



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Bianca Mellissa Figueiredo

**Estudo do desenvolvimento intrapuparial de *Chrysomya megacephala*
(Diptera: Calliphoridae)**

Florianópolis
2023

Bianca Mellissa Figueiredo

**Estudo do desenvolvimento intrapuparial de *Chrysomya megacephala*
(Diptera: Calliphoridae)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Carlos José de Carvalho Pinto, Dr.

Florianópolis

2023

Figueiredo, Bianca Mellissa

Estudo do desenvolvimento intrapuparial de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) / Bianca Mellissa Figueiredo ; orientador, Carlos José de Carvalho Pinto, 2023.
47 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Entomologia forense. 3. Pupa. 4. Intervalo pós-morte. I. Carvalho Pinto, Carlos José de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Bianca Mellissa Figueiredo

**Estudo do desenvolvimento intrapuparial de *Chrysomya megacephala* (Diptera:
Calliphoridae)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Ciências Biológicas e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 30 de novembro de 2023.

Prof^ª. Daniela Cristina de Toni, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca examinadora

Prof. Carlos José de Carvalho Pinto, Dr.
Orientador

Prof. Luiz Carlos de Pinho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Ana Letícia Trivia, Ma.

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha “mamis”, Terciana, e ao meu “papis”, Luis Henrique, que tanto me apoiaram e incentivaram durante essa jornada. Vocês são minha rocha, meu conforto, meu lar. Obrigada por me permitirem a dedicação exclusiva à graduação nesses quatro anos e meio, por se fazerem presentes – mesmo que de longe –, por fazerem o possível e o impossível por mim, pois sei que, sem vocês, eu não estaria aqui. Amo vocês, eternamente!

Ao meu namorado e melhor amigo há 7 anos, João Vitor, que é sinônimo de companhia, apoio, encorajamento e amor, que foi meu suporte emocional. Obrigada por aguentar o cheiro ruim do meu TCC dentro de casa, por me acompanhar no laboratório durante o final de semana, por se preocupar tanto comigo todos os dias e por estar sempre ao meu lado. Eu te amo muito, companheiro de vida!

Às minhas amigas “do ensino médio para a vida”, Amanda, Andreyana, Luana e Rúbia, que são o verdadeiro significado de amizade – não importa quanto tempo passe, nada muda. Obrigada, Amanda e Dre, por serem companhia e ombro amigo na UFSC. Obrigada, Lu e Rubinha, pelo carinho, incentivo e torcida à distância.

Aos amigos que a faculdade me apresentou e vou levar para a vida, Adriane, Gabriela e Gustavo, que compartilharam comigo essa experiência, do começo ao fim. Vocês, com certeza, tornaram esses últimos anos mais especiais e divertidos. Em especial, obrigada, Adri e Gabi, por compartilharem não só os tensos momentos de surto pré-prova e de exaustão, mas também as deliciosas fofquinhas e noites das meninas. Vocês foram como irmãs para mim!

Aos demais amigos e colegas, da vida e da faculdade – inclusive do laboratório –, que estiveram presentes em algum momento ao longo desses quatro anos e meio, que ouviram qualquer desabafo meu, que ofereceram conselhos ou que tornaram meu dia um pouquinho melhor e mais alegre.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto – ou apenas “prof” –, que executou com maestria o papel de orientador, oferecendo ajuda e suporte em todas as etapas do TCC, desde a escolha do tema, até a execução do projeto, estando sempre presente quando necessário. O senhor é um exemplo a ser seguido, tanto como profissional, quanto como pessoa. Obrigada pela dedicação!

Por fim, à Universidade Federal de Santa Catarina, que me proporcionou, de forma gratuita e com qualidade, uma orgulhosa formação na área que amo!

