



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Entomologia Médica

**Desenvolvimento Intrapuparial de *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830)
(Diptera, Muscidae), sob condições de laboratório.**

Marina Lopes Duarte

Dr.^a Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Rio de Janeiro
2018

Marina Lopes Duarte

Desenvolvimento Intrapuparial de *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Muscidae), sob condições de laboratório.

Monografia submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Entomologia Médica, Curso de Especialização em Entomologia Médica, pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Data: ___/___/___

Assinatura do Aluno

Margarita M. de C. Queiroz

Assinatura do Orientador

Assinatura do 2º Orientador (opcional)

Lopes Duarte, Marina.

Desenvolvimento Intrapuparial de *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Muscidae), sob condições de laboratório. / Marina Lopes Duarte. - Rio de Janeiro, 2018.

43 f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2018.

Orientadora: Margareth Maria de Carvalho Queiroz.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Entomologia Forense. 2. Pupa. 3. Morfologia. I. Título.

Dedico às pessoas que amo,
aos insetos que me fascinam
e aos cientistas que me inspiram.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, e em especial meus pais, Mario Duarte e Marcia Lopes, pelo apoio e amor dado e incentivado ao longo deste caminho que curso, além da inspiração, para continuar nesta área que tanto admiro;

À minha irmã Marcela, meu cunhado Guilherme e meu sobrinho Natan que cederam um cantinho de sua casa e coração para que eu pudesse me hospedar enquanto realizava a especialização e os experimentos, sempre com muito carinho e cuidado;

Ao meu irmão Maurício, pelo interesse e apoio, que mesmo estando longe, sei que é com sentimento de orgulho e carinho;

Ao meu noivo João Matheus, por todo o apoio e incentivo, que mesmo com muita preocupação, sempre me ajuda na medida do possível, sendo com ideias para a metodologia, me incentivando, e acalmando e me dando todo o amor e carinho possível para que eu possa permanecer percorrendo meus objetivos;

À Elisabete, sogra da minha irmã, por também ceder um pouquinho de seu lar, companhia e amizade e me ajudar na construção deste caminho.

Agradeço imensamente e de todo o coração à minha orientadora Dr^a. Margareth Queiroz por me acolher e confiar em mim e em meu trabalho, por toda a ajuda ao longo da elaboração deste estudo, seja com críticas ou elogios, que sei que vem sempre para o melhor e para meu crescimento, tanto profissional quanto pessoal;

Às minhas amigas da especialização Fernanda, Laura e Ana Beatriz, por todas as conversas, almoços, “desesperos” em épocas de provas e seminários, mas também pelas risadas ao longo desta jornada que foi a especialização para todas nós;

A todos os meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica e Forense/FIOCRUZ pelo apoio e ajuda ao longo do projeto, conversas e ideias compartilhadas, risadas e brincadeiras;

A todos os professores e professoras do curso, e em especial aos coordenadores Anthony Guimarães e Rubens Mello, sempre muito pacientes e atenciosos com seus alunos e compreensivos às peculiaridades de cada um;

Aos membros da banca, Dr. Rubens Mello; Dr^a Paloma Mendonça e Dr. Rodrigo Barbosa, pela ajuda ao longo deste projeto, ideias, apoio, revisão e leitura deste estudo;

E por fim, mas não menos importante, aos insetos, por todo esse mistério que me causam grande admiração e curiosidade.

“Inteligência é a capacidade de se adaptar à mudança.”

Stephen Hawking

RESUMO

Ophyra aenescens (Wiedemann, 1830) (Diptera: Muscidae) apresenta importância médica-sanitária e forense, com diversos estudos voltados para a biologia, porém sem trabalhos analisando o desenvolvimento intrapuparial. Em dípteros muscoides, o estágio de pupa representa cerca de 50% de período total de desenvolvimento do imaturo, fazendo com que estudos analisando o desenvolvimento morfológico da pupa tornem-se importantes para a compreensão da metamorfose do inseto, além de auxiliar em estudos na área forense, funcionando como uma ferramenta para a estimativa do Intervalo Pós-Morte Mínimo (IPM_{mín}). Portanto, este estudo teve como objetivo identificar e descrever as mudanças morfológicas temporais no desenvolvimento desta espécie sob a temperatura constante de 27 °C. Para isso, foi acompanhado o desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* sob a temperatura de 27 ± 1 °C, UR 60 ± 10 % e 12 horas de fotofase. As pupas foram mortas e fixadas a cada 3 horas, até completar 24h após a pupariação, e posteriormente a cada 6 horas, até a emergência do adulto. Foram analisadas 340 pupas, com a emergência ocorrendo em 174 h. A morfologia externa foi descrita e registrada, definindo com bases nas características morfológicas, oito fases de desenvolvimento intrapuparial: pupariação, pré-pupa; apólise larva-pupa; pupa criptocefálica; pupa fanerocefálica; apólise pupa-adulto; adulto farado e imago. Foram descritos 25 caracteres morfológicos-chaves para a identificação das fases e do intervalo de tempo, dentre elas, estruturas como os apêndices torácicos (pernas e asas), estruturas da cabeça como antena, olhos, triângulo ocelar e peças bucais, e a presença de cerdas. Sendo assim, torna-se possível utilizar tais caracteres morfológicos para auxiliar no cálculo da estimativa do intervalo pós-morte de um corpo, porém, mais estudos voltados para espécies de Muscidae demonstram-se necessários para que aumente o grau de confiabilidade do método, em comparação com outras espécies com biologia semelhante à apresentada neste estudo.

Palavras-chave: Entomologia Forense; Pupa; Morfologia.

ABSTRACT

Ophyra aenescens (Wiedemann, 1830) (Diptera: Muscidae) presents medical-sanitary and forensic importance, with studies focused on its biology, but without studies analyzing its intrapuparial development. In the muscoid dipterans, the pupal stage represents about 50 % of its total immature development period, making studies analyzing the pupal morphological development important for the understanding of insect metamorphosis, helping in studies in the forensic area, functioning as a tool for estimating the Minimum Post-mortem Interval (IPM_{min}) by observing its morphological characteristics and developmental phases. Therefore, this study aims to identify and describe temporal morphological changes in the development of this species under a constant temperature of 27 °C. For this, the intrapuparial development of *Ophyra aenescens* under temperatures of 27 ± 1 °C, RH 60 ± 10 % and 12 hours of photophase was monitored, with pupae, from the time of pupariation, killed and fixed every 3 hours, up to 24 hours, and thereafter every 6 hours, until adult emergence. A total of 340 pupae were analyzed, with emergence occurring in 174 h. The external morphology was described and recorded, defining, based on the morphological characteristics, eight stages of intrapuparial development: pupariation, pre-pupae; larva-pupae apolysis; cryptocephalic pupae; phanerocephalic pupae; pupal-adult apolysis; pharate adult and adult. Were described 25 key morphological characters for the identification of phases and time intervals, such as thoracic appendages (legs and wings), head structures such as antenna, eyes, ocellar triangle and mouthparts, and the presence of bristles. Thus, it becomes possible to use such morphological characters to aid in the calculation of the estimate of the Post-mortem Interval of a body, however, more studies aimed at Muscidae species are necessary to increase the reliability of the method, in comparison with other species with similar biology to that presented in this study.

Keywords: Forensic Entomology; Pupa; Morphology.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores mínimos e máximos (intervalo de variação) e tempo médio da duração (em horas) de cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* à 27 °C, em condições de laboratório.....**24**

Tabela 2. Características chave no desenvolvimento de *Ophyra aenescens* potencialmente informativas para estimar a idade da espécie (em horas) sob a temperatura constante de 27 ± 1 °C, em condições de laboratório.....**26**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Armadilha do tipo Shannon, instalada no campus da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), para coleta de *Ophyra aenescens* (Diptera: Muscidae); Peixe em estado de putrefação, protegido por uma grade para impedir que outros animais se alimentem e carreguem a isca; Coleta ativa no interior da armadilha com o tubo Falcon.....**20**
- Figura 2:** Gaiola de criação de *Ophyra aenescens*; Estante climatizada à temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e 12 horas de fotoperíodo.....**21**
- Figura 3:** Pote de criação das larvas de *Ophyra aenescens* até o momento de pupariação, contendo carne em estado de putrefação para a dieta e vermiculita para as larvas errantes realizarem a pupariação.....**21**
- Figura 4:** Contagem das larvas de *Ophyra aenescens* e separação das mesmas em grupos de 100 indivíduos para observação dos momentos de pupariação na vermiculita.....**22**
- Figura 5:** Larva errante L3 de *Ophyra aenescens* no momento de pupariação (0 hora), com a cabeça retraída e perda de movimento; Tubos de ensaio com os pupários em seus respectivos intervalos de horas na solução fixadora de Carnoy e no Ácido Fórmico 5 %.....**23**
- Figura 6:** Vista dorsal do desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* à 27°C**29**
- Figura 7:** Vista ventral do desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* à 27°C**31**
- Figura 8:** Desenvolvimento da cabeça em vista dorsal e ventral de *Ophyra aenescens* à 27°C**33**

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	12
2) OBJETIVOS	19
2.1) Objetivo Geral	19
2.2) Objetivos Específicos	19
3) METODOLOGIA.....	20
3.1) Coleta de espécimes e estabelecimento de colônia de <i>Ophyra aenescens</i>	20
3.2) Obtenção das pupas e análise do desenvolvimento intrapuparial	22
4) RESULTADOS	24
5) DISCUSSÃO	34
6) CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1) INTRODUÇÃO

Dípteros muscoides, conhecidos popularmente como moscas, são atraídos para regiões domiciliares por conta do lixo e resíduos de matéria em decomposição vegetal ou animal, com algumas espécies apresentando comportamento sinantrópico. Desta forma, muitas espécies possuem hábitos saprófagos, coprófagos e necrófagos, enquanto que outras podem ser ainda hematófagas e nectívoras, apresentando assim, importância em diversas áreas de estudo, como econômica, ecológica, médica-sanitária, veterinária, agropecuária e forense. Dentre os insetos que participam mais frequentemente na decomposição da matéria orgânica, os mais encontrados em carniça animal e cadáveres humanos são representantes das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae (SMITH, 1986).

