., 1990; Campobasso et al., 2001) de maneira direta, através do efeito nos processos químicos no corpo, ou indireta, pela ação na atividade de insetos e microorganismos. Sendo assim, a temperatura é um fator fundamental na estimativa do IPM (Wells & Lamotte, 2010; Pinheiro et al., 2012).

Dos estágios de desenvolvimento dos insetos holometábolos, o estágio de pupa é o que tem a maior duração, sendo a pupa formada pelo tegumento do último instar larval (Hinton, 1946; Fraenkel & Bhaskaran, 1973; Denlinger & Ždárek, 1994). É nessa fase que ocorrem as mudanças estruturais mais marcantes de todo o desenvolvimento do inseto, ocasionadas pela reorganização de tecidos, evaginação da cápsula cefálica e emergência dos apêndices torácicos (Hinton, 1946, 1948, 1963; Denlinger & Ždárek, 1994). Porém, o tempo em que essas mudanças estruturais ocorrem durante o desenvolvimento pupal pode variar conforme a espécie (Costa et al., 2006). Por exemplo, em *Lucilia sericata* (Meigen, 1826) (Diptera, Calliphoridae) os espiráculos respiratórios (sifão) surgem após as 40 horas de desenvolvimento (Karabey & Sert, 2014) ao passo que em *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1842) (Diptera, Calliphoridae) os espiráculos respiratórios surgem nas primeiras 8 horas de desenvolvimento (Ma et al., 2015).

A maior parte da dipterofauna necrófaga é representada por califorídeos (Oliveira-Costa, 2011; Gennard, 2012). O estágio de pupa de Calliphoridae é sedentário e compreende mais da metade da duração do ciclo de vida total (Anderson, 2000). Por exemplo, em *S. chlorogaster*, a duração do desenvolvimento pupal é cerca de 70% do tempo do desenvolvimento total (Lecheta et al., 2015). Portanto, em um contexto forense, as mudanças que acontecem nesse estágio, se refinadas, podem fornecer maior acurácia e confiabilidade ao cálculo do IPM mínimo (Brown et al., 2015).

A idade da pupa pode ser estimada a partir das variações na morfologia interna ou externa usando técnicas de microscopia (Brown et al., 2015) ou técnicas mais refinadas como a tomografia micro-computadorizada 3D (Richards et al., 2012). As variações externas na pupa ainda podem ser descritas através das mudanças na coloração do pupário (Vairo et al., 2014). Ainda, é possível estimar a idade de uma pupa usando a variação temporal na expressão gênica de determinados marcadores por métodos moleculares (Ames et al., 2006; Tarone et al., 2007; Zehner et al., 2009). Mas, embora extremamente úteis, algumas dessas técnicas não são possíveis de serem realizadas como análises de rotina pela polícia técnica porque, no geral, não há laboratórios de pesquisa conveniados com a polícia para desenvolver algumas técnicas mais avançadas no Brasil (Oliveira-Costa, 2007). Soma-se a isso o fato de que uma parte das amostras trazidas para o laboratório terão que ser criadas até adulto para identificar a espécie, pela ausência de chaves com caracteres de pupa para a região neotropical. No entanto, como são os peritos criminais ou assistentes técnicos que vão analisar os vestígios entomológicos (Linhares, 2007), a existência de descrições detalhadas da morfologia, tanto interna como externa das espécies necrófagas, facilitam a utilização de técnicas e procedimentos usuais de rotina, como a microscopia óptica, para a estimativa da idade da larva ou pupa.

No geral, dentro da família Calliphoridae, o número de espécies de importância forense com descrição acurada do desenvolvimento intrapuparial é pequeno (e.g. Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Richards et al., 2012; Defilippo et al., 2013; Karabey & Sert, 2014; Proença et al., 2014; Ma et al., 2015; Barros-Cordeiro et al., 2016). Isso implica na limitação do uso desse estágio, que pode ser fundamental para estimar o IPM em um caso. Por exemplo, Vairo et al. (2014) descreveram o primeiro caso de estimativa de IPM baseado em evidências entomológicas no sul do Brasil. Nesse caso, foram utilizadas pupas de *S. chlorogaster* e larvas de 3º instar de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819) (Diptera, Calliphoridae) para estimar o IPM mínimo. Embora o tempo de desenvolvimento total da pupa de *S. chlorogaster* seja conhecido (Lecheta et

al., 2015) o refinamento da estimativa do tempo de desenvolvimento da pupa para cálculo do IPM mínimo foi realizado através de mudanças na coloração externa do pupário, feitos por experimentos subsequentes.

Das espécies necrófagas que ocorrem no sul do Brasil, *S. chlorogaster* é de importância forense comprovada (Vairo et al., 2014). Embora tenha o tempo de desenvolvimento e a morfologia externa das larvas e pupas descritos (Bonatto & Carvalho, 1996; Bonatto, 1996; Lecheta et al., 2015) ainda são necessários dados refinados para o desenvolvimento intrapuparial. *S. chlorogaster* é encontrada exclusivamente na América do Sul, entre as latitudes 4° e 40°. É a única espécie de Toxotarsinae (Calliphoridae) que ocorre no Brasil, com distribuição limitada aos estados da Região Sul (Mello, 1972; Lopes & Albuquerque, 1982; Queiroz et al., 1985; Carvalho & Ribeiro, 2000) o que possibilita que seja considerado um bom indicador regional para estimativa de IPM (Moura et al., 1997; Krüger et al., 2010, Vairo et al., 2014). Assim, considerando a posição chave de *S. chlorogaster* como espécie forense no Brasil e a ausência de descrições de mudanças morfológicas que ocorrem na pupa, o objetivo principal deste trabalho foi identificar e descrever as mudanças morfológicas temporais do desenvolvimento das pupas de *S. chlorogaster*, gerando uma base de dados para uso em entomologia forense.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Estabelecimento da colônia

Os indivíduos adultos de *Sarconesia chlorogaster* foram coletados em substrato de vísceras de peixe em uma armadilha Shannon modificada, colocada na Reserva Mata Viva no campus do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná (25°25'S e 49°14'W) na cidade de Curitiba, PR. A partir dos adultos coletados foram estabelecidas as colônias em laboratório, onde foram acondicionados em gaiolas e permaneceram sob condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$), fotoperíodo (12:12horas) e umidade relativa de ($70\% \pm 10$). Para a alimentação dos adultos foi usado dieta a base de açúcar e leite em pó, e a água foi fornecida em frascos tampados com gaze. Para obter posturas para os experimentos de desenvolvimento intrapuparial foi utilizado carne bovina moída crua putrefata. Ao longo das gerações, foram introduzidos adultos selvagens nas colônias, para que se mantivesse a variabilidade genética das colônias.

