

**FIOCRUZ**

**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Desenvolvimento e Caracterização Intrapuparial de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), em condições de laboratório**

**LEIANI CRISTINA MARTINS DO COUTO**

**Orientadora: Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz**

**Rio de Janeiro**

**2019**

**LEIANI CRISTINA MARTINS DO COUTO**

**Desenvolvimento e Caracterização Intrapuparial de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758)  
(Diptera: Muscidae), em 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 - IOC/FIOCRUZ.

Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ

Data: \_\_\_/\_\_\_/2019

---

Assinatura do Aluno

---

Assinatura do Orientador

C.M.do Couto, Leiani

Desenvolvimento e Caracterização Intrapuparial de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), em condições de laboratório. / Leiani Cristina Martins do Couto. – Rio de Janeiro, 2019.

f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2019.

Orientadora: Margareth Maria de Carvalho Queiroz

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1.Desenvolvimento Intrapuparial. 2. Entomologia Forense 3. Mosca. I  
Título

*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda  
a escada. Apenas dê o primeiro passo.”*

Martin Luther King

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois é Ele que me sustenta e me guia em todos os meus caminhos.

Aos meus pais que são ímpares em minha vida e sempre se esmeraram muito para que eu chegasse até aqui, por entenderem a minha ausência, me apoiarem, se preocuparem comigo e terem feito um ótimo trabalho no papel de pais, pois são meus maiores exemplos.

Ao meu marido, pois sem ele nada disso seria possível, sempre me apoiou em todas as minhas escolhas e me encorajou quando achei que não era capaz, pelo seu amor, carinho, paciência e por ser mais que um ombro amigo em todos os momentos.

À minha irmã que sempre esteve ao meu lado torcendo e me apoiando em tudo, pelas longas conversas que contribuíram sempre para que eu encontrasse meu caminho.

Aos meus sobrinhos e filha do coração Ygor, Giovanna e Beatriz por serem meu incentivo de querer ser melhor e fazer melhor todos os dias.

À minha orientadora Dra. Margareth Maria de Carvalho Queiroz, por me apoiar e me receber tão bem no Laboratório de Entomologia Médica e Forense, por me apresentar a essa linha de pesquisa que me apaixonei, pela paciência, cuidado, preocupação e ensinamentos durante todo esse processo, por sempre compartilhar sua sapiência não somente profissional, mas também de vida, fazendo sempre com que venhamos enxergar muito além do momento vivido, zelando pelo nosso futuro, sou grata pela confiança deposita em mim.

Aos meus amigos da especialização, Michelin, Luiz, Laura, Jessica, Thiago, Felipe, Edgar, Juliana e Seu Cristóvão, que estão marcados eternamente em minha vida, sem palavras para esta linda parceria que encontrei nesta turma, vocês fizeram com que essa trajetória se tornasse leve e cheia de luz.

Aos meus professores que com maestria me aproximaram da entomologia, me mostrando não somente o que se aprende em sala de aula, mas principalmente, sempre se preocuparam em como podemos nos tornar profissionais e pessoas melhores, sou imensamente grata por cada momento vivido.

Gostaria de destacar meu agradecimento ao professor Dr. Rubens Pinto de Mello que tanto admiro, pela oportunidade inenarrável de ser sua aluna e viver momentos memoráveis em sala de aula e a professora Dra. Catarina Macedo Lopes que felizmente fui acariciada com a oportunidade de conhecer, tamanha é minha admiração, obrigada pelos conselhos e por sempre me incentivar, vocês têm um espaço especial em meu coração.

Aos meus colegas de laboratório Lorrane, Marcio, Luiz, Marina, Lucas, Paloma, André, Vicente, Isabel e Raquel pela receptividade, por todo apoio, companheirismos, ensinamentos e por toda força que me deram, vocês foram fundamentais.

À Suzete e ao Eduardo do Laboratório de Malacologia do IOC, pela assistência durante o processo de fotografia.

Ao Ricardo da Plataforma de Imagem – SPTI/ IOC - FIOCRUZ que foi basilar para execução deste trabalho pela dedicação, presteza e paciência.

Aos membros da banca examinadora (Dr. Rubens Pinto de Mello, Dra. Paloma Martins Mendonça e M.Sc. Marina Lopes Duarte) pelas correções e sugestões que tanto enriqueceram a versão final desta monografia.

Por fim, mas não menos importante agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) e à coordenação do curso de pós-graduação em Entomologia Médica, pela oportunidade e por todo suporte provido ao longo do curso.

## RESUMO

Os dípteros muscoides são insetos conhecidos popularmente como moscas que apresentam grande importância médica, veterinária e forense por serem transmissores mecânicos de microrganismos patogênicos. Possuem hábitos necrófagos e são pioneiros em carcaças tanto de humanos quanto de animais, desde os estágios iniciais de decomposição cadavérica até os finais. O estudo do desenvolvimento intrapuparial se dá pela necessidade de conhecer todos os estágios do ciclo biológico destes insetos holometábolos, uma vez que o conhecimento da morfologia e da biologia durante o processo de pupa ainda é restrito em diversas espécies de moscas. As principais espécies da dipterofauna necrófaga do Brasil pertencem às famílias Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Fanniidae e Stratiomyidae. Destacando a família Muscidae, o objetivo do estudo foi reconhecer e descrever morfologicamente as estruturas externas das pupas a fim de caracterizar as etapas do desenvolvimento intrapuparial e estimar a idade de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758). Os insetos foram coletados em caçambas de lixo localizadas na comunidade do Amorim, bairro de Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ e levados para formarem colônias no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF). Todo o ciclo biológico dos insetos foi desenvolvido em estante ventilada (temperatura, umidade e fotoperíodo regulados  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % URA e 12 h de fotofase), as larvas errantes (maduras) foram coletadas e as pupas foram separadas em diferentes períodos para dissecação e verificação do desenvolvimento das estruturas morfológicas externas. Foram analisadas 300 pupas, com seus pupários dissecados a cada 3 h nas primeiras 24 h e posteriormente a cada 6 h até a emergência do imago. As fases encontradas foram a de pupariação, pré-pupa, pupa criptocefálica anterior, pupa criptocefálica posterior, pupa fanerocefálica, apólise pupa-adulto, olhos transparentes, olhos rosados, olhos vermelhos e emergência do imago. Este estudo forneceu dados do desenvolvimento intrapuparial de *M. domestica* para auxiliar na estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM) utilizadas na entomologia forense e na descrição do desenvolvimento intrapuparial de novas espécies de muscoides com importância forense.

Palavras chave: Desenvolvimento intrapuparial, entomologia forense, mosca

## ABSTRACT

Diptera muscoides are insects popularly known as flies that are of great medical, veterinary and forensic importance because they are mechanical transmitters of pathogenic microorganisms. They have scavenging habits and are pioneers in both human and animal carcasses, from the early stages of cadaveric decomposition to the end the study of intrapuparial development is due to the need to know all the stages of the biological cycle of these holometabolus insects, since the knowledge of morphology and biology during the pupa process is still restricted in several species of flies. The main species of necrophagous dipterofauna in Brazil belong to the families Calliphoridae, Sarcophagidae, Muscidae, Fanniidae and Stratiomyidae. Highlighting the Muscidae family, the objective of the study was to recognize and describe morphologically the external structures of the pupa in order to characterize the stages of intrapuparial development and to estimate the age of *Musca domestica* (Linnaeus, 1758). The insects were collected in dumpsters located in the Amorim community, Manguinhos neighborhood, Rio de Janeiro, RJ and taken to form colonies at the Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF). The entire biological cycle of the insects was developed in a ventilated rack (regulated temperature, humidity and photoperiod  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10\%$  IVR and 12 h photophase), mature larvae were collected and the pupae were separated into different periods for dissection and verification of the development of external morphological structures. Three hundred pupae were analyzed, with their pupae dissected every 3 h for the first 24 h and thereafter every 6 h until imago emergence. The phases found were pupariation, pre-pupa, anterior cryptocephalic pupa, posterior cryptocephalic pupa, phanerocephalic pupa, adult pupa apolysis, transparent eyes, pink eyes, red eyes and imago emergence. This study provided data on *M. domestica* intrapuparial development to assist in estimating the Postmortem Interval (PMI) used in forensic entomology and in describing intrapuparial development of new forensic muscoid species.