A Entomologia Forense, por definição, é a ciência que aplica o estudo dos insetos a procedimentos legais, podendo ser aplicada em áreas como de produtos estocados, tratando da contaminação destes produtos pelos insetos; área urbana, incluindo ações cíveis envolvendo a presença de insetos em imóveis, danificando-os; e finalmente a área médico-legal, que envolve principalmente a área criminal com relação à morte violenta (OLIVEIRA-COSTA, 2011). Há ainda as áreas da Entomotoxicologia, que analisa os efeitos de medicamentos, drogas ou venenos no desenvolvimento dos insetos (PACINI et al., 2015), e a área Ambiental, que utiliza os insetos bioindicadores ambientais ou que possuam alguma interação ecológica específica que auxiliem em investigações de casos de crimes ambientais (BOTTEON, 2016).

Portanto, a Entomologia Forense é uma ferramenta que pode auxiliar em investigações criminais, utilizando os insetos e outros artrópodes associados através da estimativa da idade dos imaturos ou pela análise da diversidade de insetos que visitam o corpo e com o período de visitação (AMENDT, 2011). Tal ferramenta pode ajudar também em casos de negligência nos cuidados de crianças e idosos (BENECKE e LESSIG, 2001) e na possibilidade de locomoção do corpo de uma cena de um crime (BENECKE, 2001). Na medicina legal, a estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) é realizada através da análise dos fenômenos cadavéricos que diferem em função de diversos fatores de influência, como a temperatura e a umidade (CROCE e CROCE JUNIOR, 1998).

Para a estimativa do tempo de decomposição ou do tempo em que o corpo permaneceu exposto após morto, podem ser realizadas metodologias através do tempo de desenvolvimento dos imaturos, que ocorre quando as fêmeas ovipositam no cadáver, com as larvas se alimentando e se desenvolvendo diretamente sobre o corpo, podendo assim ser úteis para a estimativa do cálculo do Intervalo Pós-Morte mínimo (IPM_{\min}), que estima o tempo máximo e mínimo entre o momento da morte e a descoberta do cadáver (CATTS, 1992); ou através do padrão de sucessão dos insetos, que procura avaliar quais espécimes de moscas adultas são atraídas para um corpo em decomposição e em quais períodos ocorre essa atração para alimentação, reprodução e maturação dos ovos, através da correlação dos insetos encontrados com as fases de decomposição ou através da análise de associação, com o método de unidades de tempo (OLIVEIRA-COSTA, 2011).

O IPM_{\min} , como citado anteriormente, é dado através da estimativa da idade de um inseto associado a um corpo em decomposição. O tempo de desenvolvimento das larvas mostra o mínimo de tempo em que o corpo foi exposto para a atividade de insetos (SMITH, 1986). Este IPM_{\min} é utilizado para estimativa de tempo nos estágios iniciais de decomposição, sendo a idade do inseto a base para as estimativas do IPM_{\min} , baseando-se em fatores como o estágio larvar mais velho encontrado, que corresponde às primeiras posturas, indicando o tempo mínimo de exposição do cadáver, além de, preferencialmente, serem utilizados exemplares da primeira geração dos insetos (que se criaram no corpo), já que sua idade indicará o limite mínimo do IPM (OLIVERIA-COSTA, 2011).

Um dos métodos mais utilizados para a estimativa do IPM_{\min} é através do modelo linear denominado Grau-Dia Acumulado (GDA) que relaciona os dados da evolução do desenvolvimento de espécies criadas em condições de laboratório com as condições ambientais (temperatura) que uma mesma espécie estaria exposta no cadáver (OLIVERIA-COSTA, 2011). O primeiro autor a aplicar este conceito para a estimativa do IPM foi GREENBERG (1991), na qual o autor publicou diversos artigos e casos utilizando a linha do tempo para a estimativa do Intervalo Pós-Morte calculado com base neste conceito para determinar quando foi realizada a postura de ovos no cadáver (OLIVEIRA-COSTA, 2011).

A estimativa do IPM_{\min} pode ser realizada também baseando-se na quantidade de aberturas espiraculares das larvas de cada espécie (QUEIROZ et al., 1997),

associada com o tempo de decomposição do corpo, considerando a variação temporal no desenvolvimento das larvas influenciado por fatores abióticos como temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo (CATTS e GOFF, 1992). Na área médica-legal, os Muscidae ainda podem ser utilizados para avaliar diversos aspectos do crime como forma e causa da morte e associação de suspeitos na cena do crime (CATTS e GOFF, 1992).

Portanto, é necessário o conhecimento do ciclo de vida dos insetos e como eles podem ser influenciados por fatores externos para que os adultos e imaturos das moscas sejam utilizados na área forense. Como citado anteriormente, as larvas são muito utilizadas para o cálculo do IPM_{\min} , mas o estágio de pupa; que em dípteros muscoides representa cerca de 50% do tempo de desenvolvimento do imaturo (MARTÍN-VEGA et al., 2016) ainda é pouco utilizado neste campo de estudo. Porém, atualmente é possível encontrar cada vez mais estudos voltados para a área forense utilizando as pupas, onde se analisa suas fases de desenvolvimento e idade estimada através da observação do surgimento e desenvolvimento de estruturas morfológicas ao longo do corpo, principalmente com as famílias Calliphoridae (DEFILIPPO et al., 2013; KARABEY e SERT, 2014; PROENÇA et al., 2014; MA et al., 2015; RAMOS-PASTRANA et al., 2017; FLISSAK e MOURA, 2018) e Sarcophagidae (CUNHA, 2014; SINHA e MAHATO, 2016), que possuem grande importância na área forense, como forma de complementar e auxiliar na estimativa do IPM_{\min} .

Cabe ressaltar que para a mesma área de estudo, apenas o trabalho de FRAENKEL e BHASKARAN (1973) analisa o desenvolvimento intrapuparial de uma espécie de Muscidae, *Musca domestica* Linnaeus, 1758, onde os autores observam as fases de desenvolvimento da espécie, sem se aprofundarem nas definições das características morfológicas, indicando a necessidade de mais estudos de representantes desta família que também apresenta interesse forense.

A família Muscidae apresenta cerca de 4.500 espécies descritas, com ocorrência em quase todas as regiões biogeográficas, exceto na Antártica. Na região Neotropical são reconhecidas 843 espécies (CARVALHO et al., 2005), enquanto que a América do Sul apresenta 708 espécies e 80 gêneros (CARVALHO, 2002). Os adultos desta família são reconhecidos através da presença da caliptra, ausência da série vertical de cerdas no mero, fêmeas com menos de sete pares de espiráculos no abdômen (a maioria dos

gêneros possuem apenas seis pares) e machos sem o par de glândulas acessórias do sistema reprodutor (COURI e CARVALHO, 2005).

A inervação das asas também é importante para a identificação da família, que apresenta a asa com a veia subcostal atingindo a costal quase em ângulo reto, e a veia A1+CuA2 e A2 com diferentes formatos (CARVALHO et al., 2002). Nas larvas, os ganchos orais fundidos (ou muito próximos) é uma característica que ajuda a definir esta família (CARVALHO e COURI, 2002).

Espécies desta família podem ser predadoras, hematófagas, saprófagas ou necrófagas, com as larvas ocupando diferentes habitats, dentre eles esterco de animais, matéria orgânica vegetal e animal em estado de decomposição, como madeira e carne putrefata (COURI e CARVALHO, 2005). Por conta deste hábito, apresentam importância ecológica, com as larvas coprófagas e saprófagas contribuindo na reciclagem destes compostos (COURI e CARVALHO, 2005), enquanto que algumas larvas carnívoras e predadoras de *Ophyra* sp. podem se alimentar de larvas de outras espécies, como no caso de *M. domestica* (NOLAN e KISSAM, 1985; AXTELL, 1986), auxiliando no controle biológico desta espécie.

A associação com o homem e os animais domésticos também influencia em sua importância na área da saúde como veterinária e médica-sanitária, já que muitas espécies de muscídeos atuam como vetores mecânicos de agentes causadores de doenças, através da própria superfície do corpo, pelas pernas, probóscide e cerdas, ou através das regurgitações que as moscas realizam para se alimentar, ou ainda pela defecação diretamente nos alimentos ou no próprio indivíduo (NIHEI e DOMINGUEZ, 2008), transmitindo assim patógenos como vírus, bactérias, protozoários, nematódeos, entre outros (GREENBERG, 1971). Algumas espécies de muscídeos também são conhecidas por causarem miíases obrigatórias ou facultativas (GREENBERG, 1971; GUIMARÃES e PAPAVERO, 1999).

Já na área forense, esta família possui grande importância por ser encontrada em cadáveres em decomposição, estando bem adaptadas a diferentes condições, como em cenas de crime em locais abertos ou fechados, com alta ou baixa luminosidade (ambientes cobertos, por exemplo), locais úmidos e secos, tanto no início quanto no final do estágio de decomposição (GRZYWACZ, 2017).

Segundo SKIDMORE (1985), as espécies pertencentes à subfamília Azeliinae apresentam hábitos carnívoros facultativos e obrigatórios, além de saprófagos, tendo as fezes como principal substrato para desenvolvimento dos imaturos. A subfamília Azeliinae é a que apresenta maior número de gêneros dentre as subfamílias de Muscidae, e dentre eles encontra-se o gênero *Ophyra* Robineau-Desvoidy, 1830. De acordo com CARVALHO e COURI (2002), existem oito espécies deste gênero na região Neotropical, com quatro destas encontradas no Brasil: *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830); *Ophyra albuquerquei* Lopes, 1985; *Ophyra chalcogaster* Wiedemann, 1824 e *Ophyra solitaria* Albuquerque, 1958 (COURI e CARVALHO, 2005).