2.2. Desenho experimental

Para acompanhar o desenvolvimento intrapuparial de *S. chlorogaster* foram retirados aproximadamente 1000 ovos da criação massal das colônias estabelecidas em laboratório, que foram subdivididos em seis potes contendo dieta artificial (Estrada et al., 2009) para a alimentação *ad libitum* dos imaturos. Esses potes foram colocados dentro de recipientes maiores contendo vermiculita como substrato para a pupariação, tampados com tecido voal e elástico e acondicionados em duas câmeras climatizadas tipo B.O.D., três recipientes em 20°C e os outros três em 25°C.

A determinação das mudanças morfológicas na fase de pupa foi iniciada a partir do momento que a larva de terceiro instar se enterrou completamente na vermiculita, parando de se locomover totalmente.

2.3. Fixação das Pupas

As pupas foram mortas em água quente (70 a 85°C) e fixadas em solução Álcool-Formaldeído-Ácido acético (AFA) (álcool etílico 70%: formaldeído 37-40%: ácido acético glacial = 2,5:1:1,5) em tubos de eppendorfs. Durante o processo de fixação, o pupário foi perfurado nas extremidades para facilitar a penetração do fixador (Brown et al., 2012). Após fixados os pupários foram mantidos a -20°C até a dissecação. Logo após a dissecação, as pupas foram preservadas em Etanol a 70% como exemplares voucher.

2.4. Desenvolvimento intrapuparial

Para as análises morfológicas, foram dissecadas, em cada temperatura, 10 pupas escolhidas aleatoriamente dos potes, a cada oito horas. O desenvolvimento intrapuparial foi observado e fotografado no laboratório Taxon-line localizado na Universidade Federal do Paraná. As fotografias foram capturadas com montagem de imagens sequenciais em diferentes planos focais no estereomicroscópico LEICA MZ16, câmera fotográfica LEICA DFC 500 e no módulo LEICA LAS 3D VIEW E LAS MONTAGE. As fotografias foram editadas e diagramadas no programa Adobe photoshop CS6 (64Bit). Como o tempo de desenvolvimento de *S. chlorogaster* é, em média, de 326 horas na temperatura de 25°C, e em média de 428 horas na temperatura de 20°C (Lecheta et al., 2015), considerando que foram analisadas 10 pupas de 8 em 8h, aproximadamente 960 pupas de *S. chlorogaster* foram analisadas, em ambas temperaturas.

2.5. Análises

Para as análises do desenvolvimento intrapuparial e classificação das fases da pupariação foi usada a terminologia descrita por Fraenkel & Bhaskaran (1973), amplamente utilizada (Cepeda-Palacios & Scholl, 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Richards et al., 2012; Defilippo et al., 2013; Barros-Cordeiro et al., 2014; Karabey & Sert, 2014; Proença et al., 2014; Ma et al., 2015; Barros-Cordeiro et al., 2016), revisada por Martín-Vega et al., 2016 e adaptada de acordo com os caracteres morfológicos que surgem ao longo do desenvolvimento de *S. chlorogaster*.

3 RESULTADOS

A morfologia intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* foi descrita detalhadamente nas temperaturas de 20° e 25°C. Embora as taxas de desenvolvimento sejam diferentes, a ordem das mudanças morfológicas é a mesma. Assim, a descrição das mudanças morfológicas mais evidentes em cada estágio de desenvolvimento será feita utilizando como base o desenvolvimento a 20°C.

3.1 Desenvolvimento intrapuparial à 20°C

A morfologia externa foi observada e fotografada, a cada oito (8) horas, durante às 416 horas que durou o estágio pupal. Em cada fase do desenvolvimento intrapuparial foram registrados os marcadores morfológicos mais importantes e o tempo de duração (mínimo e máximo colocado entre parênteses) de cada fase, descritos a seguir.

Fase 1. Pupariação (0h). A fase de pupariação se inicia no momento em que a larva parou de se movimentar completamente. Nesse estágio, o pupário ainda não está formado e a pupa possui um aspecto gelatinoso, bem esbranquiçada, muito parecida com uma larva, corpo todo segmentado (Fig. 1A).

Fase 2. Apólise larva-pupa (8-16h). Nessa fase, ocorre a separação da cutícula do último instar larval, que dará origem ao pupário. Com 8 horas, a pupa é esbranquiçada e é possível ver na região antero-ventral a projeção em forma de gancho da ponta da mandíbula (mouth-hook) de coloração preta (Fig.1B). Com 16 horas, a pupa se parece muito com o pupário e, embora continue esbranquiçada, possui manchas de coloração alaranjada ao longo do corpo, com predomínio nas regiões mediana e posterior da pupa (Fig.1C).

Fase 3. Pupa criptocefálica (24-32h). A pupa nessa fase se parece muito com o pupário e não possui segmentação corporal bem definida. Com 32 horas de desenvolvimento ainda não é possível definir claramente a distinção entre cabeça, corpo ou abdômen (Fig1D) embora, seja nesse período de tempo que se inicia a emergência dos apêndices torácicos (Fig2A).

Fase 4. Pupa fanerocefálica (40-112h). É nessa fase que ocorre a evaginação da cabeça e dos apêndices torácicos, além de uma redução no tamanho do abdômen. A formação da

cabeça, com os olhos destacados e com o gancho oral bem evidente (Fig.1E) já é visível com 40 horas. A emergência dos espiráculos respiratórios (sifão) nas laterais da cabeça (Fig.1F), a emergência dos apêndices torácicos (Fig.2B), olhos de coloração transparente e a redução do tamanho do abdômen são características morfológicas que ocorrem com 48 horas de desenvolvimento. Já, a emergência dos espiráculos abdominais (Fig.1G) só ocorre após 72 horas.

Fase 5. Apólise adulto-pupa (120-224h). Nesta fase, a formação do adulto está praticamente completa porque se observam todos os apêndices torácicos bem desenvolvidos e ocorre o início do desenvolvimento das peças bucais. Com 120 horas, as asas já estão desenvolvidas (Fig. 1H) e se inicia a formação dos segmentos nas pernas (Fig.2C). Além dessas modificações morfológicas no tórax, se iniciam, na cabeça, o desenvolvimento do pedicelo da antena, do clipeo (Fig.3A) e das peças bucais. Com 192 horas se inicia a segmentação abdominal (Fig.1I).