Keywords: Intrapuparial development, forensic entomology, fly.



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Número amostral de pupa (n), valores mínimos e máximos (intervalo de variação), tempo médio da duração (em horas) e desvio padrão de cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase em laboratório.....**21**

**Tabela 2** – Fases e evento do desenvolvimento intrapuparial comparadas de diferentes espécies e temperaturas, dados retirados das tabelas realizadas dos respectivos autores.....**32**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Coleta realizada em caçamba de lixo localizada na comunidade do Amorim, bairro de Manguinhos, Rio de Janeiro, de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758). .....16
- Figura 2** - Gaiola de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) recebendo carne bovina em estado de putrefação, para maturação dos ovos, e solução açucarada.....17
- Figura 3** - Colônias de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) em estante ventilada ..... 17
- Figura 4** - Recipiente com substrato de pupação e recipiente com dieta e posturas obtidas na colônia de *Musa domestica* (Linnaeus, 1758). .....18
- Figura 5** - Triagem das pupas .....19
- Figura 6** – **A:** microscópio estereoscópico presente no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF); **B:** pupa e pupário dissecado .....19
- Figura 7** - Lupa Leica M205c acoplada a uma câmera fotográfica digital e ao computador localizado na Coleção Malacológica do Instituto Oswaldo Cruz (CMIOC) .....20
- Figura 8** - Desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase. Vista dorsal e ventral. Escala de 1 mm. ....26
- Figura 9** - Desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase . Vista dorsal e ventral. Escala de 1 mm .....27
- Figura 10** - Desenvolvimento intrapuparial da cabeça em vista ventral de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase.....28
- Figura 11** - Linha do tempo do desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C .....29

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	15
2.1. Geral.....	15
2.2. Específicos.....	15
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	16
3.1. Estabelecimento das colônias de <i>Musca domestica</i> (Linnaeus, 1758) .....	16
3.2. Criação dos imaturos .....	18
3.3. Triagem das pupas .....	18
3.4. Análises das pupas .....	19
<b>4. RESULTADOS</b> .....	21
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	35

## 1 INTRODUÇÃO

A entomologia forense tem uma aplicabilidade ainda restrita, porém sabe-se que existem casos que a perícia possui acesso à cena do crime após certo período de sua execução, e deve-se atentar a todos os vestígios, como uma pupa, por exemplo, que pode enunciar a relevância deste estudo para que não haja a negligência com nenhuma evidência. A análise do desenvolvimento intrapuparial é uma ferramenta para o perito ou a polícia científica, acessível e aplicável em sua rotina para determinação do tempo que a pupa se encontra no local do crime e assim, poder estimar o tempo de morte da vítima ou o tempo que o cadáver esteve em contato com o ambiente e conseqüentemente, com os insetos até a data que este foi encontrado através da estimativa do Intervalo pós-morte (IPM). Sendo assim, os insetos e artrópodes necrófagos podem servir à entomologia forense para elucidação de casos judiciais, pois eles utilizam as carcaças como alimento, local de reprodução e oviposição, onde cada espécie conclui esse ciclo nos diferentes estágios da decomposição ou durante o processo (OLIVEIRA-COSTA; AZEVEDO, 2011).

Estimar o intervalo de tempo máximo e mínimo possível entre a morte e a descoberta do cadáver tipifica o IPM. O limite máximo é determinado pelas espécies de insetos e sua biologia, que pode ser utilizado para fornecer a estimativa do tempo que o cadáver esteve exposto. Já o Intervalo pós-morte mínimo (IPM<sub>mín.</sub>) é calculado pela estimativa do desenvolvimento dos imaturos no momento da descoberta do cadáver (CATTS, 1992) ou do local do crime, onde não somente a larva pode ser utilizada, mas o estágio de pupa também pode ser eficaz para a aplicação do mesmo.

A sucessão entomológica é primordial para a estimativa do IPM, pois a entomofauna é atraída pelos gases liberados ao longo da degradação dos aminoácidos, que por decarboxilação, desamilação, oxidação, redução e hidrólise se transformam em produtos residuais do seguimento pútrido, como gás sulfídrico, ureia, aminoácido, idol, entre outros. Durante a decomposição e até mesmo quando a pessoa encontra-se agonizando é possível observar oviposições de insetos no corpo (SCAGLIA, 2014), que se tornam evidências chaves para o auxílio da elucidação de muitos casos.

Diptera é a ordem formada por insetos cosmopolitas, com importância médica, veterinária, sanitária e forense, com sua característica sinantrópica, correspondem a um dos grupos de insetos mais diversos que existem, ocupando todos os continentes e quase todos os

habitats (COURTNEY; MERRITT, 2008) tornando-os assim potenciais vetores de diferentes microrganismos patogênicos como: vírus, fungos, ovos e larvas de helmintos, bactérias e protozoários.

Estima-se 160 famílias com 160.000 espécies na região Neotropical e aproximadamente mais 118 famílias com 30.000 espécies, com 96 famílias no Brasil, apresentando 1.913 gêneros, com quase 11.000 espécies (BRAVO; CALOR, 2016). Os dípteros possuem um par de asas membranosas funcionais anteriores e um par de asas posteriores modificadas em halteres ou balancins, que são encarregadas pela manutenção e equilíbrio no voo. A característica quanto ao número de asas funcionais dá origem ao nome grego à ordem (*di* = duas; *pteron* = asa). (BORROR; DELONG, 2011).

Os Muscomorpha conhecidos popularmente como moscas, “mosca do estábulo”, “mosca tsé-tsé”, “mosca varejeira”, “mosca do berne” etc., são os considerados dípteros superiores, do qual faz parte a família Muscidae (SERRA-FREIRE; MELLO, 2006). Geralmente são insetos atraídos para regiões domiciliares, principalmente, pela presença dos resíduos de matéria orgânica animal e/ou vegetal em decomposição, com algumas espécies apresentando comportamento sinantrópico, como por exemplo a *Musca domestica* Linnaeus, 1758, com hábitos variados, as larvas desta família apresentam hábitos predatórios, saprófagos, coprófagos e necrófagos, sendo decompositores de matéria orgânica (COURI; CARVALHO, 2005) e causadoras de miíases secundárias.

*Musca domestica* conhecida popularmente como mosca doméstica, mosca comum ou ainda mosca caseira, possui desenvolvimento holometabólico (ovo, larva, pupa e adulto) (BARNES et al., 2008), sendo que 50% do desenvolvimento do imaturo ocorre no estágio de pupa (MARTÍN-VEGA; HALL; SIMONSEN, 2016) e em *M. domestica* ocorrem três (03) instares larvais, pré-pupa e pupa que é a fase de endurecimento e contração no último instar larval formando uma carapaça externa denominada pupário (MELLO-PATIU, 2016). Existe a necessidade de conhecer a morfologia de todos os estágios do ciclo deste inseto holometábolo e a entomologia forense vem reforçando ainda mais esta indispensabilidade.

Moscas domésticas voam em distâncias de até 30 quilômetros buscando condições pertinentes de alimentação e reprodução (CAFARCHIA et al., 2009). Fatores abióticos como temperatura e umidade têm interferência direta no tempo de desenvolvimento destes insetos.

Imaturos de *M. domestica* foram encontrados associados à carcaça em decomposição por

Carvalho et al. (2004). No Brasil, foram publicados diversos trabalhos no qual foram encontrados imaturos em carcaças de animais nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Norte, e Sudeste, no Rio de Janeiro associada a cadáveres humanos (OLIVEIRA-COSTA; URURAHY-RODRIGUES, 2013).