Ophyra aenescens é uma espécie sinantrópica originária das Américas e pode ser encontrada atualmente em diversas regiões do planeta, tendo sido introduzida na Europa na década de 1960 (HOGSETTE e WASHINGTON, 1995). Está associada ao ambiente urbano, assim como o silvestre, com maior abundância nas estações quentes (RIBEIRO et al., 2000), sendo encontrada em substratos atrativos como peixes em estado de putrefação, para a alimentação e postura de ovos pelas fêmeas (d'ALMEIDA, 1997), além de crustáceos, fígado bovino e carcaça de roedores (d'ALMEIDA, 1988).

NOLAN e KISSAM (1985) e AXTELL (1986) relatam que as larvas de *O. aenescens* no segundo e terceiro instar apresentam comportamento predatório de larvas de *M. domestica*, podendo ser utilizadas no controle biológico. Em estudos na área forense é possível encontrar as larvas nos exsudatos corporais, associado ao conteúdo exposto do intestino (BYRD e CASTNER, 2001), além da carne em estado avançado de putrefação.

OLIVEIRA-COSTA et al. (2014) ao analisar diferentes padrões de sucessão de dípteros muscoides de importância forense em duas carcaças de porco (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758), com um porco carbonizado, e outro controle, sem ser carbonizado, avaliou que *O. aenescens* foi encontrada em abundância em ambos os modelos utilizados no estudo (controle - N: 379; carbonizado - N: 338), durante praticamente todo o estágio de decomposição, enquanto que apenas as larvas desta espécie foram encontradas colonizando as carcaças nos dois experimentos, o que indica a grande importância de *O. aenescens* em estudos na área forense.

Além da área forense, a espécie também possui interesse na área veterinária, médica-sanitária e econômica por conta de sua capacidade de transmitir agentes patológicos e/ou parasitas, como por exemplo, a capacidade de *O. aenescens* de transportar ovos de *Dermatobia hominis*, causador da “berne”, que além de ocasionar grande incômodo ao seu hospedeiro, pode causar grandes danos na indústria de gado, sendo o principal ectoparasita a afetar este setor no Brasil (RODRÍGUEZ, 1999).

Para a família Muscidae, trabalhos analisando o desenvolvimento intrapuparial ainda são poucos, com apenas um estudo, de FRAENKEL e BHASKARAN (1973), na qual os autores analisaram as fases de desenvolvimento intrapuparial de três espécies de moscas de três famílias diferentes (dentre elas, *M. domestica*) através de cortes histológicos, sob a temperatura constante de 30 °C, identificando assim as fases do desenvolvimento da pupa, além de auxiliarem também nas terminologias referentes ao desenvolvimento intrapuparial. Outros autores como CEPEDA-PALACIOS e SCHOLL (2000), BARROS-CORDEIRO et al. (2014), MARTÍN-VEGA et al. (2016) e FLISSAK e MOURA (2018) auxiliaram também nestas definições e revisões.

MARTÍN-VEGA et al. (2016) analisaram e revisaram a terminologia utilizada nos recentes estudos sobre o desenvolvimento intrapuparial de dípteros ciclorrafos, definindo assim dois processos: o de **pupariação**, que é quando a larva errante abandona o substrato para realizar a formação do pupário (estrutura esclerotizada externa em formato de barril) e o de **pupação**, fase onde ocorrem as mudanças morfológicas que transformarão a larva em adulto.

Na pupação, ocorrem seis fases antes da total formação da pupa e emergência do imago do pupário, como as fases de **pré-pupa**, que ocorre entre o início da pupariação e o primeiro evento de apólise, com a pré-pupa ainda ligada à cutícula larval e semelhante à larva L3. A **apólise larva-pupa** ocorre logo em seguida, com a formação da epiderme da pupa e a separação da mesma do pupário, o que não é perceptível a olho nu através da metodologia de dissecação, porém após esta apólise, a dissecação e retirada da pupa do pupário é facilitada e ocorre com poucos danos à estrutura do espécime, facilitando na identificação desta fase do desenvolvimento. Ressalta-se que logo após este evento, a pré-pupa pode finalmente ser denominada como “pupa”.

Posteriormente, ocorre a formação da **pupa criptocefálica**, na qual ainda não é possível observar a distinção dos tagmas do corpo, porém as pernas e asas começam a se formar e encontram-se parcialmente expostas. Na fase seguinte, de **pupa fanerocefálica**, os apêndices torácicos como pernas e asas estão maiores e mais desenvolvidos, enquanto que ocorre a formação dos tagmas e sua melhor distinção entre cabeça, tórax e abdômen.

A **apólise pupa-adulto** ocorre com a separação das células epiteliais adultas do pupário, que assim como a apólise larva-pupa, citada anteriormente, é de difícil observação a olho nu, podendo assim ser identificada apenas através de metodologias mais específicas como a utilizada por FRAENKEL e BHASKARAN (1973), de corte histológico ou de tomografias virtuais micro-computadorizadas, como utilizada e citada por MARTÍN-VEGA et al. (2016).

Portanto, para este estudo que utiliza uma metodologia mais simples de dissecação do pupário e observação morfológica, o momento de apólise pupa-adulto foi definido através da identificação do início da formação de estruturas morfológicas específicas, como as antenas e peças bucais, também utilizados como fator de delimitação para esta fase por FLISSAK e MOURA (2018).

Finalmente, ocorre a formação do **adulto farado**, após a apólise pupa-adulto, que corresponde a maturação das estruturas morfológicas do adulto, até o momento de emergência do adulto (ou **imago**) do pupário.

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo Geral

- Identificar e descrever morfológicamente as etapas de desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens*, sob temperatura de 27 ± 1 °C com umidade relativa de 60 ± 10 % e 12 h de fotofase.

2.2) Objetivos Específicos

- Identificar as fases de desenvolvimento intrapuparial denominadas: (1) pupariação; (2) pré-pupa; (3) apólise larva-pupa; (4) pupa criptocefálica; (5) pupa fanerocefálica; (6) apólise pupa-adulto; (7) adulto farado e (8) imago de *O. aenescens* sob a temperatura de 27 ± 1 °C, 60 ± 10 % UR e 12 h de fotofase.
- Descrever as principais características morfológicas ocorridas ao longo das fases de desenvolvimento intrapuparial da pupa sob a temperatura de 27 ± 1 °C, 60 ± 10 % UR e 12 h de fotofase para auxiliar na estimativa da idade da pupa de *O. aenescens*.

3) METODOLOGIA

3.1) Coleta de espécimes e estabelecimento de colônia de *Ophyra aenescens*

A coleta foi realizada no campus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), em Manguinhos, Rio de Janeiro, ativamente, através de tubos Falcon no interior da armadilha do tipo Shannon, com isca atrativa à base de peixe em estado de putrefação. Por ser clara, a armadilha permite a passagem de luz e estimula o fototropismo das moscas, atraindo-as para a região superior, facilitando a coleta.



Figura 1: Armadilha do tipo Shannon, instalada no campus da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), para coleta de *Ophyra aenescens* (Diptera: Muscidae); Peixe em estado de putrefação, protegido por uma grade para impedir que outros animais se alimentem e carreguem a isca; Coleta ativa no interior da armadilha com o tubo Falcon.

Os insetos foram levados ao Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF), onde foram identificados através de chave dicotômica específica para a espécie (CARVALHO et al., 2002), enquanto que a criação em laboratório seguiu a metodologia estabelecida por QUEIROZ e MILWALD-DE-AZEVEDO (1991).

Depois de identificadas e confirmadas as espécies, os adultos foram mantidos em gaiolas de madeira (30 x 30 x 30 cm) revestidas com tecido de náilon tipo

“escaline” e acondicionados em estantes ventiladas na temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e 12 h de fotofase para criação. A dieta para os adultos consistiu de uma solução de 50 % de sacarose, enquanto que para estimular a oviposição dos adultos e alimentação das larvas foi oferecida carne moída bovina putrefata.



Figura 2: Gaiola de criação de *Ophyra aenescens*; Estante climatizada à temperatura de 27 ± 1 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e 12 horas de fotoperíodo.

Após a oviposição, as larvas referentes à geração parental (das moscas selvagens, coletadas no campus) foram transferidas para recipientes plásticos (5 x 7 cm) com aproximadamente 1 g/larva de carne moída bovina putrefata, como substrato de alimentação. Em seguida, tais recipientes foram acondicionados em recipientes maiores (10 x 10 cm) contendo vermiculita, para o momento de pupação e pupariação das larvas errantes (ou maduras).



Figura 3: Pote de criação das larvas de *Ophyra aenescens* até o momento de pupariação, contendo carne em estado de putrefação para a dieta e vermiculita para as larvas errantes realizarem a pupariação.

3.2) Obtenção das pupas e análise do desenvolvimento intrapuparial

Os espécimes de *Ophyra aenescens* foram criados durante todos os estágios a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e 12 h de fotofase na estante ventilada. As larvas errantes, ao abandonarem o substrato e irem para a vermiculita foram separadas em grupos de 100, em quatro recipientes (totalizando 400 larvas) para a observação da fase de pupariação, momento em que a larva L3 (ou errante) interrompe sua movimentação, retrai o esqueleto cefalofaríngeo e inicia o endurecimento da cutícula do pupário, com um formato semelhante ao de barril, que muda de cor posteriormente, escurecendo a medida que a pupa se desenvolve dentro do pupário formado, sendo este um processo irreversível (BARROS-CORDEIRO et al., 2014; MARTÍN-VEGA et al., 2016).