RESUMO

Chrysomya megacephala é uma das espécies mais relevantes para a entomologia forense médico-legal, pois é capaz de localizar e colonizar um cadáver rapidamente, podendo ser utilizada para a estimativa do intervalo pós-morte (IPM). Dentre os estágios de desenvolvimento da espécie, apenas larvas e pupas são utilizadas na estimativa do IPM. O estágio de pupa, que pode ser denominado período intrapuparial, corresponde a mais de 50% do tempo total de desenvolvimento da espécie, mas é pouco utilizado na estimativa do IPM, pois o imaturo fica envolto por um pupário praticamente inalterado durante todo o tempo. Para superar esta barreira da entomologia forense, já existem estudos quanto ao desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala*, que analisam as mudanças morfológicas do imaturo e as relacionam com intervalos de tempo, porém não há estudos locais para populações da espécie na região de Florianópolis-SC. Assim, este estudo teve como objetivo determinar o intervalo de tempo correspondente a cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala*, com base em amostra local de Florianópolis-SC. Para isso, foi estabelecida uma colônia a partir de adultos de *C. megacephala* coletados em Florianópolis-SC, da qual foram isolados os exemplares imaturos para a amostragem do desenvolvimento intrapuparial, sob temperatura de $19,2 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 5\%$ de UR e fotoperíodo natural. Após o início da pupariação, foram coletados 10 exemplares em intervalos de 3 horas nas primeiras 24 horas, e depois em intervalos de 6 horas até a emergência. Os exemplares foram eutanasiados em água quente, fixados em solução AFA e preservados em álcool 70% até a etapa de dissecação para remoção do pupário, com posterior análise sob estereomicroscópio e registro fotográfico. Foram identificadas 4 fases, divididas em 12 subfases para o desenvolvimento intrapuparial da espécie, nomeadas de: pré-pupa, pupa criptocefálica (inicial, média e tardia), pupa fanerocefálica e adulto farado (AF1, AF2, AF3, AF4, AF5, AF6 e AF7). As subfases puderam ser identificadas a partir de 35 caracteres morfológicos definidos no estudo, incluindo estruturas como esqueleto céfalo-faríngeo, cornos respiratórios, apêndices torácicos, antenas, olhos e aparelho bucal. Para cada subfase foi atribuído um intervalo de tempo, de acordo com a ocorrência dos exemplares em cada coleta, contemplado entre 0 horas (pupariação) e 156 horas (emergência). Os resultados foram discrepantes de estudos provenientes de outras regiões, o que demonstra a importância deste estudo para que as pupas da espécie *C. megacephala* possam ser utilizadas em investigações criminais, na região de Florianópolis-SC, para auxiliar na estimativa do IPM de um cadáver encontrado.

Palavras-chave: entomologia forense; pupa; intervalo pós-morte.

ABSTRACT

Chrysomya megacephala is one of the most relevant species for medico-legal forensic entomology, because it is capable to locate and colonize a corpse quickly, so it can be used to estimate the post-mortem interval (PMI). Among the developmental stages of the species, only larvae and pupae are used to estimate the PMI. The pupal stage, which can be called intrapuparial period, corresponds to more than 50% of the species' total development time, but it is underused to estimate the PMI, as the immature remains surrounded by a practically unchanged puparium throughout the entire time. To overcome this barrier of the forensic entomology, there are already studies on the intrapuparial development of *C. megacephala*, which analyze the morphological changes of the immature and relate them to time intervals, however there are no local studies for populations of the species in the region of Florianópolis-SC. Therefore, this study aimed to determine the time interval corresponding to each phase of the intrapuparial development of *C. megacephala*, based on a local sample from Florianópolis-SC. To this end, a colony was established from adults of *C. megacephala* collected in Florianópolis-SC, from which immature specimens were isolated for intrapuparial development sampling, at a temperature of $19,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 5\%$ RH and natural photoperiod. After the pupariation began, 10 specimens were collected at 3-hour intervals in the first 24 hours, and then at 6-hour intervals until emergence. The specimens were killed in hot water, fixed in AFA solution and preserved in 70% alcohol until the dissection step to remove the puparium, with subsequent analysis under a stereomicroscope and photographic register. 4 phases were identified, being divided into 12 subphases for the intrapuparial development of the species, named by: prepupa, cryptocephalic pupa (early, middle and late), phanerocephalic pupa and pharate adult (AF1, AF2, AF3, AF4, AF5, AF6 and AF7). The subphases could be identified based on 35 morphological characters defined in the study, including structures such as the cephalopharyngeal skeleton, respiratory horns, thoracic appendages, antennae, eyes and mouthparts. For each subphase, a time interval was assigned, according to the occurrence of specimens in each collection, ranging from 0 hours (pupariation) to 156 hours (emergence). The results differed from studies from other regions, which demonstrates the importance of this study so that *C. megacephala* pupae can be used in criminal investigations, in the region of Florianópolis-SC, to assist in estimating the PMI of a corpse.