Martín-Vega et al. (2016) revisaram os conceitos e terminologias das fases e eventos do desenvolvimento intrapuparial utilizadas em estudos anteriores, apesar de terem utilizado tomografias virtuais micro computadorizadas, a metodologia da nomenclatura utilizada no presente estudo segue como base a mesma linha apontada em seu estudo, sendo na pupariação a larva L3 cessa a mobilidade e alimentação; seguida da pré-pupa que assume a forma de barril e reduzindo seu tamanho a aproximadamente 56% do último instar larvar; pupa criptocefálica anterior com a extroversão da cabeça e dos apêndices torácicos; pupa criptocefálica posterior com os apêndices torácicos correspondendo a  $\frac{1}{4}$  do corpo da pupa; pupa fanerocefálica com a evaginação da cabeça e tagmatização do corpo (cabeça, tórax e abdome); apólise pupa-adulto, quando a epiderme se separa da antiga cutícula secretando uma nova cutícula; olhos transparentes, olhos rosados e olhos vermelhos são fases utilizadas no presente estudo que evidenciam o adulto formado apontado por Martín-Vega et al. (2016) ocorrendo a maturação de todas as estruturas como os olhos, cabeça, tórax, abdome, pernas e asas; com por último a emergência do imago.

Além do tempo de desenvolvimento dos insetos nos cadáveres, existem outras técnicas podem ser utilizadas como ferramentas de auxílio para o IPM estimando a idade da pupa, como variação temporal na expressão gênica de determinados marcadores utilizando métodos moleculares (TARONE; JENNINGS; FORAN, 2007; ZEHNER; AMENDT; BOEHME, 2009), a tomografia micro computadorizada 3D (RICHARDS et al., 2012), técnicas de microscopia para analisar morfologia externa e interna (BROWN et al., 2015), porém o conhecimento do desenvolvimento intrapuparial aqui apresentado tem um papel importante na Entomologia Forense, pois pode ser um facilitador na estimativa da idade da pupa, podendo acelerar o trabalho dos peritos e polícia científica, sendo mais viável na rotina destes, sem a necessidade de ter categoricamente uma parceria com laboratórios de pesquisa.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Reconhecer e descrever morfológicamente as estruturas externas das pupas a fim de caracterizar as etapas do desenvolvimento intrapuparial e estimar a idade de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase, para auxiliar na estimativa do IPMmín.

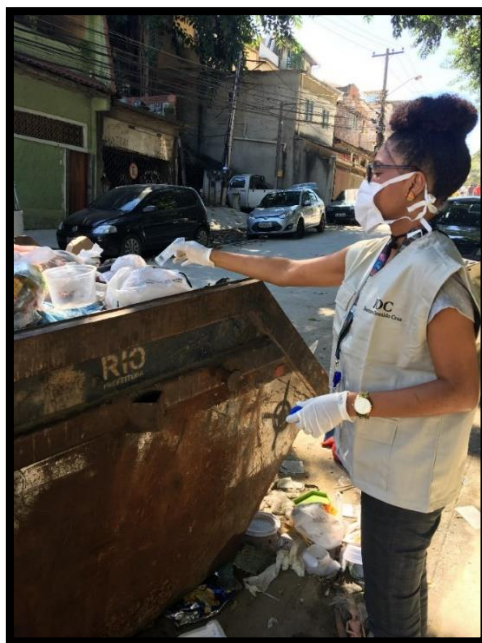
### 2.2 Objetivos específicos

- Reconhecer as fases e eventos do desenvolvimento intrapuparial denominadas: (1) pupariação; (2) pré-pupa; (3) pupa criptocefálica anterior; (4) pupa criptocefálica posterior; (5) pupa fanerocefálica; (6) apólise pupa-adulto; (7) olhos transparentes, (8) olhos rosados, (9) olhos vermelhos e (10) imago de *Musca domestica* sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase.
- Estimar as idades aproximadas de pupas através das estruturas morfológicas observadas e descritas, com base no surgimento; definição e pigmentação de tais estruturas, sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 Estabelecimento das colônias de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758).

As coletas dos insetos adultos foram realizadas em caçambas de lixo localizadas na comunidade do Amorim, bairro de Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ (22°52'32.2"S 43°15'01.9"W) ativamente com auxílio de puçá e tubo Falcon (**Figura 1**). O estabelecimento das colônias foi realizada no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF/IOC), e a identificação ocorreu por meio de chave dicotômica de Carvalho et al. (2002) e criados segundo metodologia preconizada por Queiroz e Milwald-de-Azevedo (1991), em gaiolas de madeira, teladas nas laterais e com uma a abertura frontal (**Figura 2**) e com essas alocadas dentro de estante ventilada sob condições controladas de temperatura ( $27 \pm 1$  °C), fotoperíodo (12 h) e umidade relativa de ( $60 \pm 10\%$ ) (**Figura 3**).



**Figura 1** - Coleta de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) realizada em caçamba de lixo localizada na comunidade do Amorim, bairro de Manguinhos, Rio de Janeiro.

Fonte: Acervo do LEMEF.





**Figura 2** - Gaiola de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) recebendo carne bovina em estado de putrefação para maturação dos ovos e solução açucarada.

Fonte: Acervo do LEMEF.



**Figura 3** - Colônias de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) em estante ventilada, regulada na temperatura ( $27 \pm 1$  °C), fotoperíodo (12 h) e umidade relativa de ( $60\% \pm 10$ ).

Fonte: Acervo do LEMEF.

### 3.2 Criação dos imaturos

Após o estabelecimento das colônias de *Musca domestica* e maturação dos ovos, foi estimulada a postura das moscas e utilizando dieta modificada de Ferreira et al. 2016, para as larvas uma mistura de carne moída bovina com farelo de trigo na proporção de 1:5 g. As posturas da segunda geração (L2) foram separadas em recipientes plásticos menores contendo a dieta e alocados dentro de recipientes plásticos maiores e estes contendo vermiculita como substrato de pupação e lacrado com tecido do tipo escaline (náilon) e presos por elástico (**Figura 4**).



**Figura 4** - Recipiente com substrato de pupação e recipiente com dieta e postura obtidas na colônia de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758).

Fonte: Acervo do LEMEF.

### 3.3 Triagem das pupas

As larvas maduras que estavam em processo de pupariação foram triadas para realização do experimento com auxílio de pinça e pincel (**Figura 5**). Nas primeiras 24 horas foram coletadas 100 pupas, sendo 20 para zero hora e posteriormente a cada 3 horas foram coletadas 10 pupas (3; 6; 9; 12; 15; 18; 21 e 24 horas), respectivamente. Após estas 24 horas, 10 pupas foram coletas a cada 6 horas (30; 36; 42; 48; 54; 60; 66; 72; 78; 84; 90; 96; 102; 108; 114; 120; 126; 132; 138 e 144 horas), respectivamente, o último horário foi definido com a emergência dos adultos, totalizando 300 pupas para realização de todo experimento. Estas pupas foram mortas em água quente na temperatura de  $70 \pm 5$  °C de acordo o horário de coleta; as mesmas foram fixadas em solução de Carnoy por 48h e após em ácido fórmico 5% por mais 48h; em seguida foram mantidas em etanol 70% até a dissecação.