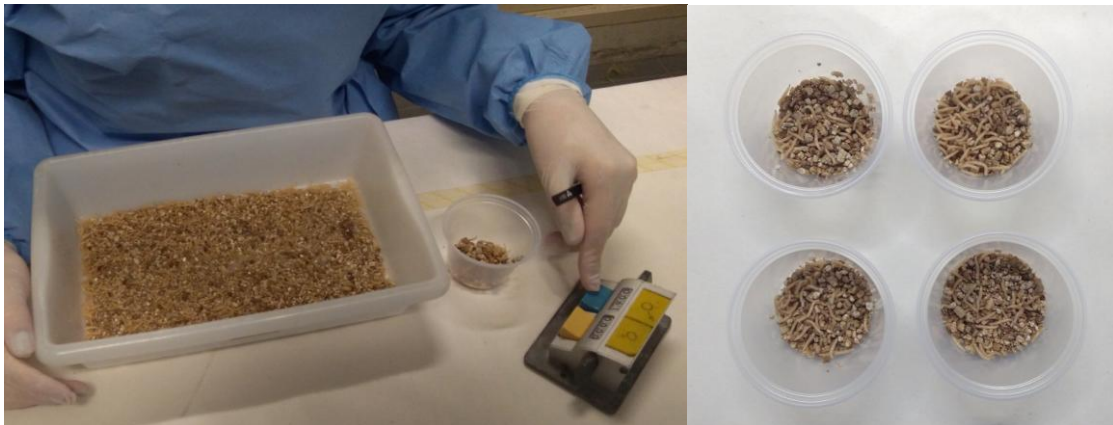


Figura 4: Contagem das larvas de *Ophyra aenescens* e separação das mesmas em grupos de 100 indivíduos para observação dos momentos de pupariação na vermiculita.

Os pupários foram separados em grupos de dez espécimes por intervalo de horas, desde o momento da pupariação (0 hora) a cada 3 horas, até completar 24 horas, e posteriormente a cada 6 horas, até o momento da emergência do primeiro espécime. Os espécimes foram mortos em água quente ($70 \pm 5^\circ\text{C}$) e em seguida fixados em solução fixadora de Carnoy por 48 horas. Após este período, foram submetidos ao ácido fórmico 5 %, também por 48 horas, e posteriormente congelados, até o momento da dissecação, que ocorreu com o auxílio de instrumentos entomológicos como pinças, alfinetes e estiletos.

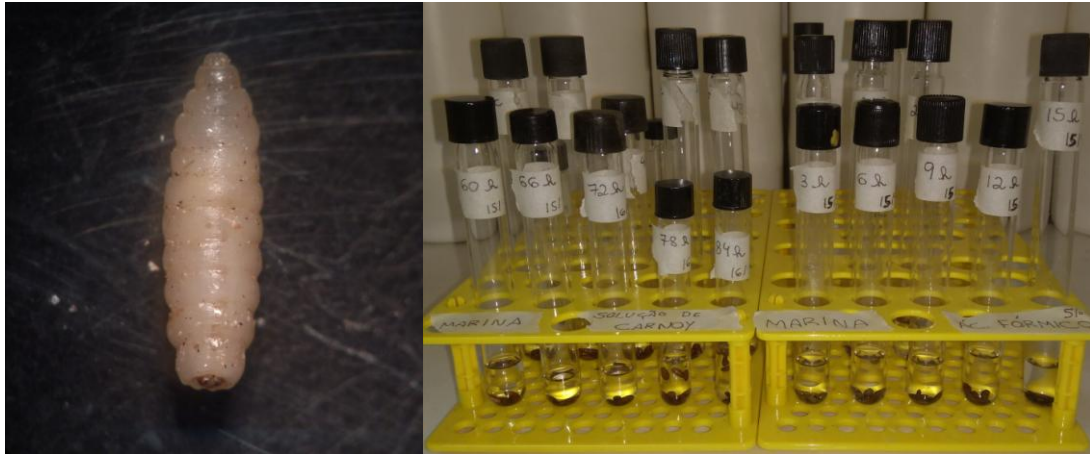


Figura 5: Larva errante L3 de *Ophyra aenescens* no momento de pupariação (0 hora), com a cabeça retraída e perda de movimento; Tubos de ensaio com os pupários em seus respectivos intervalos de horas na solução fixadora de Carnoy e no Ácido Fórmico 5 %.

As pupas foram observadas em microscópio estereoscópio (lupa) no laboratório, para o reconhecimento e descrição das fases do desenvolvimento intrapuparial e das características morfológicas que surgiam, seguindo as definições de BARROS-CORDEIRO et al., 2014, CUNHA, 2014, MARTÍN-VEGA et al., 2016 e FLISSAK e MOURA, 2018. Posteriormente, foram fotografadas em microscópio estereoscópio da marca e modelo Leica M2015 C, e as fotos editadas no programa Adobe Photoshop CS5, para registro e análise dos dados, que foi realizada com o cálculo da média e desvio padrão no programa Excell (Microsoft Office).

4) RESULTADOS

A morfologia externa de *Ophyra aenescens* a 27 °C foi observada e fotografada, com a emergência do adulto ocorrendo às 174 horas, com um total de 340 pupas observadas.

Tabela 1: Valores mínimos e máximos (intervalo de variação) e tempo médio da duração (em horas) de cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* à 27 °C, em condições de laboratório.

Fases	Intervalo de Variação (h)	Tempo (h) X ± DP
Pupariação	0	-
Pré-pupa	3 - 9	6 ± 2,49
Apólise larva-pupa	12	12 ± 0
Pupa Criptocefálica	15 - 24	19,58 ± 3,40
Pupa Fanerocefálica	30 - 108	61,35 ± 23,87
Apólise pupa-adulto	78 - 96	87,69 ± 9,34
Adulto Farado	114 - 174	143,75 ± 18,04
Adulto (Emergência)	174	-

média ± desvio padrão: X ± DP.

Dentre as fases identificadas para *O. aenescens*, as que se apresentam mais confiáveis para a definição da idade da pupa e posterior auxílio no cálculo do IPM_{\min} para a área forense são as fases de Pré-Pupa e Pupa Criptocefálica, que apesar de, respectivamente, apresentarem nenhuma ou poucas estruturas (início do surgimento das pernas e asas, sem detalhes), possui um intervalo de tempo curto no total (6 e 9 horas, respectivamente), aumentando desta forma a confiabilidade do cálculo.

A fase de Adulto Farado, apesar de apresentar mais tempo de desenvolvimento (60 horas) em comparação com as duas citadas anteriormente, possui diversas mudanças morfológicas de forma mais detalhada, com o início da pigmentação das estruturas; o surgimento das cerdas; delimitação e definição de apêndices; dentre outras características, que auxiliam em uma estimativa de idade mais precisa, fazendo com que as fases de Pré-Pupa, Pupa Criptocefálica e Adulto Farado sejam as mais confiáveis para auxiliar na estimativa do IPM_{\min} ao calcular a idade das pupas, tanto através do curto período, mesmo que com poucas modificações morfológicas, presentes em Pré-Pupa e Pupa Criptocefálica, ou em muitas mudanças morfológicas ocorrendo de forma

detalhada, apesar de ocorrer em um período de tempo maior, como apresenta o Adulto Farado.

As fases de Apólise larva-pupa e Apólise pupa-adulto são estimadas através da metodologia trabalhada e apresentam pouco tempo de desenvolvimento. Para que dados mais confiáveis sejam utilizados através das fases de apólise, já que estas são de difícil estimativa através da observação em lupa, recomenda-se o uso, se possível, de ferramentas complementares específicas, como a tomografia micro-computadorizada, ou até mesmo análises através de cortes histológicos, a fim de observar a apólise de forma mais detalhada para aumentar a acurácia da estimativa da idade com relação a estes eventos.

A fase de Pupa Fanerocefálica não demonstra-se muito confiável para a estimativa da idade e portanto, para o cálculo do IPM_{\min} em estudos da área forense pois esta apresenta poucas ou nenhuma mudança morfológica deste o seu momento inicial até o final, ao longo do seu período de desenvolvimento, o que pode dificultar o perito na definição de um intervalo de hora confiável para a estimativa, já que esta fase apresenta o maior tempo de desenvolvimento em comparação às outras, com 78 horas no total.

Na tabela 2, podemos observar os 25 marcadores morfológicos chaves (principais caracteres morfológicos) dentro de 12 intervalos de horas, que podem auxiliar na estimativa da idade da pupa.

Já com relação à identificação morfológica da espécie ainda como pupa, esta se torna possível apenas nos horários finais de desenvolvimento do Adulto Farado, pois estruturas chaves para a identificação do inseto já estão mais definidas, pigmentadas e visíveis, como por exemplo, o palpo maxilar amarelado, que se torna pigmentado a partir de 138 horas de desenvolvimento intrapuparial.

Tabela 2. Características chave no desenvolvimento de *Ophyra aenescens* potencialmente informativas para estimar a idade da espécie (em horas) sob a temperatura constante de 27 ± 1 °C, em condições de laboratório.