Keywords: forensic entomology; pupa; post-mortem interval.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação generalizada do ciclo de vida da ordem Diptera	12
Figura 2 – Pupários de <i>C. megacephala</i> sobre vermiculita, evidenciando a mudança de coloração (escurecimento) do pupário ao longo das horas, da esquerda para a direita	13
Figura 3 – Pupário de <i>C. megacephala</i> , com destaque para as fileiras de espinhos (círculos vermelhos) e para os espiráculos posteriores (círculo azul)	14
Figura 4 – Vista lateral (A), dorsal (B) e frontal de macho (C) e de fêmea (D) de <i>C. megacephala</i>	14
Figura 5 – Gaiola de criação/triagem montada	18
Figura 6 – Moscas acondicionadas nos recipientes plásticos logo após coleta	19
Figura 7 – Caracteres morfológicos (evidenciados pelas setas vermelhas) para a identificação de adultos de <i>C. megacephala</i> conforme a chave dicotômica	20
Figura 8 – Larvas errantes sobre vermiculita na placa de Petri	21
Figura 9 – Pré-pupa sobre vermiculita, logo após início da pupariação	22
Figura 10 – Materiais utilizados no processo de dissecação (bisturi, pinças, agulha e tesouras de ponta fina, respectivamente)	23
Figura 11 – Exemplos de <i>C. megacephala</i> ao longo do período intrapuparial, em vista dorsal (1) e ventral (2), com destaque para alguns caracteres morfológicos, indicados pelas setas vermelhas e azuis	29
Figura 12 – Imagens ampliadas da região cefálica de exemplares de <i>C. megacephala</i> nas subfases de adulto farado AF5, AF6 e AF7, em vista ventral, com destaque para alguns caracteres morfológicos, indicados pelas setas brancas e vermelhas	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 COLETA E TRIAGEM DAS MOSCAS.....	18
3.2 ESTABELECIMENTO E MONITORAMENTO DA COLÔNIA.....	20
3.3 AMOSTRAGEM DURANTE PERÍODO INTRAPUPARIAL.....	22
3.4 DISSECAÇÃO E REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS AMOSTRAS.....	23
3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DO PERÍODO INTRAPUPARIAL E ASSOCIAÇÃO COM O INTERVALO DE TEMPO.....	24
4 RESULTADOS.....	25
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICE A - GUIA DE IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DO PERÍODO INTRAPUPARIAL DE <i>Chrysomya megacephala</i>.....	45

1 INTRODUÇÃO

O termo entomologia, de origem grega, é resultado da união das palavras *entomon* e *logos*, que significam, respectivamente, inseto e estudo. Assim, a entomologia é designada como a ciência que estuda os insetos (Gomes *et al.*, 2010). Os insetos estão agrupados na classe Insecta, considerada a mais bem sucedida e que conta com o maior número de espécies descritas no planeta, representando mais de 60% do total conhecido do reino Animalia, com mais de um milhão de espécies de insetos já nominadas (Zhang, 2011). Entretanto, segundo Stork (2018), novas estimativas indicam um número cinco vezes maior para a verdadeira entomofauna mundial, revelando que, globalmente, devam existir cerca de 5,5 milhões de espécies. Essa enorme e potente classe está alocada dentro de um filo denominado Arthropoda (Stork, 2018).

Uma característica comum aos artrópodes é que estes apresentam o corpo dividido em vários segmentos. Nos insetos, tais segmentos estão agrupados em três grandes unidades distintas – cabeça, tórax e abdome –, denominadas tagmas. Além disso, podem ser facilmente identificados por apresentarem um par de antenas na cabeça e três pares de pernas no tórax, sendo estes seus apêndices locomotores (Gullan; Cranston, 2012). A maioria dos insetos apresenta um tamanho reduzido, algo entre 1 e 10 mm, o que é considerado uma peça-chave para a riqueza da entomofauna, além de uma grande vantagem biológica (Gomes *et al.*, 2010; Gullan; Cranston, 2012). Apesar do tamanho diminuto, os insetos são de grande importância para a natureza, uma vez que apresentam ecologias variadas, podendo interagir de diferentes formas com outros animais e com as plantas (Rafael *et al.*, 2012).