Fase 6. Adulto Farado (232-408h). Nesta fase o adulto está completamente formado. É a fase mais longa do desenvolvimento. Com 232 horas se inicia a coloração dos olhos (Fig.1J). Já, com 240 horas, os olhos têm coloração amarelada (Fig.1K) e com 256 horas, os olhos possuem coloração avermelhada (Fig.1L), se tornando completamente vermelhos com 280 horas de desenvolvimento (Fig.1M). Com 288 horas, as pernas ainda são esbranquiçadas, sem coloração evidente (Fig.2D). Com 312 horas, os olhos adquirem coloração marrom e aparecem as cerdas torácicas (Fig.1N). Com 320 horas, surgem as cerdas na frente (Fig.1O), na região do aparelho bucal (Fig.2E) e de mais uma peça bucal, o *labrum* (Fig.3B). Com 328 horas, a segmentação das pernas é bem evidente, mudando a coloração, se tornando mais escuras (Fig.2F). Com 336 horas, as cerdas da frente e do tórax são bem evidentes; surgem as cerdas marginais no abdômen (Fig.1P), as pernas ficam mais escuras (Fig.2G), as peças bucais e o pedicelo da antena estão bem delimitados (Fig. 3C). Com 344 horas, o pedicelo (Fig.2 H) é alongado, formando uma projeção na frente (Fig.1Q). Com 376 horas, a projeção na frente é bastante evidente, o abdômen muda sua coloração, ficando mais escuro (Fig.1R), as pernas estão bem desenvolvidas, com coloração preta e a projeção na frente é onde se localiza o pedicelo juntamente com a antena totalmente formada (Fig. 2I). Com 384 horas, a projeção na frente vai se compactando, diminuindo seu tamanho (Fig.2J). Com 392 horas, a coloração geral da pupa escurece e a projeção na frente diminui ainda mais de tamanho (Fig. 1S). Com 408

horas, o desenvolvimento está completo e o adulto está totalmente formado, pronto para emergência (Fig.1T, Fig.3D).

Fase 7. Emergência (416h). Esta fase é conhecida como imago e é caracterizada pela emergência do adulto do pupário.

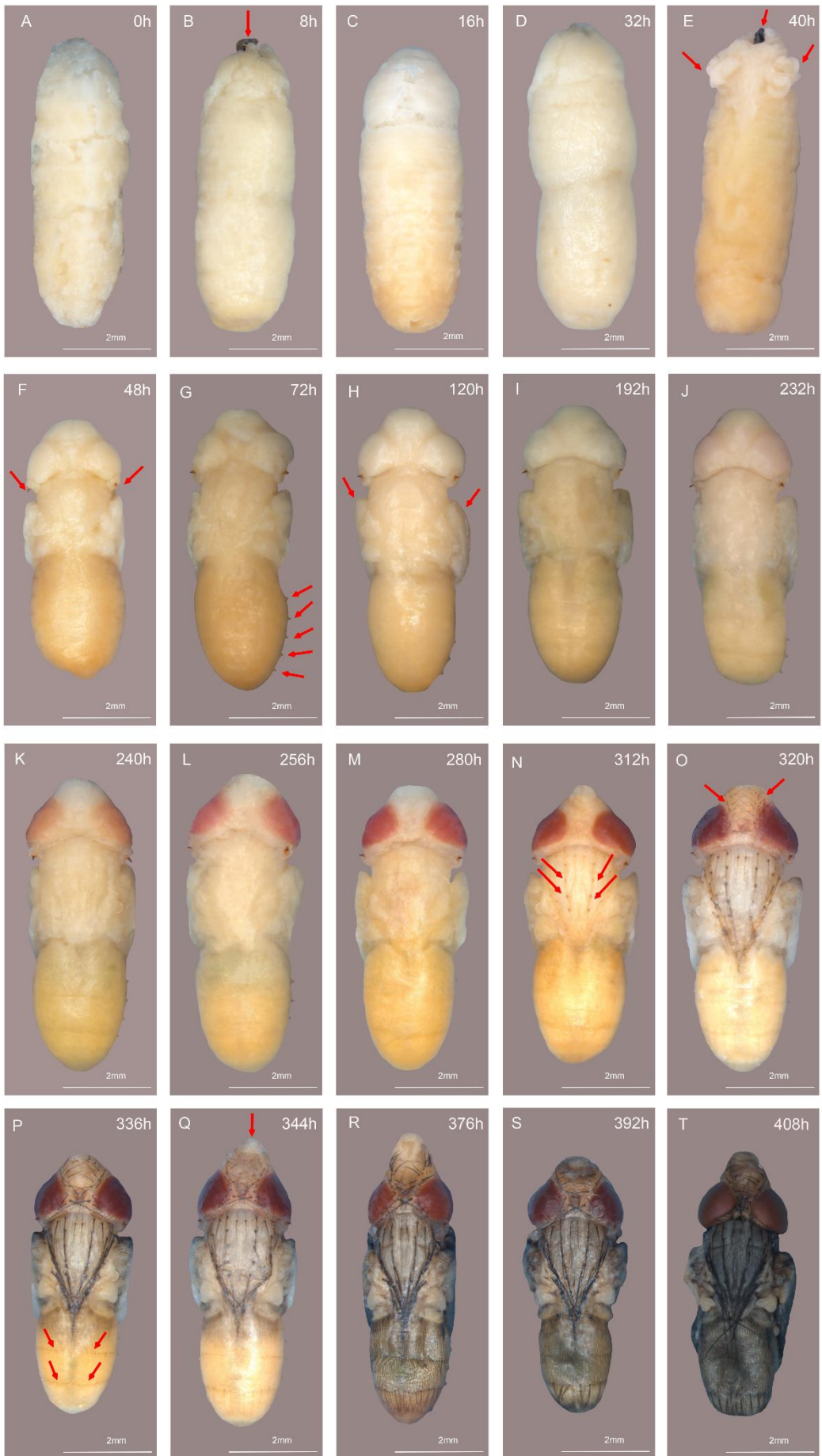


Figura 1. Vista dorsal do desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* à 20°C. (A) pupa de 0h esbranquiçada e de aspecto gelatinoso; (B) pupa de 8h, indicando o gancho oral; (C) pupa de 16h, parecendo muito com o pupário; (D) pupa de 32h, nenhuma distinção de segmentação corporal; (E) pupa de 40h, mostrando o gancho oral bem evidente, onde será formado o aparelho bucal, mostrando o início do desenvolvimento dos olhos; (F) pupa de 48h, com distinção de cabeça, tórax e abdômen, indicando os espiráculos respiratórios; (G) pupa de 72h, indicando a emergência dos espiráculos abdominais; (H) pupa de 120h, mostrando as asas desenvolvidas e bem maiores; (I) pupa de 192h, início da segmentação abdominal; (J) pupa de 232h, início da coloração dos olhos; (K) pupa de 240h, olhos de coloração amarela; (L) pupa de 256h, olhos de coloração avermelhada; (M) pupa de 280h, olhos de coloração vermelha; (N) pupa de 312h, mostrando o surgimento das cerdas torácicas; (O) pupa de 320h, indicando o surgimento de cerdas na frente; (P) pupa de 336h, setas mostrando o surgimento de cerdas no abdômen; (Q) pupa de 344h, mostrando a formação da projeção na frente; (R) pupa de 376h, projeção na frente bem evidente; (S) pupa de 392h, projeção na frente diminui pela metade; (T) pupa de 408h, imago.