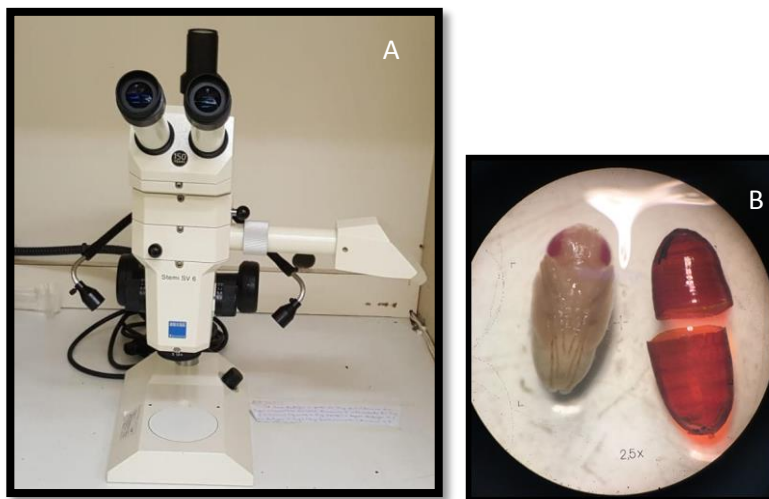


**Figura 5** - Triagem das pupas de *Musca domestica*.

Fonte: Acervo do LEMEF.

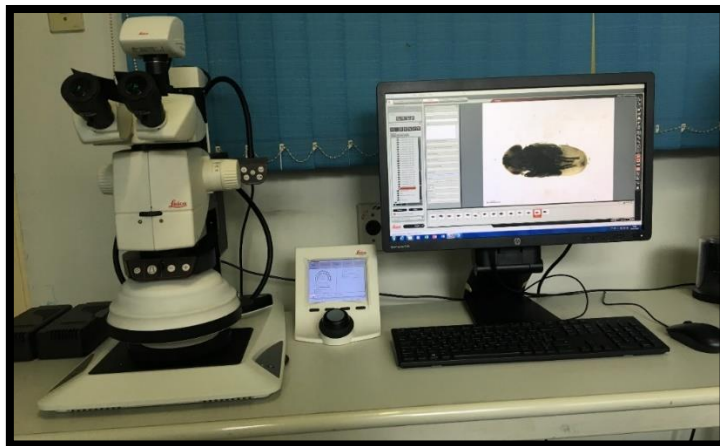
### 3.4 Análises das pupas

A dissecação e observação das pupas foi realizada com auxílio de um microscópio estereoscópico (**Figura 6AB**) e as fotografias foram geradas em microscópio estereoscópico (lupa) Leica M205c (**Figura 7**), posteriormente editadas e diagramadas no programa Adobe Photoshop CS6.



**Figura 6** – **A:** Microscópio estereoscópico presente no Laboratório de Entomologia Médica e Forense (LEMEF)  
**B:** pupa e pupário de *Musca domestica* dissecado.

Fonte: Acervo do LEMEF.



**Figura 7** - Microscópio estereoscópico Leica M205c acoplada a uma câmera fotográfica digital e ao computador localizado na Coleção Malacológica do Instituto Oswaldo Cruz (CMIOC).

Fonte: Acervo do LEMEF.

## 4 RESULTADOS

O desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) foi caracterizado sob a temperatura de  $27 \pm 1$  °C, com algumas larvas cessando a mobilidade ainda na dieta, reduzindo o tamanho do último instar larvar, enquanto outras abandonaram a dieta para o substrato de pupação (vermiculita). Ambas foram triadas e separadas, sendo assim possível estabelecer as dez (10) fases e evento do desenvolvimento durante os seis (6) dias deste processo: pupariação, pré-pupa, pupa criptocefálica anterior, pupa criptocefálica posterior, pupa fanerocefálica, apólise pupa-adulto, olhos transparentes, olhos rosados, olhos vermelhos e emergência do adulto (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Número amostral de pupa (N), valores mínimos e máximos do intervalo de variação (IV), tempo médio da duração em horas e desvio padrão de cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10\%$  UR e 12 horas de fotofase, em laboratório

<b>FASE / EVENTO</b>	<b>N</b>	<b>IV</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Pupariação</b>	10	0	-	-
<b>Pré-Pupa</b>	38	3-9	5,79	1,54
<b>Pupa Criptocefálica Anterior</b>	12	9-21	13,71	3,47
<b>Pupa Criptocefálica Posterior</b>	17	15-24	18,35	2,98
<b>Pupa Fanerocefálica</b>	94	21-84	50,64	18,21
<b>Apólise Pupa-Adulto</b>	28	84-96	90,43	4,88
<b>Olhos transparentes</b>	20	84-90	87,00	3,08
<b>Olhos rosados</b>	15	96-102	98,80	3,10
<b>Olhos vermelhos</b>	75	96-144	124,24	13,44
<b>Emergência</b>	-	144	-	-

### **Descrição das alterações morfológicas relacionadas ao intervalo de tempo do desenvolvimento intrapuparial.**

- 0 hora com coloração esbranquiçada bastante similar ao último instar larvar. Na região ântero-ventral por transparência é possível observar a forma de gancho da mandíbula do esqueleto cefalofaríngeo com coloração escura, sendo difícil de dissecar, pois a cutícula estava aderida ao espécime e ao pupário hialino que ainda estava em formação. Esta é a fase de **pupariação (Fig. 8A)** que antecede o instar de pré-pupa do estágio de pupa.
- 3h-9 horas na região ântero-ventral já se observa o início da projeção em forma de gancho da mandíbula de coloração preta com 3 horas (**Fig. 8B**), ainda é esbranquiçada em 6 horas, com uma redução no tamanho, assumindo a forma de barril, e na transparência comparada aos primeiros momentos, principalmente nas extremidades. Nesse intervalo de tempo observamos a fase de **pré-pupa**.
- 9-21 horas onde ocorre o início da alteração na coloração laranja-amarelado (âmbar) em algumas regiões e também o início do evento de **apólise-larva-pupa** com 12 horas, no qual a epiderme começa a se separar da antiga cutícula e secretar uma nova cutícula, fazendo com que a pupa não permaneça aderida ao pupário. Podemos observar neste intervalo a fase de **pupa criptocefálica anterior** iniciando a formação de pernas e asas (apêndices torácicos), o surgimento dos sifões respiratórios com coloração castanho claro na região ântero-ventral (**Fig. 8C**), enquanto que na fase **pupa criptocefálica posterior** com 21 horas os apêndices torácicos estão mais desenvolvidos, e inicia-se o deslocamento dos sifões respiratórios na região ântero-ventral (**Fig. 8D**).
- 24 horas observa-se claramente a finalização do evento de apólise larva-pupa, o estágio pupa que está em desenvolvimento dentro do pupário é o de instar de pupa diferenciando-se completamente da fase de pré-pupa, com a evaginação da cabeça, sendo possível distinguir a localização dos olhos, os sifões respiratórios anteriores na região altero-dorsalmente na base cabeça e a tagmatização do corpo (cabeça, tórax e abdome). Na região ventral observar-se as pernas e as asas bem evidenciadas e o surgimento de uma massa ainda não definida na região do aparelho bucal, com o início