Marcadores morfológicos da pupa	Hora
Pupa bem esbranquiçada, muito parecida com larva e de difícil remoção do pupário.	0
Emergência dos apêndices torácicos (pernas), sífões respiratórios ainda claros, no topo da cabeça.	18
Apêndices torácicos mais evidentes (pernas e asas), sífões respiratórios escurecidos, no topo da cabeça.	24
Pupa de coloração branca, cabeça evaginada com os sífões respiratórios na lateral da cabeça.	30
Olhos bem delimitados, porém, ainda transparentes.	90
Inicia-se a coloração dos olhos, partindo do centro, em rosa claro; presença de cerdas na tibia.	108
Olhos completos e rosados. Tornam-se nítidas estruturas da antena (escapo, pedicelo e flagelo) e das peças bucais (palpos maxilares, labro, labela).	114
Formação dos poros e das cerdas pelo corpo. Início da inervação das asas.	120
Formação do triângulo ocelar, surgimento de cerdas nos lábios e na região fronto-clipeal. Veia costal mais escura que as demais.	132
Escurecimento total das pernas e das veias das asas. Surge a arista no flagelo. Palpos maxilares amarelos.	138
Aparelho bucal bem definido. Antena ganhando pigmentação. Garras do pós-tarso nítidas.	144
Antenas com suas manchas bem definidas. Mancha da região frontal definida.	150

As figuras 6, 7 e 8 apresentam e destacam as estruturas morfológicas encontradas em determinados intervalos de horas, auxiliando desta forma a identificar e/ou estimar a idade da pupa e suas fases de desenvolvimento, com suas descrições morfológicas detalhadas.

Abaixo seguem as descrições das diferentes fases de desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* e suas principais características morfológicas:

Pupariação (0h): No momento de pupariação o pupário encontra-se claro (esbranquiçado) e de difícil dissecação para a separação do mesmo do espécime a ser

estudado. A pré-pupa ainda não está formada, com o espécime ainda muito semelhante morfológicamente à larva L3 (Fig. 6A).

Pré-Pupa (3 - 9h): O espécime permanece com a morfologia semelhante da larva, sem grandes mudanças morfológicas, com o corpo preso à cutícula do pupário, o que dificulta a dissecação em especial na região posterior, próximo aos últimos segmentos do corpo.

Apólise Larva-Pupa (12h): Ocorre a formação das células epiteliais da pupa, influenciando no momento da dissecação e facilitando-a, já que ocorre a separação do corpo da pupa das células epiteliais do pupário.

Pupa Criptocefálica (15 - 24h): Ocorre a formação dos apêndices torácicos (pernas e asas), estando estes mais evidenciados e longos (Fig. 7A; 7B), além de observar-se o surgimento dos sífões respiratórios (Fig. 6B) no topo do corpo da pupa, inicialmente transparentes, escurecendo a partir de 24 horas (Fig. 6C).

Pupa Fanerocefálica (30 - 108h): Nesta fase ocorre a evaginação da cabeça em 30 horas (Fig. 6D; 7C), com a tagmatização do corpo (separado em cabeça, tórax e abdômen) bem definida. Os sífões respiratórios encontram-se latero-dorsalmente na base da cabeça (Fig. 6D), enquanto que estruturas como pernas e asas apresentam-se um pouco mais longas, mas ainda não definidas (Fig. 7C). Estruturas da cabeça como olhos, antenas e peças bucais ainda não estão bem formadas, iniciando seu surgimento na fase seguinte.

Apólise Pupa-Adulto (78 - 96h): Nesta fase ocorre a formação das células epiteliais do adulto, com a formação do mesmo quase completa, com estruturas da cabeça como os olhos, antenas e peças bucais começando a se formar e se definir (Fig. 6E), enquanto que os apêndices torácicos (completamente externalizados) encontram-se em processo de desenvolvimento, como o escurecimento das pernas (Fig. 7D).

Adulto farado (114 - 174h): O adulto já está formado, sendo necessário apenas o seu amadurecimento. Com 114 horas, os olhos encontram-se preenchidos em rosa claro e é possível observar as estruturas da antena (escapo, pedicelo e flagelo), assim como as das peças bucais, como os palpos maxilares, lábio e labro (Fig. 6G; 7F; 8A). Com 120 horas, as veias das asas apresentam tons amarelados (Fig. 7G), enquanto que ocorre a

formação das cerdas sensoriais no tórax (Fig. 6H). Em 132 horas, inicia-se a formação do triângulo ocelar (Fig. 6I; 8B), com os olhos compostos mais escuros, ocorrendo também o escurecimento da veia costal nas asas e das cerdas ao longo do corpo, com o surgimento destas na região fronte-clipeal e peças bucais (Fig. 6I; 7H; 8B). Em 138 horas, as pernas, inervações das asas e as antenas escurecem ainda mais, e ocorre o surgimento da arista no flagelo (Fig. 8C), enquanto que o palpo maxilar ganha a coloração amarelada, característica da espécie (Fig. 8C). Ainda neste horário inicia-se o escurecimento da frente, e a demarcação do triângulo ocelar. O escurecimento da frente (Fig. 6K; 8D) é delimitado em 144 horas, com o triângulo ocelar formado, enquanto que as antenas se tornam mais escuras e as garras do pós-tarso mais evidentes (Fig. 7J). A partir de 150 horas, as cerdas estão escuras, e as antenas e a mancha na região parietal com sua pigmentação bem definida, indicando a formação do adulto (Fig. 6L; 7K).

Imago (174h): Emergência do adulto, finalizando o desenvolvimento intrapuparial (Fig. 6L; 7L).

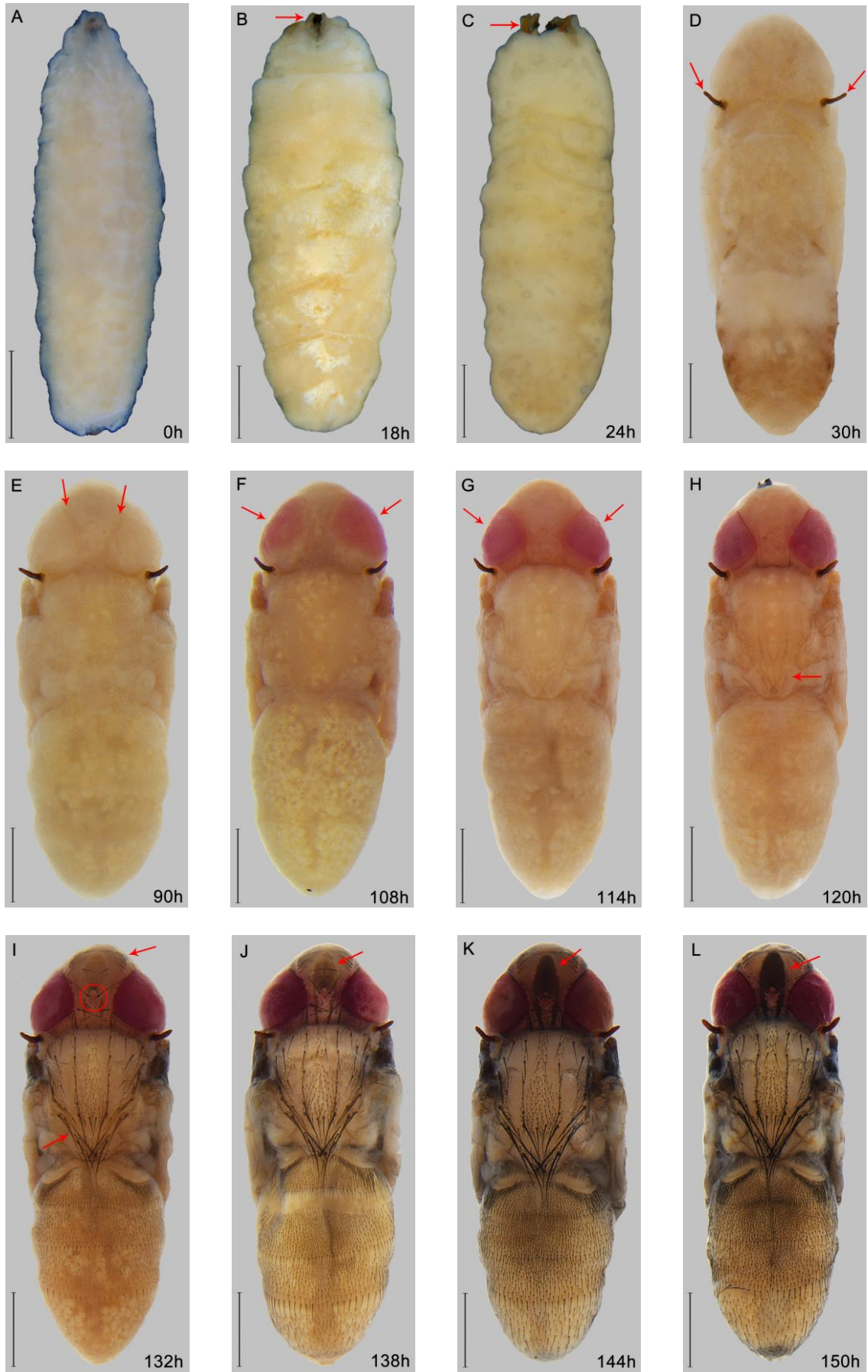


Figura 6: Vista dorsal do desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* à 27 °C. Escala de 1 mm. (A) pré-pupa de 0 h, esbranquiçada e semelhante à larva; (B) pupa de 18 h, com sifão respiratório transparente; (C) pupa de 24 h, com sifão respiratório escurecido; (D) pupa de 30h com cabeça evaginada e sifões respiratórios localizados latero-dorsalmente; (E) pupa de 90 h, evidenciando a delimitação dos olhos; (F) pupa de 108 h, apresentando a pigmentação dos olhos, a partir do centro, em tom rosado; (G) pupa de 114 h com os olhos delimitados e preenchidos pela coloração rosada; (H) pupa de 120 h, com o início do surgimento das cerdas no tórax; (I) pupa de 132 h, já apresentando cerdas ao longo do corpo, além da formação dos ocelos no triângulo ocelar (círculo); (J) pupa de 138 h, com mancha alongada característica da fêmea na região frontal da cabeça, além de maior presença de cerdas pelo corpo, principalmente no abdômen; (K) pupa de 144 h, com mancha da região frontal mais escura e definida; (L) pupa de 150 h, com o corpo formado, evidenciando a mancha frontal completamente formada.