Como os insetos estão presentes não só em ambientes naturais, mas também antrópicos, muitas espécies são relevantes para os seres humanos, podendo causar prejuízos, como destruição de plantações, ou trazer benefícios, como a polinização de plantas (Rafael *et al.*, 2012). As relações e interações entre os insetos e os outros seres vivos são exploradas pela entomologia aplicada, a qual é dividida em subáreas – dentre elas, a entomologia forense (Gomes *et al.*, 2010). Esta é definida como a aplicação do conhecimento acerca dos artrópodes, principalmente insetos, em questões legais, sendo utilizada como uma ferramenta auxiliar nas investigações (Catts; Goff, 1992; Pujol-Luz; Arantes; Constantino, 2008).

A entomologia forense pode contribuir, por exemplo, com a determinação do tempo de infestação pelos insetos em bens, imóveis e produtos alimentícios estocados, além de ser útil em casos criminais (Catts; Goff, 1992). A entomologia forense médico-legal é aquela que aborda estes casos criminais, desde abuso físico, situação de abandono e maus tratos a crianças, tráfico de drogas e acidentes de trânsito, até investigações de morte – seja morte súbita, suicídio ou assassinato (Smith, 1986; Catts; Goff, 1992; Pujol-Luz; Arantes; Constantino, 2008). Dentro das investigações de morte, os insetos encontrados nas cenas de crime podem ser úteis para determinar movimentação de cadáveres, vincular suspeitos com o crime, detectar ingestão de veneno pela vítima, além de possibilitar estimar o período que compreende desde o momento da morte até a descoberta do cadáver – denominado intervalo *postmortem* ou intervalo pós-morte (IPM) –, que é a contribuição mais recorrente (Catts; Goff, 1992; Pujol-Luz; Arantes; Constantino, 2008).

Existem métodos tradicionais para a estimativa do IPM relacionados com os fenômenos cadavéricos de resfriamento do corpo (*algor mortis*), rigidez cadavérica (*rigor mortis*) e aparecimento de manchas hipostáticas (*livor mortis*). Entretanto, tais métodos são considerados menos eficazes quando comparados com o uso de conhecimentos entomológicos, principalmente num período superior a três dias após a morte (Almeida *et al.*, 2010; Thyssen, 2011). Isso se deve, principalmente, ao fato de que, a partir dos métodos tradicionais, quanto maior o intervalo de tempo entre a morte e o encontro do cadáver, menor a acurácia da estimativa do IPM. Assim, a partir de um período de tempo mais longo – cerca de 72 horas –, as evidências entomológicas se tornam as de maior importância para essa estimativa (Amendt *et al.*, 2006).

Os insetos são utilizados para o cálculo da estimativa do IPM por diversos motivos, mas o principal deles é que estes pequenos invertebrados são os primeiros a localizar um cadáver em decomposição, o qual é utilizado como fonte de nutrição pelos adultos e/ou como substrato para oviposição e, conseqüentemente, sustento da prole (Catts; Goff, 1992; Thyssen, 2011). A oviposição pode acontecer horas ou minutos após a morte, o que é uma vantagem para a estimativa do IPM. Além disso, uma variedade de espécies da entomofauna encontra e explora o cadáver em todos os estágios de decomposição, sendo que, ao longo destes estágios, essa entomofauna é alterada, de forma previsível, em uma sequência sucessional de espécies (Catts; Goff, 1992; Almeida *et al.*, 2010).

A estimativa do IPM a partir dos métodos entomológicos depende de um fator principal: o tempo de decomposição do cadáver. Se o cadáver está em estado avançado de decomposição, a estimativa do IPM é baseada na comparação entre a composição da entomofauna encontrada na cena do crime com a sequência sucessional esperada. Este padrão esperado é proveniente de estudos sobre decomposição conduzidos em condições, como habitat e clima, similares ao da cena do crime (Goff, 1993; Amendt *et al.*, 2006). Quando o cadáver é encontrado ainda em estado inicial de decomposição, é feita a estimativa do IPM mínimo com base no tempo de desenvolvimento dos imaturos mais velhos encontrados na cena do crime, sejam estes larvas ou pupas. Assim, é estabelecido o tempo mínimo em que o corpo esteve exposto para que houvesse atividade da entomofauna, principalmente de moscas (Amendt *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2010).