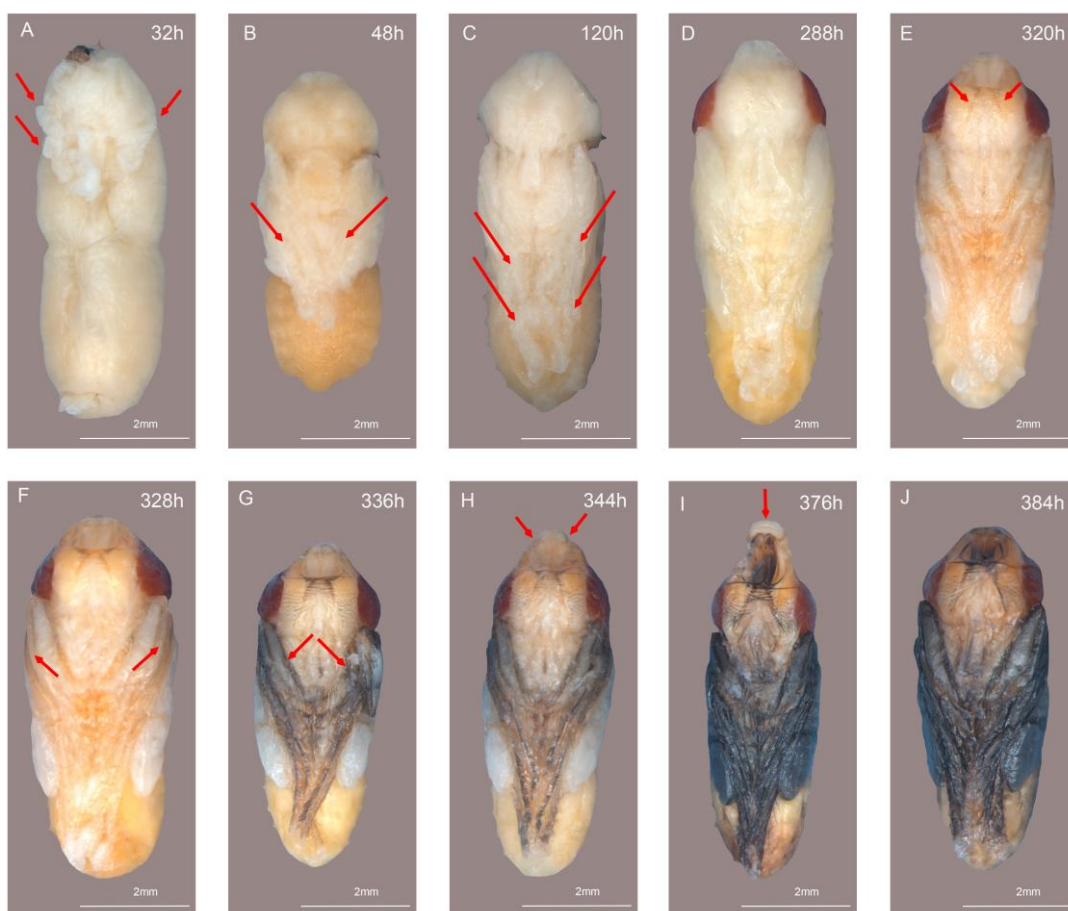


Figura 2. Vista ventral do desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* à 20°C. (A) pupa de 32h mostrando o início da emergência dos apêndices torácicos; (B) pupa de 48h, indicando a emergência dos apêndices torácicos; (C) pupa de 120h com as pernas com início de segmentação; (D) pupa de 288h com a indicação de pernas com coloração esbranquiçada; (E) pupa de 320h com indicação das cerdas na região do aparelho bucal; (F) pupa de 328h com a segmentação das pernas bem evidente e com mudança de coloração; (G) pupa de 336h demonstrando a coloração mais escura das pernas; (H) pupa de 344h indicando o alongamento do pedicelo, formando a projeção na frente; (I) pupa de 376h com as pernas bem desenvolvidas e

com coloração preta e a projeção na frente onde se localiza o pedicelo juntamente com a antena totalmente formada; (J) pupa de 384h em que a projeção na frente diminui de tamanho.