Figura 7: Vista ventral do desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* à 27 °C. Escala de 1 mm. (A) pupa de 18 h, com as pernas em formação e longas; (B) pupa de 24 h, com as asas e pernas formadas e alongadas; (C) pupa de 30 h, com as pernas e asas formadas, esbranquiçadas; (D) pupa de 90 h, indicando o escurecimento das pernas, sem a presença de cerdas; (E) pupa de 108 h, com iniciação da delimitação das estruturas da antena, além da pigmentação dos olhos em tons rosados; (F) pupa de 114 h, com estruturas como antenas e peças bucais formadas, nas pernas é possível observar o início da formação de cerdas; (G) pupa de 120 h, pernas formadas e com presença de cerdas, veia costal da asa com coloração amarelada; (H) pupa de 132 h, com formação de cerdas na cabeça, principalmente nas peças bucais e região fronte-clipeal; (I) pupa de 138 h, antena ganhando coloração própria, com o surgimento da arista na mesma, enquanto que os palpos maxilares ganham a coloração amarelada característica da espécie; (J) pupa de 144 h com a coloração da antena mais escura e definida, além do escurecimento das pernas; (K) pupa de 150 h, apresentando o corpo formado; (L) pupa de 174 h, referente ao estágio de emergência do imago do pupário.

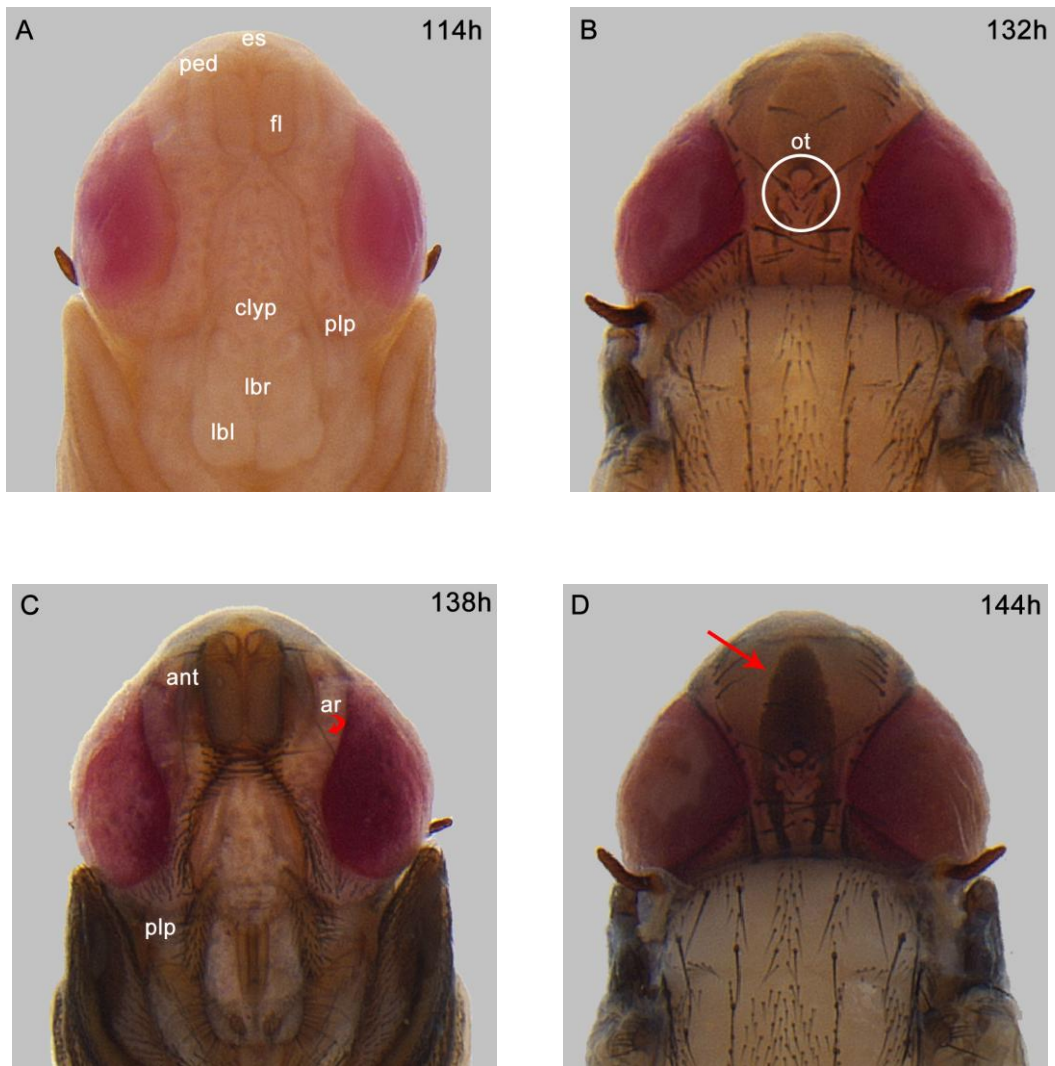


Figura 8: Desenvolvimento da cabeça em vista dorsal e ventral de *Ophyra aenescens* à 27 °C. (A) pupa de 114 h com as antenas e peças bucais desenvolvidas; (B) pupa de 132 h com o triângulo ocelar (ocelos transparentes); (C) pupa de 138 h com a presença da arista na antena, e peças bucais com cerdas; (D) pupa de 144 h com mancha da região frontal definida.

Abreviações: ot- triângulo ocelar; ant- antena; es- escapo; ped- pedicelo; fl- flagelo; clyp- clípeo; plp- palpo maxilar; lbr- labro; lbl- labela; ar- arista.

5) DISCUSSÃO

Na área da entomologia forense, o Intervalo Pós-Morte mínimo (IPM_{\min}) é calculado através do Grau-Dia Acumulado e utilizando os estágios de desenvolvimento das larvas encontradas no corpo, analisando se estas foram encontradas nos estágios L1, L2 ou L3, e através da identificação da espécie e do seu ciclo de vida, além da coleta de dados abióticos da região, é realizada uma estimativa de quanto tempo o corpo está em processo de decomposição, estimando assim o período em que foi morto.

Ainda não é muito comum a utilização do estágio pupal do inseto para o cálculo do IPM_{\min} , apesar desta fase representar aproximadamente 50 % do tempo total de desenvolvimento de imaturos de dípteros muscoides (MARTÍN-VEGA et al., 2016). Muitas vezes, ao encontrar um corpo, não é mais possível encontrar as larvas e nem os adultos, pois estas podem já ter abandonado o substrato para realizar a mudança de fase e/ou já terem realizado a oviposição ou larviposição, sendo desta forma, encontrados apenas os pupários em torno do cadáver contendo pupas em estágio de desenvolvimento que podem auxiliar o perito na investigação.

No desenvolvimento intrapuparial ocorrem diversas mudanças fisiológicas e morfológicas que transformam a larva em um adulto, característica esta comum aos insetos holometábolos. Nos dípteros muscoides, no processo de pupariação a larva encontra-se no estágio de larva errante, ou seja, a larva L3 que finalizou sua alimentação e busca um local apropriado para a formação do pupário, iniciando assim o estágio de pupação, que é o momento na qual as mudanças morfológicas e fisiológicas ocorrem no inseto, com as fases de pré-pupa; apólise larva-pupa; pupa criptocefálica; pupa fanerocefálica; apólise pupa-adulto; adulto farado e finalmente o imago, que é o momento de emergência do adulto completamente formado do pupário.

Atualmente estudos utilizando o desenvolvimento intrapuparial destes insetos para a área tanto taxonômica quanto forense estão cada vez mais comuns no meio acadêmico, porém eles ocorrem principalmente com as famílias Calliphoridae (DEFILIPPO et al., 2013; KARABEY e SERT, 2014; PROENÇA et al., 2014; MA et al., 2015; RAMOS-PASTRANA et al., 2017; FLISSAK e MOURA, 2018) e Sarcophagidae (CUNHA, 2014; SINHA e MAHATO, 2016), enquanto que para a família Muscidae, que também apresenta importância forense, existe apenas o estudo de

FRAENKEL e BHASKARAN (1973), na qual os autores, analisando a espécie *M. domestica* através de cortes histológicos sob a temperatura de 30 °C, identificam suas fases de pupação ao longo de seu desenvolvimento intrapuparial, porém não realizam a identificação dos caracteres morfológicos que surgem em cada fase e seus detalhes, o que demonstra a importância de estudos dentro desta área serem realizados com espécies da família Muscidae.

Os recentes estudos sobre desenvolvimento intrapuparial de muscóides utilizam metodologias semelhantes, na qual as pupas são mortas em água quente entre 70 e 90 °C (FLISSAK e MOURA, 2018; SILVA, 2018), com os pupários posteriormente fixados em Solução de Carnoy (48 horas), Ácido Fórmico 5% (48 horas) e após dissecação, conservadas as pupas em álcool 70% (PUJOL-LUZ e BARROS-CORDEIRO, 2012; BARROS-CORDEIRO et al., 2014), para observação em lupa.

Até o presente estudo, não há trabalhos realizados com a família Muscidae com a metodologia empregada de dissecação dos pupários e observação das pupas para identificação das fases de desenvolvimento intrapuparial e das características morfológicas presentes nos espécimes, sendo estudos desta natureza mais comuns com moscas das famílias Calliphoridae e Sarcophagidae, como citado anteriormente.

Os estudos mais recentes denominam entre cinco e sete fases de desenvolvimento intrapuparial, que variam da observação e das referências utilizadas pelos autores, classificando as fases em pupariação; pré-pupa, com alguns estudos incluindo a apólise larva-pupa nesta fase, ou até mesmo considerando esta fase como à parte (FLISSAK e MOURA, 2018); pupa criptocefálica, com alguns autores definindo esta fase com momentos de “antes” e “depois” (FRAENKEL e BHASKARAN, 1973; SILVA, 2018); pupa fanerocefálica, apólise pupa-adulto, adulto farado e emergência.