Os cálculos para a estimativa do IPM mínimo são baseados em dados de crescimento conhecidos para a espécie coletada, provenientes de estudos relacionados ao desenvolvimento dos imaturos ao longo do tempo, nas condições ambientais semelhantes às do local em que o corpo foi encontrado (Amendt *et al.*, 2006). Assim, para que a estimativa seja mais precisa, é importante analisar os aspectos morfológicos do espécime, tanto para determinar o estágio de desenvolvimento, quanto para identificar a espécie em questão (Francez; Avila; Dias Filho, 2013). É importante considerar, ainda, que o local em que o corpo é encontrado – ambiente mais aberto ou fechado –, pode influenciar no tempo em que os insetos levam para ter acesso ao cadáver e fazer a oviposição, logo o período de atividade do inseto (PAI) pode não corresponder diretamente ao IPM (Amendt *et al.*, 2006).

O cadáver é um substrato temporário explorado por uma numerosa variedade de artrópodes, que são classificados em quatro categorias ecológicas: acidentais, onívoros, parasitas-predadores e necrófagos. As espécies necrófagas – que se alimentam dos tecidos do cadáver e são representadas pelas ordens Diptera e Coleoptera – constituem o grupo mais importante, dentre as quatro categorias, para a estimativa do IPM (Smith, 1986). Dentro da ordem Diptera, as moscas são o grupo de maior importância forense e constituem os primeiros insetos a encontrar o cadáver. Já na ordem Coleoptera, as famílias Silphidae e Dermestidae são as mais relevantes e ocorrem no corpo entre os estágios intermediários e finais da decomposição (Almeida *et al.*, 2010; Francez; Avila; Dias Filho, 2013).

A ordem Diptera é constituída por mosquitos e moscas, estas de grande importância forense. Uma característica típica de dípteros é que o segundo par de asas é modificado em halteres – ou balancins –, com função de equilíbrio durante o voo (Smith, 1986; Rafael *et al.*, 2012). Além disso, esses insetos são holometábolos, o que significa que sofrem uma mudança abrupta na forma do corpo durante a metamorfose, de modo que, após emergir do ovo, passam por um estágio áptero – sem asas –, que é o estágio de larva e, através de um estágio intermediário (pupa), se transformam em um adulto alado. Assim, seu ciclo de vida (Figura 1) conta com os estágios de ovo, larva, pupa e adulto, que estão sujeitos a explorar diferentes recursos, favorecendo a expansão do grupo (Gullan; Cranston, 2012). O estágio larval é dividido, ainda, em ínstars ou estádios, que correspondem à forma do inseto entre duas mudas. Para os dípteros, o número de ínstars varia entre três e nove (Guimarães; Amorim, 2006; Gullan; Cranston, 2012).

Figura 1 - Representação generalizada do ciclo de vida da ordem Diptera



Fonte: Adaptado de Sebastião (2012).

O principal material entomológico coletado no cadáver em estado inicial de decomposição são larvas, e no solo, ao redor do corpo, são pupas, sendo que espécimes das famílias Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae são os mais comumente encontrados (Caneparo; Silva; Flissak, 2021). A família Calliphoridae possui os gêneros de maior relevância para a entomologia forense, que participam significativamente na decomposição dos cadáveres, estando presentes do início ao fim do processo de colonização (Smith, 1986; Rosa; Oliveira-Costa, 2013).

Dentre os califorídeos de importância forense está *Chrysomya megacephala* – mosca-varejeira ou mosca-de-latrina-oriental –, que é de grande valia para as investigações, pois os adultos, que são atraídos por urina, excremento, carniça de animais e cadáveres humanos, e não são facilmente afastados do substrato, se estabelecem rapidamente em um cadáver (Smith, 1986; Byrd; Castner, 2001). As fêmeas logo realizam a oviposição e dos ovos surgem as larvas, sendo que o estágio larval da espécie está dividido em três ínstar (Barros-Cordeiro; Pujol-Luz, 2010). Ao final do terceiro ínstar, as larvas param de se alimentar, abandonam o substrato, se deslocam para outra superfície, como o solo, e cessam sua mobilidade, a fim de passar pelo processo de pupariação (Martín-Vega; Hall; Simonsen, 2016; Caneparo; Silva; Flissak, 2021).