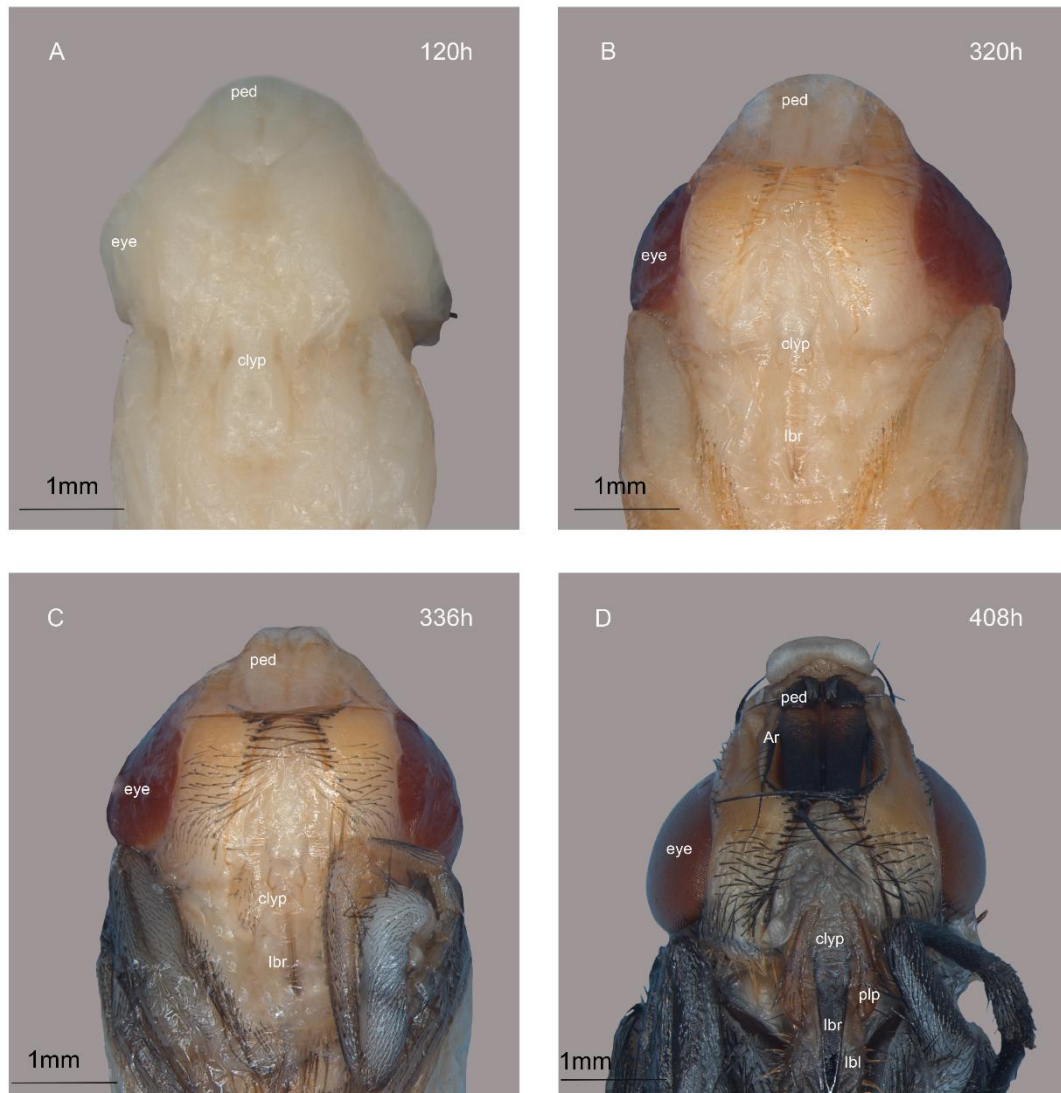


Figura 3. Desenvolvimento da cabeça em vista ventral de *Sarconesia chlorogaster* à 20°C. (A) pupa de 120h, desenvolvimento do pedicelo e clipeo; (B) pupa de 320h, desenvolvimento do labrum; (C) pupa de 336h, peças bucais mais evidentes; (D) pupa de 408h, aparelho bucal formado. Abreviaturas: clyp-clípeo, ped-pedicelo, lbr-labrum, lbl-labella, plp-palpus, Ar-arista.

3.2 Efeito da temperatura no desenvolvimento intrapuparial

O desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* durou em média 416 horas à 20°C e 326 horas à 25°C. A temperatura influenciou diretamente o tempo de desenvolvimento, de tal maneira que a velocidade em que ocorreram as mudanças morfológicas, aumentou conforme o aumento da temperatura. Portanto, houve diferenças na idade em que as fases de puparização ocorreram entre as duas temperaturas (Tabela 1). Existe, com exceção das fases de apólise larva-pupa, muito mais variação nos eventos que definem cada fase a 20°C do que a 25°C, como pode ser visto pelos maiores desvios associados com a média do tempo de aparecimento das estruturas morfológicas a 20°C (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo médio de duração (média \pm desvio padrão), valores máximos e mínimos (range) de cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* (Wied.) em duas temperaturas, 20 e 25°C.

Fases	20°C		25°C	
	Tempo (horas)	Range	Tempo (horas)	Range
Pupariação		0h	0h	
Apólise larva-pupa	11,73 \pm 3,99	8-16h	8h	9,45 \pm 4,59
Pupa criptocefálica	24,94 \pm 10,93	24-32h	16-24h	20,8 \pm 5,87
Pupa fanerocefálica	75,27 \pm 33,91	40-112h	32-88h	61,09 \pm 18,61
Apólise adulto-pupa	142,02 \pm 43,71	120-224h	96-104h	81,06 \pm 24,50
Adulto farado	162,04 \pm 66,82	232-416h	112-326h	153,6 \pm 57,70
Emergência		416h	326h	

Existem alterações morfológicas que ocorrem em cada fase de desenvolvimento que podem ser consideradas chaves para determinado período e, que, portanto, podem ser utilizadas em um contexto forense para a estimativa do intervalo pós-morte (Tabela 2). Das 45 características descritas morfolologicamente, 15 (Tabela 2) são potencialmente informativas para estimar a idade de *S. chlorogaster*. De maneira geral, o formato do corpo (presença ou ausência de tagmatização), a coloração geral, a presença visível do gancho do cefaloesqueleto (porção da mandíbula) podem ser usados com indicadores morfológicos de pupas até 24 horas (25°C) ou 40 horas (20°C) (Tabela 1 e 2). Os apêndices torácicos são outro grupo de marcadores que evidenciam mudanças que ocorrem, em geral, entre o 2º e o 5º dia, com exceção nas mudanças morfológicas nas pernas, que ocorrem até o terço final do processo de metamorfose. A mudança na coloração dos olhos é um marcador bastante sincrônico nos indivíduos, ocorrendo após o quarto dia de desenvolvimento e durando até o sexto dia a 25°C e entre o 10º e o 13º dia a 20°C. A formação das cerdas é o marcador que pode ser usado para determinar a idade das pupas entre aproximadamente 6 e 10 dias (25°C) e entre 13 e 15 dias (20°C). As alterações morfológicas na fronte fornecem os marcadores que indicam as idades próximas a emergência.

Tabela 2. Características chaves no desenvolvimento intrapuparial potencialmente informativas para estimar a idade de *Sarconesia chlorogaster* nas temperaturas constantes de 20 e 25°C.

Marcadores morfológicos da pupa	20°C	25°C
Pupa bem esbranquiçada, pupário muito difícil de ser removido, ainda se parece muito com uma larva	0h	0h
Pupa esbranquiçada e é possível ver na região antero-ventral a projeção em forma de gancho da ponta da mandíbula (mouth-hook) de coloração preta	8-16h	8h
Cabeça evaginada, distinta do resto do corpo e pupa de coloração branca	40h	24h
Emergência dos espiráculos respiratórios na lateral da cabeça, início da emergência dos apêndices torácicos e espiráculos abdominais laterais presentes	48-72h	32-40h
Apêndices torácicos bem desenvolvidos e olhos bem destacados transparentes	72h	40-48h
Início do desenvolvimento das peças bucais, início da segmentação nas pernas, asas bem desenvolvidas e início do desenvolvimento da antena	120h	96h
Início da segmentação abdominal	192h	96-104h
Início da coloração dos olhos	232h	112h
Olhos amarelos	240h	120h
Olhos de coloração avermelhada	256h	128h
Olhos de coloração bem vermelha e pernas bem esbranquiçadas, sem coloração evidente	280-288h	136-144h
Olhos marrons e início das cerdas torácicas	312h	152h
Surgimento de cerdas na frente, surgimento de cerdas na região do aparelho bucal, segmentação das pernas bem evidentes e mudança de coloração	320-328h	160-176h
Cerdas na frente e no tórax bem evidentes, cerdas minúsculas surgem no abdômen, pernas mais escuras, pedicelo vai se alongando, formando uma projeção na frente, pernas bem desenvolvidas de coloração preta.	336-376h	184-240h
A projeção na frente vai se compactando, diminuindo seu tamanho e a cor da pupa escurece	384-392h	248-320h