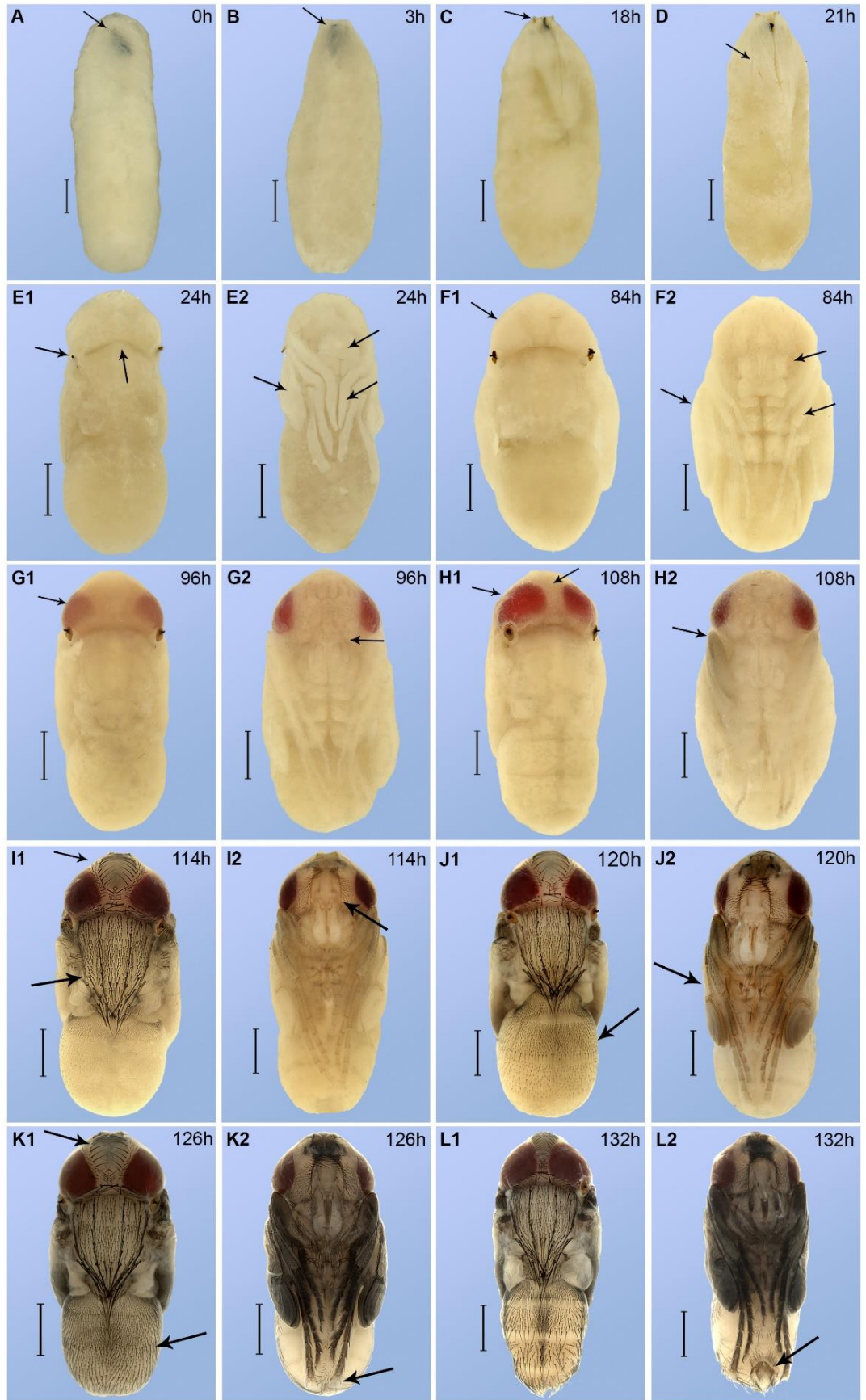
da formação da labela, caracterizando esta fase como **pupa fanerocefálica (Fig. 8E1, E2)**.

- 84 horas este momento é marcado pelos **olhos transparentes** e espiráculos respiratórios (sifões) modificados, com o início do evento de **apólise pupa-adulto**, onde ocorre o desenvolvimento do pedicelo, labro e labela, podendo ser qualificada como pupa adéctica (mandíbulas imóveis e aderidas à cabeça) e exarata (apêndices torácicos não mais fixados ao corpo, assemelhando-se ao adulto), com prolongamento das asas e pernas já apresentando segmentos (**Fig. 8F1, F2**).
- 96 horas fase de **olhos rosados**, com desenvolvimento do pedicelo, flagelo, clipeo, palpo, labro e labela (**Fig. 10A**). Neste momento finalizada a apólise pupa-adulto, momento na qual onde foi secretada uma nova cutícula, mas que se mantém anexo à cutícula anterior, caracterizando a condição de **adulto farado (Fig. 8G1, G2)**.
- 108 horas apresenta **olhos vermelhos**, sendo possível observar a posição dos ocelos, a segmentação do abdome (**Fig. 8H1**) e o início da coloração das pernas (**Fig. 8H2**). Em 114 horas é possível visualizar maiores modificações como a pigmentação da cabeça, olhos e antenas, apresentando cerdas frontais, ocelos transparentes em formação triangular desenvolvidos na região dorso-central e tórax, também pigmentado, contendo cerdas acrosticais, dorsocentrais, escutelar, basal, lateral e apical (**Fig. 8I1**), com as nervuras das asas começando a ser formadas, e aparelho bucal bem desenvolvido (**Fig. I2**).
- 120 horas apresenta o desenvolvimento da antena, arista, labro com coloração amarelada e palpo com cerdas (**Fig. 10B**), tórax com cerda escutelar pré-apical e as demais com maior pigmentação, cerdas presentes também no abdome, asas com a nervura  $M_{1+2}$  formando uma angulosidade em cotovelo (**Fig. 8J1, J2**). Em 126 horas flagelo com a coloração castanho-escuro, antenas negras, arista plumosa e cerdas dos palpos escurecidas (**Fig. 10C**), cabeça, tórax e apêndices torácicos escurecendo, com

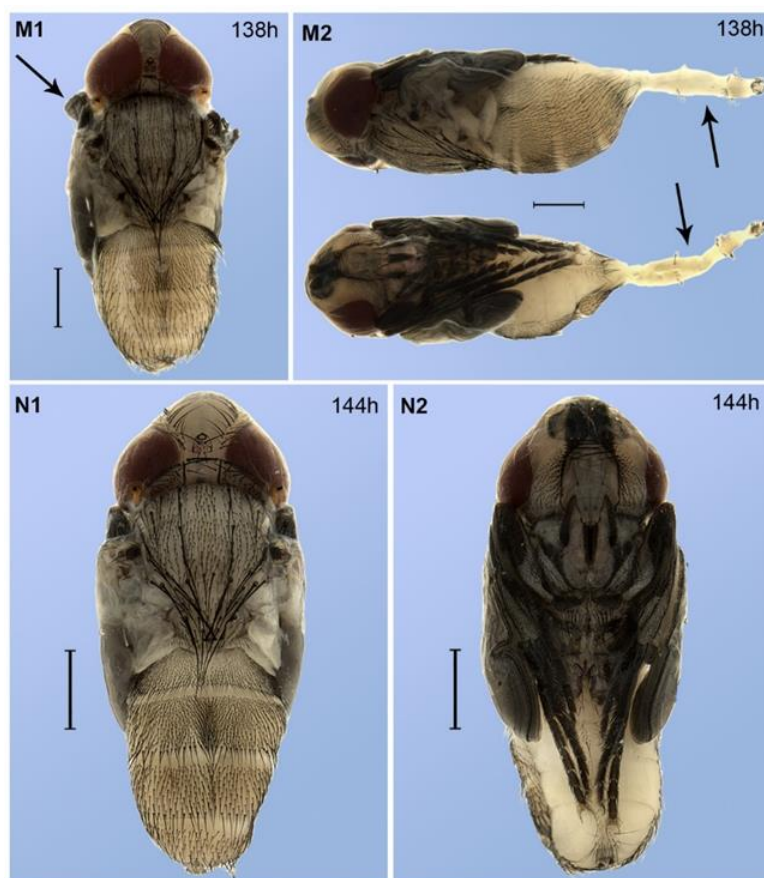
cerdas abdominais completas (**Fig. 8K1**) e presença de garras no último segmento do tarso (**Fig. 8K2**).

- 132 horas com os últimos segmentos abdominais modificados, demonstrando finalização da maturação sexual (**Fig. 8L1, L2**).
- 138 horas o imago está totalmente formado com o tórax é acinzentado e com quatro faixas longitudinais no mesonoto apresentando tonalidade preta, sendo possível visualizar algumas manchas cinza no abdome claro. Dimorfismo sexual com olhos separados (dicópticos) no macho (**Fig. 9M1**) e em alguns espécimes observou-se no final do abdome da fêmea um segmento encaixado dentro do outro, formando um ovipositor telescópico, quando distendido (**Fig. 9M2**), apresentando também olhos separados (dicópticos), porém nas fêmeas há uma maior separação (**Fig. 9N1**). Em 144 horas é possível observar esse dimorfismo sexual desde a sua pigmentação, tonalidade no palpo, labro e cerdas frontais (**Fig. 10D**), ocorrendo nesse horário a **emergência** do imago (**Fig. 9N1, N2**).