FLISSAK e MOURA (2018) ao avaliarem o desenvolvimento intrapuparial de *Sarconesia chlorogaster* (Calliphoridae) sob as temperaturas de 20 e 25 °C definem sete fases para a espécie: (1) pupariação; (2) apólise larva-pupa; (3) pupa criptocefálica; (4) pupa fanerocefálica; (5) apólise adulto-pupa; (6) adulto farado e (7) emergência, nomeando os momentos das apólises larva-pupa e pupa-adulto como fases, e não como eventos, como define FRAENKEL e BHASKARAN (1973), utilizando desta forma a definição de MARTÍN-VEGA et al. (2016) como base para seus resultados.

MARTÍN-VEGA et al. (2016) em seu estudo procura avaliar e resolver confusões de conceitos e terminologias que podem ocorrer em estudos de desenvolvimento intrapuparial de dípteros ciclorrafos, na qual o autor analisa outros estudos em busca do melhor conceito e descrição para cada fase encontrada. Nas fases de apólise, MARTÍN-VEGA et al. (2016) refere-se a elas ainda como eventos que ocorrem e que ajudam à dar origem às fases seguintes do desenvolvimento intrapuparial, como a de Pupa Criptocefálica e Adulto Farado.

SILVA (2018) também identificou sete fases de desenvolvimento intrapuparial para sua espécie (*Hemilucilia semidiaphana*: Calliphoridae), trabalhando sob as mesmas temperaturas de 20 e 25 °C, porém com algumas diferenças, como por exemplo, sem definir a apólise larva-pupa, enquanto que no momento de pupa criptocefálica, dividiu a fase em duas: pupa criptocefálica anterior (com as pernas começando a surgir e bem pequenas, enquanto que o resto do corpo assemelha-se ainda à da larva) e posterior (quando as pernas estão mais longas, ocupando aproximadamente $\frac{1}{4}$ do corpo), porém apresentando o momento da apólise pupa-adulto como uma fase, enquanto que a fase que seria denominada como “adulto farado” foi definida através de características como olhos formados, porém transparentes; olhos rosados e olhos avermelhados, até finalmente chegar no momento da emergência do adulto do pupário. Desta forma, as fases que permaneceram iguais à autora anterior foram: pupariação, pré-pupa, pupa criptocefálica (apesar da divisão dentro desta fase), pupa fanerocefálica, apólise pupa-adulto e emergência (com a fase de adulto farado subentendida na descrição dos olhos compostos).

Com relação ao desenvolvimento pupal e a temperatura, SKIDMORE (1985) e AXTELL (1986) ao trabalharem com *O. aenescens* sob a temperatura de 27 °C observaram o desenvolvimento pupal ocorrendo ao longo de quatro dias, tempo inferior ao do presente estudo, com o desenvolvimento ocorrendo por volta de sete dias na mesma temperatura.

AXTELL (1986) diz ainda em seu estudo que as espécies *O. aenescens* e *M. domestica* apresentam o ciclo de vida e desenvolvimento semelhantes quanto a duração. Portanto, ao realizar um comparativo do desenvolvimento intrapuparial de ambas espécies de Muscidae, observa-se que *M. domestica* (FRAENKEL e BHASKARAN, 1973) emerge do pupário em 110 horas (aproximadamente 4 dias) à 30 °C, enquanto que *O. aenescens* no presente estudo emergiu mais tarde, em 174 horas

(aproximadamente 7 dias) à 27 °C, demonstrando desta forma o rápido desenvolvimento do ciclo de vida do inseto conforme aumenta a temperatura.

SILVEIRA-NETO et al. (1976) relataram que a temperatura é um fator regulador para as atividades dos insetos, com a faixa ótima ocorrendo em torno de 25 °C, com um desenvolvimento mais rápido e apresentando maior número de descendentes.

Na entomologia forense, os marcadores morfológicos mais utilizados em estudos analisando a morfologia da pupa são os apêndices da cabeça e do tórax, como apresentados nos estudos de RICHARDS et al., 2012; KARABEY e SERT, 2014; PROENÇA et al., 2014 e MA et al., 2015, com a delimitação e pigmentação dos olhos como um dos fatores determinantes, enquanto que na região torácica, as pernas (desenvolvimento e segmentação de estruturas como coxa, fêmur, tíbia, tarsos e garras) e as asas (desenvolvimento e pigmentação das veias) apresentam maior desenvolvimento com relação à definição das estruturas e pigmentação. O abdômen apresenta também características muito utilizadas como a mudança de cor, sua segmentação e o desenvolvimento dos espiráculos (KARABEY e SERT, 2014), porém não foram observadas tais mudanças de forma significativa ao longo deste estudo, enquanto que o formato do corpo, como a tagmatização em cabeça, tórax e abdômen, que geralmente são pouco utilizados em estudos da área, demonstraram-se mais significativos.

Outros marcadores morfológicos que apresentaram grande importância neste estudo foram os sífões respiratórios da pupa e sua mudança de pigmentação e posição anatômica; estruturas como as antenas, com detalhes e sua formação como a delimitação do escapo, pedicelo e flagelo, além da posterior pigmentação e surgimento da arista, enquanto que no aparelho bucal estruturas como o labro, labela e palpos maxilares também apresentaram grande importância, com o surgimento das cerdas nestas estruturas e pigmentação dos palpos maxilares na coloração amarelada, característica chave de identificação da espécie, além do surgimento das cerdas ao longo de todo o corpo do inseto, contando com cabeça, tórax, abdômen e pernas e a pigmentação precoce destas.

MARTÍN-VEGA et al. (2016) em seu estudo analisaram a nomenclatura utilizada em estudos de desenvolvimento intrapuparial, definindo cada fase e

analisando possíveis falhas no uso deste tipo de estudo a partir de diferentes metodologias, onde estes autores sugerem que metodologias como tomografia micro-computadorizada 3D ou análise histológica são as melhores para observação das fases de apólise. Os autores levantam ainda, a questão sobre a utilização das fases de desenvolvimento para a estimativa da delimitação temporal, pois tem a preocupação de que algum erro ao longo desta possa levar a erros na estimativa do Intervalo Pós-Morte mínimo (IPM_{mín}).

A metodologia aplicada no presente estudo demonstra-se mais simples e mais barata que outras propostas, sendo esta a mais provável de ser utilizada em laboratórios de perícia criminal. Através da observação da pupa em lupa, é possível observar estruturas morfológicas em detalhes como o surgimento das cerdas, delimitação das estruturas como antenas e peças bucais e a pigmentação gradual que ocorre no corpo do inseto ao longo de seu desenvolvimento, que no caso de *Ophyra aenescens*, pode auxiliar na identificação da espécie, através dos palpos maxilares amarelados, mesmo que nos horários finais de desenvolvimento, sendo esta última característica (pigmentação) não observada em metodologias complexas como as citadas no parágrafo anterior.

Nos estágios iniciais do desenvolvimento da pupa não é possível identificar com certeza a família, gênero ou espécie que o espécime pertence, justamente por conta das estruturas morfológicas não estarem suficientemente formadas para que a identificação através de chaves dicotômicas seja realizada, portanto, caso o perito tenha a necessidade de identificação da espécie nos primeiros horários de desenvolvimento do espécime, recomenda-se outras formas de identificação, como observação ultra-estrutural do pupário, das larvas; caso tenham; encontradas juntamente aos pupários ou análise de DNA da pupa, para identificação da espécie.

Como forma de tornar os dados encontrados da pupa mais apurados, recomenda-se, além da análise das fases de pupação, que as definições do IPM_{mín} através das pupas sejam baseadas nas características morfológicas observadas e bem definidas, já que estas ocorrem em intervalos de tempo mais específicos, do que em comparação com as fases da pupação que apresentam diversos intervalos de horas nas quais, muitas vezes, não ocorrem mudanças morfológicas, como no caso da fase de Pupa Fanerocefálica.

Foi apresentado neste estudo 12 intervalos de tempo, com um total de 25 caracteres morfológicos avaliados para auxiliar na estimativa da idade da pupa de *O. aenescens* e de suas fases de pupação, contando ainda com diferenças sutis como a mudança de posição de algumas características, delimitação de estruturas e pigmentação gradual.

6) CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foram identificadas oito fases do desenvolvimento intrapuparial, desde o momento inicial da pupariação, até a emergência do imago. Foram descritos neste estudo 25 caracteres morfológicos chaves no desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* que auxiliam na estimativa da idade da pupa e identificação da espécie, apesar de tardia (como no caso da coloração dos palpos maxilares), além da identificação também das fases de desenvolvimento desta, podendo esta metodologia auxiliar peritos, entomólogos forenses e/ou técnicos no cálculo do Intervalo Pós-Morte mínimo, uma vez que a espécie apresenta interesse forense.

Desta forma, este estudo procura colaborar com o meio acadêmico-científico forense acerca das informações do desenvolvimento intrapuparial de Muscidae, que ainda apresenta pouquíssimos estudos, apesar de sua grande importância.

Recomendando-se mais estudos sobre a temática com outras espécies de Muscidae, afim de aumentar a acurácia do método para usos futuros e desta forma aumentar o grau de confiabilidade das estimativas do intervalo pós-morte através dos vestígios entomológicos.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMENDT, J.; RICHARDS, C.S.; CAMPOBASSO, C.P.; ZEHNER, R.; HALL, M.J.R. **Forensic entomology: applications and limitations.** *Forensic Sci Med Pathol* 7: 379–392, 2011.

AXTELL, R.C. **Fly Management in Poultry Production: Cultural, Biological, and Chemical.** *Poultry Science* 65:657-667, 1986.