4 DISCUSSÃO

A entomologia forense é, na maioria dos casos, baseada na determinação da idade dos insetos que são encontrados no corpo, sendo fundamental que essa determinação tenha confiabilidade para que seja aplicada para estimar o intervalo pós-morte mínimo (IPM_{min}). O estágio que tem a maior duração temporal nos estudos de desenvolvimento é o estágio de pupa (Thyssen et al., 2014, Lecheta et al., 2015). Contrastando com a possibilidade de aplicação deste estágio de desenvolvimento poucos estudos detalham o desenvolvimento intrapuparial. Das 20 espécies de importância forense dentro da família Calliphoridae que ocorrem no Sul do Brasil (Carvalho & Ribeiro, 2000), apenas nove espécies têm descrições das mudanças intrapupariais. E, das 22 espécies de Sarcophagidae que ocorrem no Sul do Brasil (Vairo et al., 2011), apenas duas espécies tem o desenvolvimento intrapuparial detalhado. Nesse sentido, a descrição detalhada de mudanças morfológicas intrapupariais pela análise de 960 pupas de *Sarconesia chlorogaster*, forneceu, no mínimo, 15 caracteres morfológicos chaves associados com estrutura geral do corpo, apêndices torácicos e cabeça, que podem ser usados como indicadores do tempo de desenvolvimento intrapuparial (sensu Martin-Vega et al., 2016).

As observações realizadas com a remoção do pupário permitiram que fossem identificadas seis fases dentro do desenvolvimento intrapuparial em *S. chlorogaster*. Embora a descrição dessas fases por observações morfológicas tenham sido criticadas (Martin-Vega et al., 2016) pela necessidade de se analisar cortes histológicos (Fraenkel & Bhaskaran, 1973) ou tomografias computadorizadas (Richards et al., 2012), as fase de desenvolvimento identificadas correspondem ao padrão geral encontrada em vários trabalhos (Cepada-Palacios et al., 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro et al., 2012; Barros-Cordeiro et al., 2014; Proença et al., 2014; Barros-Cordeiro et al., 2016). A primeira fase de pupariação se inicia no momento em que a larva se enterra no substrato e diminui a mobilidade (Fraenkel, 1973, Barros-Cordeiro et al., 2016). No entanto, para *S. chlorogaster*, o processo de se enterrar ocorre por mais de 24 horas (obs. pessoal) e a primeira fase só se inicia quando a larva encerra completamente sua mobilidade.

Ma et al. (2015) examinando as pupa de *Chrysomya rufifacies* e Barros-Cordeiro et al., 2016 examinando as pupas de *Cochliomyia macellaria* (Fabricius, 1775) e *Lucilia cuprina* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Calliphoridae) encontraram resultados semelhantes ao nossos em relação aos caracteres morfológicos durante o

desenvolvimento intrapuparial. Porém, os trabalhos são feitos em temperaturas diferentes das usadas para *S. chlorogaster*, Barros-Cordeiro et al., 2016 exploraram o desenvolvimento em duas temperaturas para *L. cuprina* (23 e 30°C) e apenas uma (23°C) para *C. macellaria*. Já Ma et al. (2015) exploraram o desenvolvimento de *C. macellaria* em quatro diferentes temperaturas (20, 24, 28 e 32°C). Isso implica, como detectamos em *S. chlorogaster*, que o efeito de temperaturas não extremas é sobre o tempo de desenvolvimento, sem modificar o padrão morfológico.

O desenvolvimento intrapuparial de *S. chlorogaster* durou em média 416 horas à 20°C e 326 horas à 25°C. Lecheta et al. (2015) estudando o efeito da temperatura no desenvolvimento dessa mesma espécie teve como resultado que o desenvolvimento da pupa em 20°C foi, em média, de 410 horas e a 25°C foi, em média de 303 horas, valores semelhantes ao que encontramos, se considerarmos a variabilidade (desvio padrão) que é de aproximadamente 52,61 horas a 25°C e 13,97 horas a 20°C. Embora as fases de desenvolvimento identificadas sejam as mesmas, o tempo de desenvolvimento intrapuparial de *S. chlorogaster* (326 horas a 25°C) é mais longo do que a maioria dos outros Calliphoridae. Por exemplo, Karabey & Sert (2014) analisando o desenvolvimento das pupas de *L. sericata* à 25°C, determinaram que o desenvolvimento intrapuparial levou 175 horas. Já, o desenvolvimento intrapuparial mais curto é o de *C. rufifacies*, com aproximadamente 168 horas (Ma et al., 2015). No entanto, Defilippo et al. (2013) observaram o desenvolvimento de pupas de *Calliphora vicina* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae) à 25°C, determinando um tempo de desenvolvimento intrapuparial de 360 horas, maior do que de *S. chlorogaster*. Essas variações indicam a necessidade de se estudar detalhadamente cada espécie com aplicação forense para se obter uma estimativa mais refinada possível da idade da pupa.

A principal questão associada com a definição da fase de desenvolvimento intrapuparial por marcadores externos macroscópicos é de que qualquer erro na delimitação temporal da fase de desenvolvimento poderia levar a erros na estimativa do IPM_{\min} (Martin-Vega et al., 2016). No entanto, as fases de desenvolvimento intrapuparial são delimitação acessórias para a entomologia forense, como são as fases de decomposição de um corpo em estudos de sucessão (Bornemissza, 1956; Andrade et al., 2005). Assim, com descrições detalhadas em períodos de tempo curto, como para *S. chlorogaster* nesse estudo, a definição do IPM será feita diretamente com base nas

características morfológicas observadas e não baseado na fase de desenvolvimento intrapuparial, diminuindo muito a incerteza associada.

Com relação aos caracteres que são potencialmente informativos para entomologia forense, poucos estudos (e.g. Karabey & Sert, 2014; Ma et al., 2015) usam a forma geral do corpo como indicador de idade, que para *S. chlorogaster* é uma característica morfológica que pode ser usada até 40 horas como marcador. Já, os apêndices torácicos e da cabeça são marcadores morfológicos muito mais utilizados (Cepada-Palacios et al., 2000; Richards et al., 2012; Karabey & Sert, 2014; Proença et al., 2014; Ma et al., 2015). Na estrutura da cabeça, a alteração da cor dos olhos é o marcador morfológico mais comum, sendo utilizado em todos os grupos para definir limites de tempo tanto diretamente quanto para a delimitação das fases (Barros-Cordeiro et al., 2014; Cepada-Palacios et al., 2000; Pujol-Luz & Barros-Cordeiro, 2012; Defilippo et al., 2013; Karabey & Sert, 2014; Proença et al., 2014; Ma et al., 2015; Barros-Cordeiro et al., 2016). Já o desenvolvimento detalhado do aparelho bucal é muito pouco utilizada (Barros-Cordeiro et al., 2012; Barros-Cordeiro et al., 2014), e segundo os nossos resultados, as peças bucais podem ser utilizadas como ferramentas para identificação de três fases do desenvolvimento intrapuparial de *S. chlorogaster*. Já, as características relacionadas aos apêndices torácicos mais utilizadas nos estudos intrapupariais são a emergência das asas, desenvolvimento e segmentação das pernas (Richards et al., 2012; Karabey & Sert, 2014). As características marcantes no abdômen são sua segmentação, mudança na coloração e o desenvolvimento dos espiráculos (Cepada-Palacios et al., 2000; Karabey & Sert, 2014). Todas essas características nos tagmas foram observadas em nosso trabalho, indicando sua generalidade como marcadores.