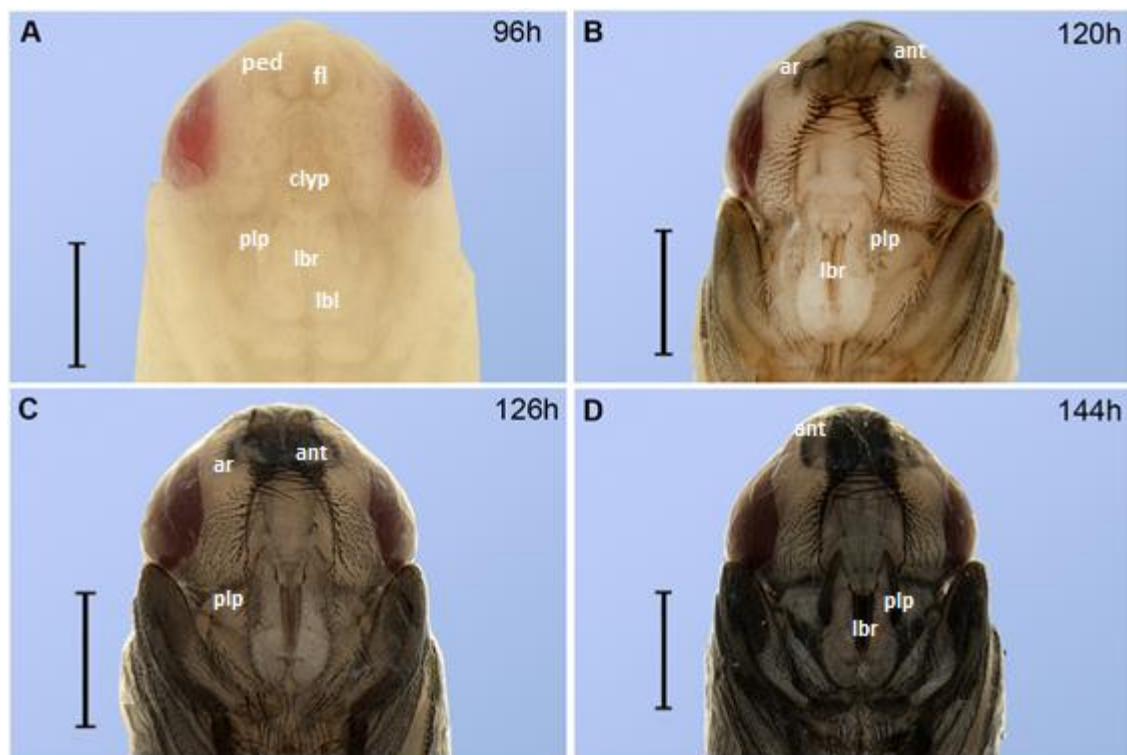




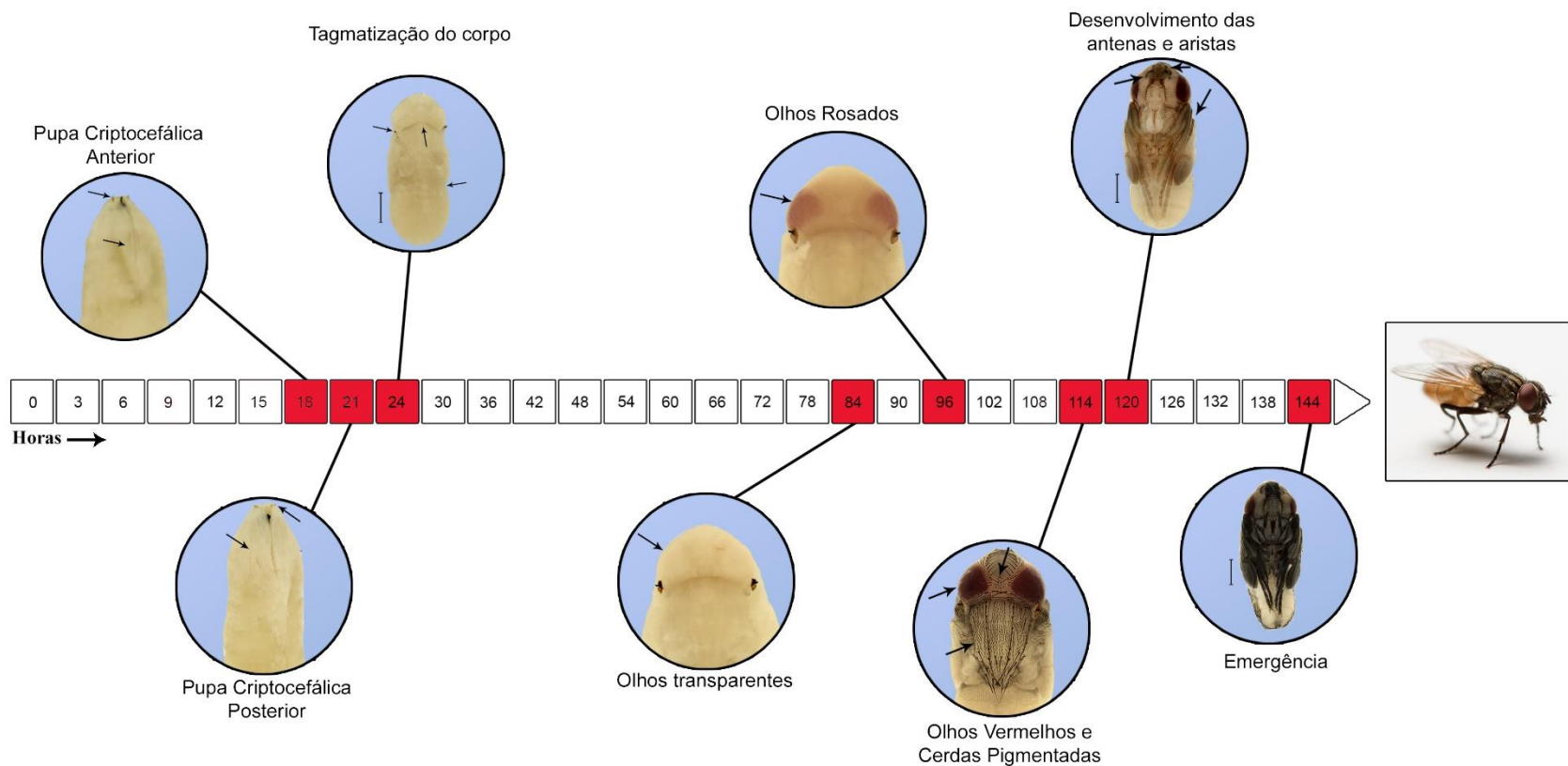
**Figura 8** –Desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10\%$  UR e 12 horas de fotofase, em laboratório. Escala de 1 mm **vista ventral**: (A) pupa de 0h forma de gancho da mandíbula com coloração escura; (B) 3h início da projeção em forma de gancho da mandíbula; (C) 18h pupa criptocefálica anterior iniciando, apêndices torácicos em formação e sífões respiratórios; (D) criptocefálica posterior com 21h os apêndices torácicos mais desenvolvidos; **vista dorsal e ventral**: (E1) 24h evaginação da cabeça, sífões respiratórios anteriores na região ântero-dorsal na cabeça e a tagmatização do corpo, (E2) pernas, asas e aparelho bucal; (F1) 84h olhos transparentes, (F2) aparelho bucal, alongamento das asas e pernas com segmentos; 96h (G1) olhos rosados, (G2) desenvolvimento das peças bucais; 108h (H1) olhos vermelhos, posição dos ocelos e, a segmentação do abdome, (H2) início da coloração das pernas; 114h (I1) cerdas frontais, ocelos em formação triangular e tórax pigmentado com cerdas sensoriais, (I2) aparelho bucal; 120h (J1) cerdas no abdome, (J2) asas com a nervura  $M_{1+2}$  formam uma angulosidade em cotovelo; 126h (K1) cabeça e tórax e apêndices torácicos escurecem, cerdas abdominais (k2), garras no último segmento do tarso; 132h (L1 L2) últimos segmentos abdominais modificados.