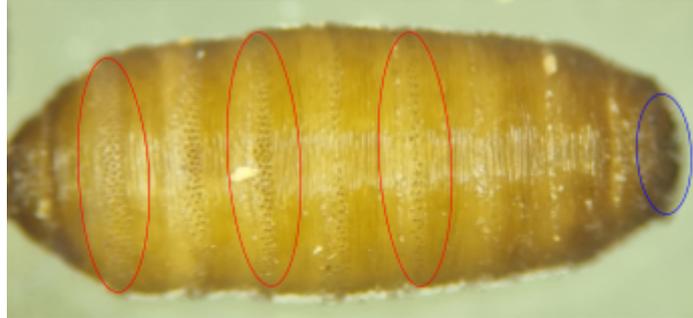
A pupariação é a formação do pupário – que funciona como um casulo – a partir da cutícula esclerotizada do terceiro ínstar larval. Este processo inicia-se com a contração muscular e longitudinal da larva, que é irreversível, e resulta numa redução do comprimento larval. Por este motivo, o pupário apresenta tamanho reduzido quando comparado com as larvas de terceiro ínstar, além de apresentar formato de barril, uma superfície mais lisa e, inicialmente, uma coloração mais clara – por conta da cutícula larval –, que, com o passar das horas, acaba escurecendo (Martín-Vega; Hall; Simonsen, 2016; Caneparo; Silva; Flissak, 2021), conforme a figura 2. Os pupários de *C. megacephala* apresentam a região cefálica mais retraída que as larvas de terceiro ínstar e fileiras de pequenos espinhos no tegumento que recobre o pupário (Figura 3), mais especificamente nas regiões de dobras, relacionadas com os segmentos visualizados no terceiro ínstar. Além disso, apresentam um par de espiráculos posteriores (Figura 3), cada um com três aberturas espiraculares bem visíveis (Mendonça, 2010).

Figura 2 - Pupários de *C. megacephala* sobre vermiculita, evidenciando a mudança de coloração (escurecimento) do pupário ao longo das horas, da esquerda para a direita



Fonte: Arquivo pessoal.

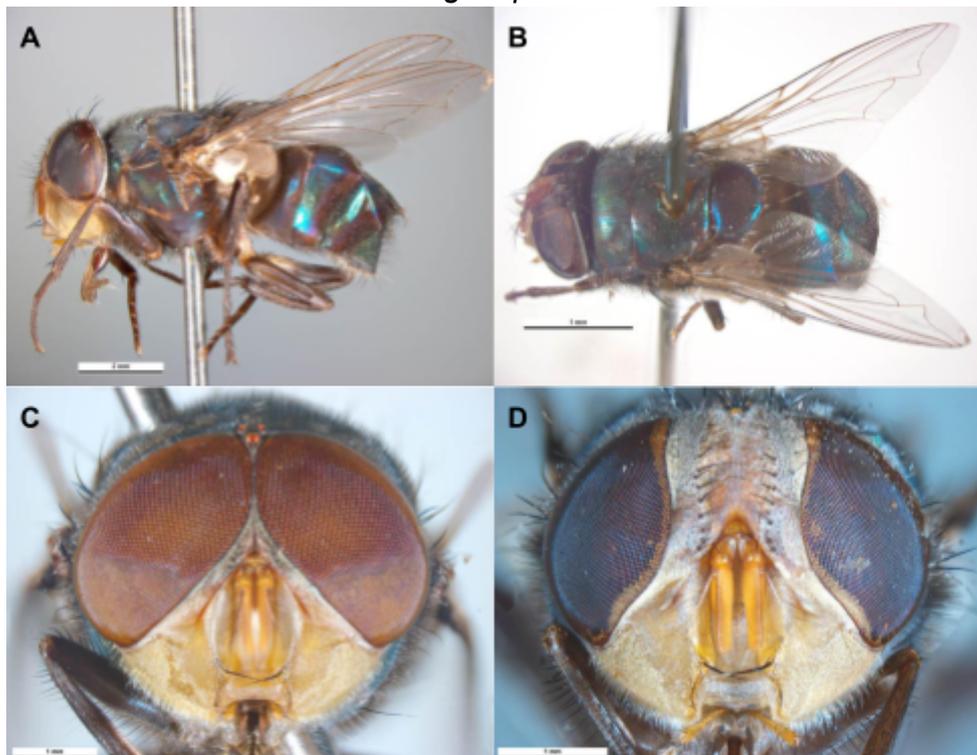
Figura 3 - Pupário de *C. megacephala*, com destaque para as fileiras de espinhos (círculos vermelhos) e para os espiráculos posteriores (círculo azul)



Fonte: Arquivo pessoal.