BARROS-CORDEIRO, K.B.; BÁO, S.N.; PUJOL-LUZ, J.R. **Intra-puparial development of the black soldier-fly, *Hermetia illucens*.** *Journal of Insect Science* 14(83), 2014.

BENECKE, M. **A brief history of forensic entomology.** *Forensic Science International*. 120, 2-14, 2001.

BENECKE, M.; LESSIG, R. **Child neglect and forensic entomology.** *Forensic Science International* 120, 155-159, 2001.

BOTTEON, V.W. **Perspectivas de Uso de Insetos Bioindicadores Ambientais em Trabalhos Periciais.** *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics* 5(4): 383-401, 2016.

BYRD, J. H. & J. L. CASTNER. **Forensic Entomology: The utility of arthropods in legal investigations.** 1st edition, Boca Raton, CRC Press, 418 p, 2001.

CATTS, E.P.; GOFF, M.L. **Forensic Entomology in criminal investigations.** *Annu. Rev. Entomol.* 37:253-72, 1992.

CATTS, E.P. **Problems in Estimating the Postmortem Interval in Death Investigations.** *J. Agric. Entomol.* 9(4); 245-255, 1992.

CARVALHO, C.J.B. **Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy.** Editora Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 287 pp., 2002.

CARVALHO, C.J.B.; COURI, M.S. **Part I. Basal groups.** In: Carvalho, C.J.B. de (Ed) *Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region: taxonomy.* Editora Universidade Federal do Paraná, Curitiba, p.17-132, 2002.

CARVALHO, C.J.B.; MOURA, M.O.; RIBEIRO, P.B. **Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil.** *Revista Brasileira de Entomologia* 46(2): 107-114, 2002.

CARVALHO, C.J.B.; COURI, M.S.; PONT, A.C.; PAMPLONA, D.; LOPES S.M. **A Catalogue of the Muscidae (Diptera) of the Neotropical Region.** *Zootaxa* 860:1-282, 2005.

CEPEDA-PALACIOS, R.; SCHOLL, P.J. **Intra-Puparial Development in *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae).** *J. Med. Entomol.* 37(2): 239-245, 2000.

COURI, M.S.; CARVALHO, C.J.B. **Diptera Muscidae do Estado do Rio de Janeiro (Brasil).** *Biota Neotropica*, v5 (n2), 2005.

CUNHA, A.M.J.S. **Desenvolvimento intra-pupal de *Peckia intermutans* e *Peckia lambens* (Diptera, Sarcophagidae).** Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, 2014.

CROCE, D. & CROCE JUNIOR, D. **Manual de Medicina Legal.** Saraiva, São Paulo 1998.

d'ALMEIDA, J.M. **Substratos utilizados para a criação de dípteros caliptrados em uma área urbana no município do Rio de Janeiro.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 83(2): 201-206, 1988.

d'ALMEIDA, J.M. **Relações tróficas entre dípteros caliptrados (Calliphoridae, Muscidae e Sarcophagidae), criados em diferentes substratos no Rio de Janeiro, RJ.** *Entomol Vect* 4: 111-121, 1997.

DEFILIPPO, F.M.S.; BONILAUDI, P.B.D.; DOTTORI, M.D.V.M. **Effect of temperature on six different developmental landmarks within the pupal stage of the forensically important blowfly *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae).** *J Forensic Sci*, 1-4, 2013.

FRAENKEL, G.; BHASKARAN, G. **Pupariation and Pupation in Cyclorrhaphous Flies (Diptera): Terminology and Interpretation.** *Annals of the Entomological Society of America*. Vol. 66, no. 1, 418-422, 1973.

FLISSAK, J.C.; MOURA, M.O. **Intrapuparial Development of *Sarconesia chlorogaster* (Diptera: Calliphoridae) for Postmortem Interval Estimation (PMI).** *Journal of Medical Entomology*, Vol. 55 (2): 277-284, 2018.

GREENBERG, B. **Flies e Disease. Volume 1. Ecology, Classification and Biotic Associations.** University Press, Princeton. 1971.

GREENBERG, B. **Flies as forensic indicators.** *Journal of Medical Entomology*, 28(5), p. 565-577, 1991.

GRZYWACZ, A.; HALL, M.J.R.; PAPE, T.; SZPILA, K. **Muscidae (Diptera) of forensic importance—an identification key to third instar larvae of the western Palaearctic region and a catalogue of the muscid carrion community.** *Int J Legal Med* 131:855–866, 2017.

GUIMARÃES, J.H. & PAPAVERO, N. **Myiasis in man and animals in the Neotropical Region; bibliographic database.** Plêiade/FAPESP, São Paulo. 1999.

HOGSETTE, J.; WASHINGTON, F. **Quantitative Mass Production of *Hydrotaea aenescens* (Diptera: Muscidae).** *J. Econ. Entomol.* 88(5): 1238-1242, 1995.

KARABEY, T.; SERT, O. **The analysis of pupal development period in *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) forensically important insect.** *Int J Legal Med*, 2014.

MA, T.; HUANG, J.; WANG, J.F. **Study on the pupal morphogenesis of *Chrysomya rufifacies* (Macquart) (Diptera: Calliphoridae) for postmortem interval estimation.** *Forensic Science International* 253, 88–93, 2015.

MARTÍN-VEGA, D.; HALL, M.J.R.; SIMONSEN, T.J. **Resolving Confusion in the Use of Concepts and Terminology in Intrapuparial Development Studies of Cyclorrhaphous Diptera.** *Journal of Medical Entomology*, Vol. 0, No. 0, 1-3, 2016.

NIHEI, S.S.; DOMÍNGUEZ, M.C. Muscidae. In: CLAPS, L.E.; DEBANDI, G.; ROIG-JUÑENT, S. **Biodiversidad de Artrópodos Argentinos**, vol. 2. 319-328, 2008.

NOLAN, M.P.; KISSAM, J.B. ***Ophyra aenescens*: a potential bio-control alternative for house fly control in poultry houses.** *J. Agric. Entomol.* 2(2), 192-195, 1985.

OLIVEIRA-COSTA, J. **Entomologia Forense: Quando os insetos são vestígios.** Millennium Editora, 3° Ed, Campinas, SP, 2011.

OLIVEIRA-COSTA, J.; LAMEGO, C.M.D.; COURI, M.S.; MELLO-PATIU, C.A. **Differential Diptera succession patterns onto partially burned and unburned pig carrion in southeastern Brazil.** *Braz. J. Biol.*, vol. 74, no. 4, p. 870-876, 2014.

PACINI, D.B.; SANTOS dos, C.R.M; TEIXEIRA, C.R.; QUEIROZ, P.R.M. **Uso dos Diptera na análise entomotoxicológica e na estimativa do intervalo pós-morte (IPM).** Universitas: Ciências da Saúde, Brasília, v. 13, n. 1, p. 29-39, jan./jun. 2015.

PROENÇA, B.; RIBEIRO, A.C.; LUZ, R.T.; AGUIAR, V.M.; MAIA, V.C.; COURI, M.S. **Intrapuparial Development of *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae).** *J. Med. Entomol.* 51(5): 908-914, 2014.

PUJOL-LUZ, J.R.; BARROS-CORDEIRO, K.B. **Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae).** *Revista Brasileira de Entomologia* 56(3): 269–272, 2012.

QUEIROZ, M.M.C.; MILWARD-DE-AZEVEDO, E.M.V. **Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório.** *Revta bras. Zool.* 8 (1/2/3/4): 75-84, 1991.

QUEIROZ, M.M.C; MELLO, R.P.; LIMA, M.M. **Morphological Aspects of the Larval Instars of *Chrysomya albiceps* (Diptera, Calliphoridae) Reared in the Laboratory.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 92(2): 187-196, 1997.

RAMOS-PASTRANA, Y.; LONDOÑO, C.A.; WOLFF, M. **Intra-puparial development of *Lucilia eximia* (Diptera, Calliphoridae).** *Acta Amazonica* Vol. 47(1): 63 – 70, 2017.

RIBEIRO, P.B.; CARVALHO, C.J.B.; COSTA, P.R.P.; SILVEIRA JÚNIOR, P. **Desenvolvimento de *Ophyra aenescens* Wiedemann, 1830 (Diptera, Muscidae, Azeliinae), em diferentes temperaturas, em condições de laboratório.** *Rev. Bras. de Agrociência*, v.6 no1, 80-87, 2000.

RICHARDS, C.S.; SIMONSEN, T.J.; ABEL, R.L.; HALL, M.J.R.; SCHWYN, D.A.; WICKLEIN, M. **Virtual forensic entomology: Improving estimates of minimum post-mortem interval with 3D micro-computed tomography.** *Forensic Science International*. 220, 251–264, 2012.

RODRÍGUEZ, Z.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. ***Ophyra aenescens* (L.) (Diptera: Muscidae) a New Biological Vector of *Dermatobia hominis* (L. Jr) (Diptera: Cuterebridae) in Minas Gerais, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 94(1): 53-54, 1999.

SILVA, S.M. **Intrapuparial development of *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) (Diptera, Calliphoridae) and its use in forensic entomology.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Entomologia), Curitiba, PR, 2018.

SILVEIRA-NETO, S. **Manual de ecologia dos insetos.** Ed. Agronômica Ceres. São Paulo. 419, 1976.

SINHA, S.K.; MAHATO, S. **Intra-puparial development of flesh fly *Sarcophaga dux* (Thomson) (Diptera, Sarcophagidae).** *Current Science*, Vol. 111(6): 1063-1070, 2016.

SKIDMORE, P. **The Biology of the Muscidae of the World.** Junk Publishers, Lancaster, 550 pp. 1985.

SMITH, K.G.V. **A Manual of Forensic Entomology.** Trustees of the British Museum (Natural History). Cornell University Press, 1986.