**Figura 9** – Desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10\%$  UR e 12 h de fotofase. Escala de 1 mm **vista dorsal e ventral**: 138h (M1) tórax acinzentado, (M2) ovipositor telescopado (distendido) na porção final do abdome na fêmea.



**Figura 10** – Desenvolvimento intrapuparial da cabeça em vista ventral de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10\%$  UR e 12h de fotofase. Escala de 1 mm (A) 96h desenvolvimento do pedicelo, flagelo, cípeo, palpo, labro e labela; (B) 120h desenvolvimento da antena, arista, labro com coloração amarelada e palpo com cerdas; (C) 126h flagelo castanho-escuro, antenas negras, arista plumosa e cerdas dos palpos escurecidas ; (D) 144h tonalidade preta no palpo, e labro. Abreviaturas: ar-arista, clyp-clípeo, fl- flagelo ped-pedicelo, lbr-labro, lbl-labela, plp-palpo,



**Figura 11** – Linha do tempo do desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* à  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10\%$  UR e 12 h de fotofase, em laboratório, com as principais características relacionadas com o tempo de da idade pupal: **18 h** (9-21 h) pupa criptocefálica anterior iniciando a formação de pernas e asas (apêndices torácicos), deslocamento dos sífões respiratórios; **21 h** (15-24 h) pupa criptocefálica posterior os apêndices torácicos estão mais desenvolvidos; **24 h** (21-84h) tagmatização do corpo; **84 h** olhos transparentes; **96 h** olhos rosados; **114 h** olhos vermelhos, ocelos transparentes em formação triangular e pigmentação das cerdas; **120 h** antenas negras, aristas plumosas e asas com a nervura  $M_{1+2}$  formando uma angulosidade em cotovelo; **144 h** emergência do imago.

## 5 DISCUSSÃO

No Brasil, as famílias que apresentam relevância forense são Calliphoridae, Sarcophagidae, Stratiomyidae, Muscidae e Fanniidae (OLIVEIRA-COSTA; URURAHY-RODRIGUES, 2013; PUJOL-LUZ; ARANTES; CONSTANTINO, 2008) sendo doze estudos de desenvolvimento intrapuparial sobre onze espécies realizados no período de 2012 a 2018. Fraenkel e Bhaskaran (1973) realizaram o estudo do desenvolvimento intrapuparial de *Musca domestica* sob a temperatura de 30 °C, com a emergência dos adultos ocorrendo em 110 horas, (4,75 dias), utilizando cortes histológicos, entretanto, sem ressaltar características morfológicas externas. O presente estudo apresentou o desenvolvimento completo com duração de 144 horas na temperatura de  $27 \pm 1$  °C, com características morfológicas externas descritas durante este período de metamorfose pupal.

Martín-Vega et al. (2016) estipularam as apólises como um evento, que foi o critério utilizado neste estudo, Fraenkel e Bhaskaran (1973) estabeleceram os processos como as apólises larva-pupa e pupa-adulto que levam às fases, fazendo assim partes dos processos.

Na **Tabela 2**, pode-se observar o desenvolvimento intrapuparial de espécies com relevância forense no Brasil das famílias Muscidae e Calliphoridae, para comparações das fases utilizadas nos estudos destacados. No presente estudo, em Silva (2018) e Duarte, 2018 foi utilizada a fase de pré-pupa, os demais estudos apontados na tabela 2 destacaram as fases de pupa que ocorrem após a fase de pré-pupa.

Pupa criptocefálica anterior e posterior foram fases utilizadas no presente estudo; por Fraenkel e Bhaskaran (1973) e Silva (2018); os demais estudos estabeleceram a fase de pupa criptocefálica com 1 (um) intervalo de variação. A maioria dos estudos da **Tabela 2**, como no presente estudo, estipularam em suas tabelas o intervalo de variação da fase de pupa fanerocefálica, porém no estudo de Barros-Cordeiro et al. (2014) não a estabeleceu. O mesmo ocorre com o evento de apólise pupa-adulto; que também não é apontado por Barros-Cordeiro et al. (2014) e Barros-Cordeiro et al. (2016), no presente estudo é caracterizado, assim como nos demais.

A característica da pigmentação dos olhos para fracionar o adulto farado foi utilizada no presente estudo com as fases olhos transparentes, olhos rosados e olhos vermelhos. No presente estudo a caracterização de olhos transparentes dá-se quando a formação do mesmo está completa

que é no início da apólise pupa-adulto. Fraenkel e Bhaskaran, (1973) caracterizam a fase de adulto farado incluindo-o no processo de apólise pupa-adulto. Flissak e Moura (2018) e Duarte (2018) utilizam somente a fase de adulto farado (**Tabela 2**). As fases destacadas no presente estudo foram para demarcar com maior precisão as metamorfoses ocorridas em cada intervalo de tempo, sendo este o critério utilizado em cada fase do desenvolvimento.

Duarte (2018) analisou o desenvolvimento intrapuparial de *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) na temperatura de  $27 \pm 1$  °C com emergência do imago ocorrendo em 174 horas (tabela 2), foi a única espécie da família Muscidae analisada com a mesma técnica de estudo do desenvolvimento intrapuparial aqui aplicada. Comparando temperatura com o tempo de desenvolvimento das demais espécies Silva (2018) analisou *Hemilucilia semidiaphana* (Rondani, 1850) da família Calliphoridae nas temperaturas de 20 e 25 °C com emergência do imago em 144 horas e 192 horas respectivamente, sendo a análise sob a temperatura de 25 °C a única que se desenvolveu em 144 horas (**Tabela 2**), assim como *M. domestica*, no presente estudo sendo essa que com  $27 \pm 1$  °C.

Fases do desenvolvimento e características morfológicas externas quando comparadas com a espécie *O. aenescens*, encontramos o mesmo intervalo de tempo na fase de pré-pupa, enquanto as demais fases mantiveram-se com algumas variações, uma vez que *M. domestica* apresentou o desenvolvimento mais acelerado, como a fase da pupa fanerocefálica iniciando-se em 24 horas, enquanto que para *O. aenescens* ocorreu a partir de 30 horas.

Comparando as fases observadas por Fraenkel e Bhaskaran (1973) por causa da variação na temperatura elas somente se aproximam, mas o desenvolvimento de *M. domestica* em seu estudo encontra-se sempre mais acelerado, possivelmente por ocorrer em uma temperatura maior. A exemplo desse fato foi a fase de pupa criptocefálica posterior apresentando o horário final do intervalo de variação com nove (09) horas, sendo o mesmo horário do início do intervalo de variação da fase pupa criptocefálica anterior do presente estudo.