5. CONCLUSÃO

O presente trabalho forneceu 45 características chaves no desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster*, uma espécie de grande importância forense por ser endêmica da região Sul e já ter sido usado para determinação do intervalo pós-morte.

Com estes resultados, é possível estimar o intervalo pós-morte de um corpo, utilizando características morfológicas intrapupariais. Embora as fases de decomposição identificadas sejam as mesmas que a maioria dos estudos, o tempo que cada característica morfológica levou para se desenvolver foi descrito com a maior precisão possível, com base no desenvolvimento pupal em 20 e 25°C.

A descrição detalhada, derivada de uma técnica de análise morfológica de rotina, tende a permitir que peritos, assistente técnicos ou entomólogos forenses, possam aplicar essas informações em casos nos quais existem indícios entomológicos disponíveis, aumentando o grau de confiabilidade das estimativas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amendt, J. et al. 2004. Forensic entomology. **Naturwissenschaften** **91**:51-65.
- Ames, C.; Turner, B.; Daniel, B. 2006. Estimating the post-mortem interval (II): the use of differential temporal gene expression to determine the age of blowfly pupae. **Int Congr Ser.** **1288**:861–3.
- Anderson, S.J. 2000. Increasing calcium levels in cultured insects. **Zoo Biology** **19** (1): 1-9.
- Anderson, A.R.; Hoffmann, A.A.; McKechnie, S.W.; Umina, P.A.; Weeks, A.R. 2005. The latitudinal cline in the In (3R)Payne inversion polymorphism has shifted in the last 20 years in Australian *Drosophila melanogaster* populations. **Mol Ecol** **14**:851–58.
- Andrade, H.T.A.; Varela-Freire, A.A.; Batista, M.J.A.; Medeiros, J.F. 2005. Calliphoridae (Diptera) coletados em cadáveres humanos no Rio Grande do Norte. **Neotropical Entomology** **34**(5):855-856.
- Barros-Cordeiro, K.B.; Pujol-Luz, J.R.; Name, K.P.O.; Bão, S.N. 2016. Intra- puparial development of the *Cochliomyia macellaria* and *Lucilia cuprina* (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia** **110**:1-7
- Barros-Cordeiro, K.B.; Bão, S.N.; Pujol-Luz, J.R. 2014. Intra-puparial development of the black soldier-fly, *Hermetia illucens*. **Journal Insect Science** **14**: 1–10.
- Bonato, S.R. 1996. Ciclo de vida de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae). **Revista Brasileira Zoologia** **13** (3): 707-726.
- Bonato, S.R.; Carvalho, C.J.B. 1996. Análise morfológica das formas imaturas de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae, Toxotarsinae). **Revista Brasileira Zoologia** **13** (3): 707-726.
- Bornemissza, G.F. 1957. An analysis of arthropod succession in carrion and the effect of its decomposition on the soil fauna. **Austr. J. Zool.** **5**: 1-12.
- Brown, K.; Thorne, A.; Harvey, M. 2015. *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) pupae: a timeline of external morphological development and a new age and PMI estimation tool. **International Journal Legal Medicine** **129**: 835-850.
- Brown, K.; Thorne, A.; Harvey, M. 2012. Preservation of *Calliphora Vicina* (Diptera: Calliphoridae) pupae for use in post-mortem interval estimation. **Forensic Science International** **223**:176-183.
- Campobasso, C.P.; Introna, F. 2001. The forensic entomologist in the context of the forensic pathologist's role. **Forensic Science International** **120**:132–139.

Catts, E.P. 1992. Problems in estimating the postmortem interval in death investigations. **Journal of Agricultural Entomology** **9**(4):245-255.

Catts, E.P.; Goff, M.L. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of entomology** **37**:253–72.

Carvalho, L.M.L.; Linhares, A.X. 2001. Seasonality of insects succession and pig carcass decomposition in a natural forest área in Southeastern Brazil. **Journal of Forensic Science** **46**: 604-608

Carvalho, C.J.B.; Ribeiro, P.B. 2000. Chave de identificação das espécies de Calliphoridae (Diptera) do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria** **9**:169–73.

Cepeda-Palacios, R.; Scholl, P.J. 2000. Intra-puparial development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae). **Journal Medicine Entomology** **37**: 239–245.

Costa, C.; Ide, S.S.; Simonka, C.E. 2006. Insetos Imaturos: metamorfose e identificação. Ribeirão Preto: Holos, Editora. 249p.

Denlinger, D.L.; Zdárek, J. 1994. Metamorphosis behavior of flies. **Annual Review of Entomology** **39**: 243–266.

Dekeirsschieter, J.; Verheggen, F.J.; Gohy, M.; Hubrecht, F.; Bourguignon, L. 2009. Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig carcasses (*Sus domesticus* L.) in different biotopes. **Forensic Science International** **189**:46-53.

Defilippo, F.; Bonilauri, P.; Dottori, M. 2013. Effect of temperature on six different developmental landmarks within the pupal stage of the forensically important blowfly *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). **Journal Forensic Science** **58**: 1554–1557.

Erzinclioglu, Y.Z. 1985. Immature stages of British *Calliphora* and *Cynomya* with a re-evaluation of the taxonomic characters of larval Calliphoridae (Diptera). **Journal of Natural History** **19**:69–96.

Estrada, D.A.; Grella, M.D.; Thyssen, P.J.; Linhares, A.X. 2009. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya abiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. **Neotropical Entomology****38**:203–7.

Fraenkel, G.; Bhaskaran, G. 1973. Pupariation and pupation in cycloraphousflies (Diptera): terminology and interpretation. **Annals of the Entomological Society of America** **66**:418–422.

Gennard, D. 2012. **Forensic entomology: an introduction**. 2 ed. Oxford: John Willey & Sons Ltd. 272 p.

Greenberg, B.; Kunich, J.C. 2002. **Entomology and the law**. University Press, Cambridge.