Os adultos de *C. megacephala*, apresentam corpo de coloração verde/azul metálica, robusto e curto, com uma cabeça consideravelmente grande e olhos também grandes, de tom avermelhado (Figura 4). Além disso, apresentam o espiráculo torácico anterior de coloração marrom ou cinza (Byrd; Castner, 2001; Kosmann *et al.*, 2013). Segundo Name (2008), é possível distinguir machos e fêmeas pelos olhos, uma vez que machos apresentam olhos holópticos (contíguos), enquanto fêmeas apresentam olhos dicópticos (distantes), conforme C e D da figura 4.

Figura 4 - Vista lateral (A), dorsal (B) e frontal de macho (C) e de fêmea (D) de *C. megacephala*



Fonte: Walker (1990).

A espécie *C. megacephala*, é encontrada, hoje em dia, dispersa na África, Ásia, Américas e Oceania, com poucas ocorrências na Europa e no Norte da Ásia, e com destaque para sua ampla distribuição pela Austrália, América do Sul e África Subsaariana, além de várias regiões ao sul da Ásia – como Oriente Médio, Índia e China (Badenhorst; Villet, 2018). No Brasil, a primeira aparição da espécie data da década de 70 na região Sudeste (Guimarães; Prado; Buralli, 1979), mas atualmente pode ser encontrada em todo o país (Badenhorst; Villet, 2018).

No Sul do Brasil, existem diversos estudos que abordam a ocorrência da espécie *C. megacephala*. Em Santa Catarina (SC), na Grande Florianópolis, destacam-se os estudos realizados por integrantes do Laboratório de Transmissores de Hematozoários (LTH) que apontam a espécie em questão como uma das espécies de maior ocorrência na área, como os levantamentos da entomofauna em carcaça de suíno (Juk, 2013; Bernaschina, 2016), os levantamentos de dípteros com armadilhas de garrafa PET com isca de carne (Wolff, 2015; Martins Sobrinho, 2017) e o levantamento de dípteros coletados em cadáveres humanos (Pereira, 2021). Há, ainda, a pesquisa de Barcelos (2014) quanto ao tempo de desenvolvimento pós-embrionário da espécie em temperatura ambiente, que apontou um tempo mínimo de desenvolvimento de 258 horas, com o estágio pupal durando 132 horas – mais da metade do período de desenvolvimento.

Segundo Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016), muitas literaturas fazem uso, de forma equivocada, do termo “estágio pupal” para designar o período compreendido entre o final da fase larval e a emergência do adulto, ou, até mesmo, diferem a fase de pré-pupa, mas ainda consideram todo o período seguinte como “estágio pupal”. Nestes casos, a terminologia correta a ser empregada é “período intrapuparial”, que inclui a fase de pré-pupa, o estágio pupal e a fase de adulto farado. O período intrapuparial compreende, ainda, os processos de pupariação – formação do pupário – e de pupação – formação da pupa–, e segue até a emergência do adulto de dentro do pupário, o que consiste em um extenso período que é melhor dividido em fases (Martín-Vega; Hall; Simonsen, 2016).

Uma terminologia adequada para tratar das fases do desenvolvimento intrapuparial é a proposta por Fraenkel e Bhaskaran (1973) e revisada por Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016), que dividem as fases em: (1) pré-pupa; (2) pupa criptocefálica; (3) pupa fanerocefálica; (4) adulto farado. A fase de pré-pupa compreende o período entre o início da pupariação e o final da apólise larva-pupa. A

fase de pupa inicia com a completa apólise larva-pupa e dura até o final da apólise pupa-adulto, sendo dividida em pupa criptocefálica e pupa fanerocefálica, diferenciadas apenas por características morfológicas. Já a fase de adulto farado está compreendida entre o final da apólise pupa-adulto e a emergência do adulto dentro do pupário. Essa última fase é mais extensa e, por esse motivo, é comumente subdividida de acordo com diferentes características morfológicas.

De acordo com Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016), os processos de pupariação e de emergência são facilmente identificáveis a olho nu, porém os processos de apólise, que consistem no desprendimento entre as células epidérmicas da pupa e a cutícula da larva e entre as células epidérmicas do adulto farado e a cutícula da pupa, requerem análises histológicas, como realizado por Fraenkel e Bhaskaran (1973), ou tomografias micro-computadorizadas virtuais, como realizado por Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016). Por esse motivo, estudos baseados apenas na análise de caracteres morfológicos do conteúdo intrapuparial muitas vezes não definem os processos de apólise, delimitando o início e final das fases através da identificação de caracteres morfológicos específicos.