**Tabela 2** - Fases e evento do desenvolvimento intrapuparial comparadas de diferentes espécies e temperaturas, dados retirados das tabelas realizadas dos respectivos autores

DESENVOLVIMENTO INTRAPUPARIAL (Intervalo de variação h)										
Espécie / Temperatura	Pré-Pupa	Pupa Criptocefálica Anterior	Pupa Criptocefálica Posterior	Pupa Fanerocefálica	Apólise Pupa-Adulto	Olhos transparentes	Olhos Rosados	Olhos vermelhos	Emergência	Referência
<i>Musca domestica</i> 27 °C	3-9	9-21	15-24	21-84	84-96	84-90	96-102	96-144	144	Presente estudo
<i>Musca domestica</i> 30 °C	-	4	6-9	16-18	28-30*	-	-	-	96-110	Fraenkel & Bhaskaran (1973)
<i>Hermetia illucens</i> 27 °C	-	6-18	-	-	-	21-80	96-176	144-192***	-	Barros-Cordeiro et al. (2014)
<i>Cochliomyia macellaria</i> 23 °C	-	6-42	12-78	-	15-45**	78-90	90-120	241	-	Barros-Cordeiro et al. (2016)
<i>Sarconesia chlorogaster</i> 25 °C	-	16-24	32-88	96-104	-	112-326*	-	-	326	Fliessak & Moura (2018)
<i>Hemilucilia semidiaphana</i> 25 °C	3-12	12-24	15-30	24-42	30-48	48-90	90-102	96-138	144	Silva (2018)
<i>Ophyra aenescens</i> 27 °C	3-9	15-24	30-108	78-96	-	114-174*	-	-	174	Duarte (2018)

\*Utilizado somente fase de adulto farado sem destacar cor dos olhos.

\*\*Autor utilizou olhos amarelos como mais uma fase.

\*\*\*Emergência do imago na fase olhos vermelhos.



Características morfológicas externas como, antenas negras, arista plumosa e asas com a nervura  $M_{1+2}$  formando uma angulosidade em cotovelo marcam o desenvolvimento intrapuparial de *M. domestica* sendo possível a identificação, outras características marcantes como as quatro faixas longitudinais no mesonoto com a tonalidade preta, o tórax acinzentado, manchas cinzas no abdome claro são possíveis de serem observadas, porém é importante ressaltar que características ligadas a pigmentação ficam mais evidenciadas após a emergência do adulto.

Considerando a aplicabilidade para auxílio na estimativa do IPMmín. é necessário maior variabilidade quanto a temperatura para que se possa ter uma ferramenta adequada a ser utilizada, sendo importante a continuidade destes estudos em diferentes temperaturas.

Esses dados se tornam extremamente úteis e acessíveis sem carecer do auxílio de técnicas de alto custo, quanto a aplicabilidade para determinar a idade da pupa dando maior solidez ao resultado do IPMmín.

Temos uma rica entomofauna forense em diferentes regiões e é significativo o aprofundamento para o enriquecimento da taxonomia e concomitantemente para a entomologia forense, sendo válido ressaltar que há um crescente nos últimos anos no estudo do desenvolvimento intrapuparial, porém ainda há um vácuo significativo relacionado ao mesmo.

## 6 CONCLUSÕES

- As estruturas externas do desenvolvimento intrapuparial *Musca domestica* foram reconhecidas e descritas morfológicamente, suas fases e eventos caracterizados estimando a idade pupal, sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase.
- Estruturas morfológicas foram observadas, com base no surgimento; definição e pigmentação de tais estruturas, sob temperatura de  $27 \pm 1$  °C,  $60 \pm 10$  % de umidade relativa e 12 h de fotofase e pode-se ressaltar 46 características durante as 144 h de desenvolvimento, as características fundamentais para identificação da espécie foram apontadas.
- Diante disto, dispomos em nosso estudo dados sólidos com intuito de fornecer subsídio para entomologia forense, principalmente, para auxiliar entomólogos, peritos forenses e/ou técnicos no cálculo e estimativa do IPMmín, uma vez que *M. domestica* apresenta interesse forense por ser encontrada em corpos em estado de decomposição.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARNES, R S.K.; CALOW, P.; OLIVE, P.J.W.; GOLDING, D.W.; SPICER, J.I. **Os Invertebrados: uma nova síntese**. 2ª Ed, São Paulo: Atheneu, 2008.

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*, v. 14, p. 10, 2014.

BORROR, D.J.; DELONG, D.M. **Introduction to the Study of Insects**. In: **Estudo Dos Insetos**. 7ª Ed, Cengage Learning. [s.l: s.n.].

BRAVO, F.; CALOR, A.R. **Conhecendo os artrópodes do Semiárido**. Méteis Produção Editorial, 1.ed. – São Paulo, 192 p 2016.

BROWN, K.; THORNE, A.; HARVEY, M. **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, 2015.

CAFARCHIA, C.; LIA R.P.; ROMITO D.; OTRANTO D. **Competence of the housefly, *Musca domestica*, as a vector of *Microsporium canis* under experimental conditions**. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 23, n. 1, p. 21–25, 2009.

CARVALHO, C. J. B. DE; MOURA, M. O.; RIBEIRO, P. B. **Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil**. *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 46, n. 2, p. 107–144, 2002.

CARVALHO, L.M.L.; THYSSEN P.J.; GOFF M.L., LINHARES A.X. **Observations on the succession patterns of necrophagous insects on a pig carcass in an urban area of Southeastern Brazil**. *Agg Int J Forens Med Toxicol* p. 33–39, 2004.

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

COURI, M.S.; CARVALHO, C.J.B. **Diptera Muscidae do estado do Rio de Janeiro (Brasil)**. *Biota Neotropica*, v. 5, n. 2, p. 205–222, 2005.

COURTNEY, G.W.; MERRITT, R.W. **Aquatic Diptera. Part one. Larvae of aquatic Diptera**, p. 687-722. In: *An Introduction to the Aquatic Insects of North America* (4a ed). Kendall/Hunt Publishing Co. Dubuque Iowa, 1158p 2008.

DUARTE, M.L. **Desenvolvimento Intrapuparial de *Ophyra aenescens* (Wiedemann, 1830) (Diptera, Muscidae), sob condições de laboratório**. Monografia (Especialização) Entomologia Médica, pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 2018.

FERREIRA V.D.S.B.; BARCELLOS I.D.S.; CARRAMASCHI I.N.; SANTOS-MALLET J.R.; QUEIROZ M.M.C., ZAHNER V. **Larvicidal activity and effects on post embryonic development of laboratory reared *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae), treated with *Brevibacillus laterosporus* (Laubach) spore suspensions**. *Journal of Invertebrate Pathology*, v 137, p 54-57, 2016

FRAENKEL, G.; BHASKARAN, G. **Pupariation and Pupation in Cyclorrhaphous Flies (Diptera): Terminology and Interpretation.** *Annals of the Entomological Society of America*, v. 66, n. 2, p. 418–422, 1973.

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*, v. 53, n. 6, p. 1249–1251, nov. 2016.

MELLO-PATIU, C. **Apostila do Módulo de Entomologia Geral: Parte I**, 2016.

OLIVEIRA-COSTA, J.; AZEVEDO, A.P. **Entomologia forense: quando os insetos são vestígios.** Campinas, SP: Millennium, 2011.

OLIVEIRA-COSTA, J.; URURAHY-RODRIGUES, A. (EDS.). **Insetos “peritos” entomologia forense no Brasil.** Campinas/SP: Millenium Editora, 2013.

PUJOL-LUZ, J.R.; ARANTES, L.C.; CONSTANTINO, R. **Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008).** *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 52, n. 4, p. 485–492, 2008.

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.** *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 8, n. 1–4, p. 75–84, 1991.

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*, v. 220, n. 1–3, p. 251–264, 10 jul. 2012.

SCAGLIA, J.A.P. **Manual de Entomologia Forense** - Editora JH Mizuno. Disponível em: <<http://www.editorajhmizuno.com.br/direito/medicina-legal/manual-de-entomologia-forense>>, 2018.

SERRA FREIRE, N.N.M.; MELLO, R.P. **Entomologia e Acarologia na Medicina Veterinária.** 1ª Edição ed. [s.l.]. EDITORA, 2006. v. 1

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.

TARONE, A.M.; JENNINGS, K.C.; FORAN, D.R. **Aging blow fly eggs using gene expression: a feasibility study.** *Journal of Forensic Sciences*, v. 52, n. 6, p. 1350–1354, 2007.

ZEHNER, R.; AMENDT, J.; BOEHME, P. **Gene expression analysis as a tool for age estimation of blowfly pupae.** *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 2, n. 1, p. 292–293, 2009.