- Greenberg, B. 1971. **Flies and disease**. 2 ed. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Goff, M.L.; Flynn, M.M. 1991. Determination of postmortem interval by arthropod succession: a case study from the Hawaiian islands. **Journal Forensic Science** **36**:607–614.
- Hall, D.G. 1948. Blowflies of North America. Lafayette, IN: **The Thomas Say Foundation**. Disponivel em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19491000065>.
- Hinton, H.E. 1946. Concealed phases in the metamorphosis of insects. **Nature****157**: 552-553.
- Hall, R.D.; Townsend, L.H. Jr. 1977. The blow flies of Virginia (Diptera: Calliphoridae). In: **Insect of Virginia**. Cap. 11. Polytechnic Institute and State University Research Division Bulletin.
- Karabey, T.; Sert, O. 2014. The analysis of pupal development period in *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) forensically important insect. **International Journal Legal Medicine**. Doi: 10.1007/s00414-014-0968-2.
- Kruger, R.F.; Kirst, F.D.; Souza, A.S.B. 2010. Rate of development of forensically-important Diptera in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** **54**:624–9.
- Lecheta, M.C.; Thyssen, P.J.; Moura, M.O. 2015. The effect of temperature on development of *Sarconesia chlorogaster*, a blowfly of forensic importance. **Forensic Science Medicine Pathology** **11**:58-543.
- Linhares, A. 2007. **Entomologia forense – você sabe o que é isso?** Disponível em: <http://www.fatimahborges.com.br/artigo.php?code=83>. Acesso em 24 jan. 2017.
- Lopes, H.S.; Albuquerque, D.O. 1982. Notes on Neotropical Calliphoridae (Diptera). **Revista Brasileira Biologia** **42** (1): 63-69.
- Ma, T.; Huang, J.; Wang, J.F. 2015. Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) for post-mortem interval estimation. **Forensic Science International** **253**: 88–93.
- Mann, R.W.; Bass, W.M.; Meadows, L. 1990. Time since death and decomposition of the human body: variables and observations in case and experimental field studies. **Journal of Forensic Sciences** **35**:103-11.
- Martín-Vega, D.; Hall, M.J.R.; Simonsen, T.J. 2016. Resolving confusion in the use of concepts and terminology in intrapuparial development studies of Cyclorrhaphous Diptera. **Journal of Medicina Entomology**. Doi: 10.1093/jme/tjw081.
- Mello, R.P. 1972. Contribuição ao estudo do gênero *Sarconesia* Bigot, 1857 (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira Biologia** **32** (4): 533-537.

Michaud, J.P.; Kenneth, G.; Schoenly, K.M.L.; Moreau, G. 2012. Sampling Flies or Sampling Flaws? Experimental Design and Inference Strength in Forensic Entomology. **Entomological Society of America** **49**: 1.

Moura, M.O.; Carvalho, C.J.B.; Monteiro-Filho, E.L.A. 1997. A Preliminary analysis of insects of medical-legal importance in Curitiba, State of Paraná. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **92**:269–74.

Oliveira-Costa, J. 2011. **Entomologia Forense:Quando os insetos são vestígios**. Millennium 3 ed. São Paulo.

Oliveira, M.S.; Mello, R.P.; Queiroz, M.M.C. 2007. Morfologia e duração dos instares larvais de *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae) em laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia** **51**(2): 239-245.

Pinheiro, D.S.; Reis, A.A.S.; Jesuino, R.S.A.; Silva, H.M.V. 2012. Variáveis na Estimativa do Intervalo Pós- Morte por Métodos de Entomologia Forense. **Enciclopédia Biosfera** v.8, n.14, p.1442.

Proença, B.; Ribeiro, A.C.; Luz, R.T.; Aguiar, V.M.; Maia, V.C.; Couri, M.S. 2014. Intrapuparial development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae). **Journal Medicine Entomology** **51**: 908–914.

Pujol-Luz, J.R.; Barros-Cordeiro, K.B. 2012. Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia** **56**: 269–272.

Queiroz, M.M.C.; Mello, R.P.; Lima, M.M. 1997. Morphological aspects of the larval instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) reared in the laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **92**: 187–196.

Queiroz, S.M.P.; Almeida, J.R.; Carvalho, C.J.B.; Dudas, L. 1985. Bionomia de *Sarconesia chlorogaster* (Wiedemann, 1830) em Curitiba, Paraná, Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil** **14** (1): 105-110.

Richards, C.S.; Simonsen, T.J.; Abel, R.L.; Hall, M.J.R.; Schwyn, D.A.; Wicklein, M. 2012. Virtual forensic entomology: improving estimates of minimum post-mortem interval with 3D micro-computed tomography. **Forensic Science International** **220**: 251–264.

Smith, K.G.V. 1986. **A Manual of Forensic Entomology**. British, Museum Natural History, London.

Schoenly, K.M.L.; Goff, J. D.; Wells, Lord W.D. 1992. Quantifying statistical uncertainty in succession-based entomological estimates of the postmortem interval in death scene investigations: A simulation study. **American Entomologist** **42**(2):106–12.

Tarone, A.M.; Jennings, K.C.; Foran, D.R. 2007. Aging blow fly eggs using gene expression: a feasibility study. **Journal Forensic Science** **52**(6):1350–4.

Tomberlin, J.L.; Mohr, R.; Benbow, M.E.; Tarone, A.M.; Van Laerhoven, S. 2011. A Roadmap for Bridging Basic and Applied Research in Forensic Entomology. **Annual Reviews Entomology** **56**:401-21.

Thyssen, P.J.; Souza, C.M.; Shimamoto, P.M.; Salewski, T.B.; Moretti, T.C. 2014. Rates of development of immatures of three species of *Chrysomia* (Diptera: Calliphoridae) reared in different types of animal tissues: implications of estimating the postmortem interval. **Parasitology Research** **113**:3373-3380.

Vairo, K.P.; Corrêa, R.C.; Lecheta, M.C.; Caneparo, M.F.; Mise, K.M.; Preti, D.; Carvalho, C.J.B.; Almeida, L.M.; Moura, M.O. 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.

Vairo, K.P.; Mello-Patiu, C.A.; Carvalho, C.J.B. 2011. Pictorial identification key for species of Sarcophagidae (Diptera) of potential forensic importance in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia** **55**(3):333-347.

Von Hoermann, C.; Ruther, J.; Reibe, S.; Madea, B.; Ayasse, M. 2011. The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle *Dermestes maculatus* (De Geer). **Forensic Science International** **212**: 173-179.

Voss, S.C.; Cook, D.F.; Dadour, I.R. 2011. Decomposition and insect succession of clothed and unclothed carcasses in Western Australia. **Forensic Science International** **211**: 67-75.

Wells, J.D.; Lecheta, M.C.; Moura, M.O.; LaMotte, L.R. 2015. An evaluation of sampling methods used to produce insect growth models for postmortem interval estimation. **International Journal Legal Medicine** **129**:405-10.

Wells, J.D.; LaMotte, L.R. 2010. **Estimating the postmortem interval**. In: J.H. Byrd and J.L. Castner (eds), *Forensic entomology: the utility of arthropods in Legal investigations*, 2nd ed., CRC, Boca Raton, FL. P.368-281.

Zehner, R.; Amendt, J.; Boehme, P. 2009. Gene expression analysis as a tool for age estimation of blowfly pupae. **Forensic Science International** **2**(1):292-3.