Levando em conta todos os dados apresentados – como a recorrência de *C. megacephala* na região de Florianópolis, o fato de que é durante o período intrapuparial (período de maior duração no desenvolvimento da espécie) que ocorrem as modificações mais marcantes na estrutura do inseto no interior do pupário (Caneparo; Silva; Flissak, 2021) e a contribuição da espécie no contexto forense, principalmente na estimativa do IPM mínimo –, além do fato de que os poucos estudos quanto ao desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala*, como o de Zhang *et al.* (2017) e o de Barros-Cordeiro, Pujol-Luz e Báó (2021), foram realizados com exemplares de populações provenientes de outros países ou de outras regiões do Brasil – com entomofauna e condições regionais próprias –, podendo apresentar modificações significativas em seu desenvolvimento (Pujol-Luz; Arantes; Constantino, 2008), se faz relevante a execução de um estudo com amostras locais quanto ao desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala*, a partir de caracteres morfológicos do conteúdo intrapuparial.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o intervalo de tempo correspondente a cada fase do período intrapuparial de *C. megacephala*, com base em amostra local de Florianópolis-SC.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir os caracteres morfológicos do conteúdo intrapuparial que permitem diferenciar as fases do período intrapuparial de *C. megacephala*;
- Identificar as fases do período intrapuparial a partir da observação dos caracteres morfológicos nos exemplares de *C. megacephala*;
- Associar cada fase do desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala* a seu intervalo de tempo correspondente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA E TRIAGEM DAS MOSCAS

Para a coleta de adultos de *C. megacephala* foi utilizada uma técnica ativa de coleta por meio de rede entomológica, também denominada de puçá, em que os adultos eram coletados enquanto sobrevoavam a isca – uma carcaça de mamífero proveniente do processo de descarte do Laboratório de Mamíferos Aquáticos (LAMAQ), localizado no campus de Florianópolis da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). No mesmo dia da coleta, as gaiolas de triagem e de criação, ambas com dimensões de 39 x 39 x 39 cm, foram preparadas. Essas gaiolas eram constituídas de paredes de acrílico e apresentavam quatro aberturas: duas laterais, cobertas com tecido *voile* para ventilação, e duas frontais com mangas de tecido fixadas, viabilizando o acesso ao interior, conforme figura 5.

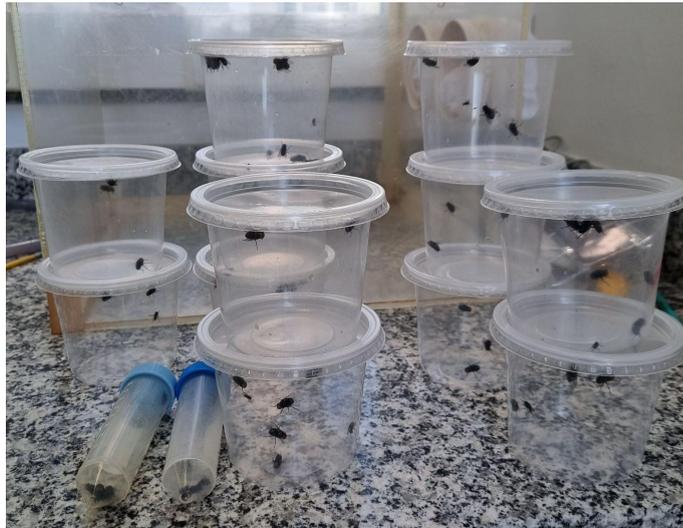
Figuras 5 - Gaiola de criação/triagem montada



Fonte: Arquivo pessoal.

Todas as moscas coletadas foram transferidas, ainda nas dependências do LAMAQ, do puçá para recipientes plásticos fechados (Figura 6), e transportadas ao LTH. Já no laboratório, os exemplares foram transferidos dos recipientes plásticos para a gaiola de triagem previamente preparada e forrada com papel filtro. As moscas permaneceram na gaiola por 5 dias para aclimação às condições do laboratório, sendo disponibilizado água com açúcar e uma dieta que consistia em sacarose (açúcar), levedo de cerveja e leite em pó, nas proporções 1:1:1, misturados com água suficiente para apresentar uma consistência semi-líquida (Marchiori; Prado, 1999; Queiroz; Vairo; Caneparo, 2021).

Figura 6 - Moscas acondicionadas nos recipientes plásticos logo após coleta

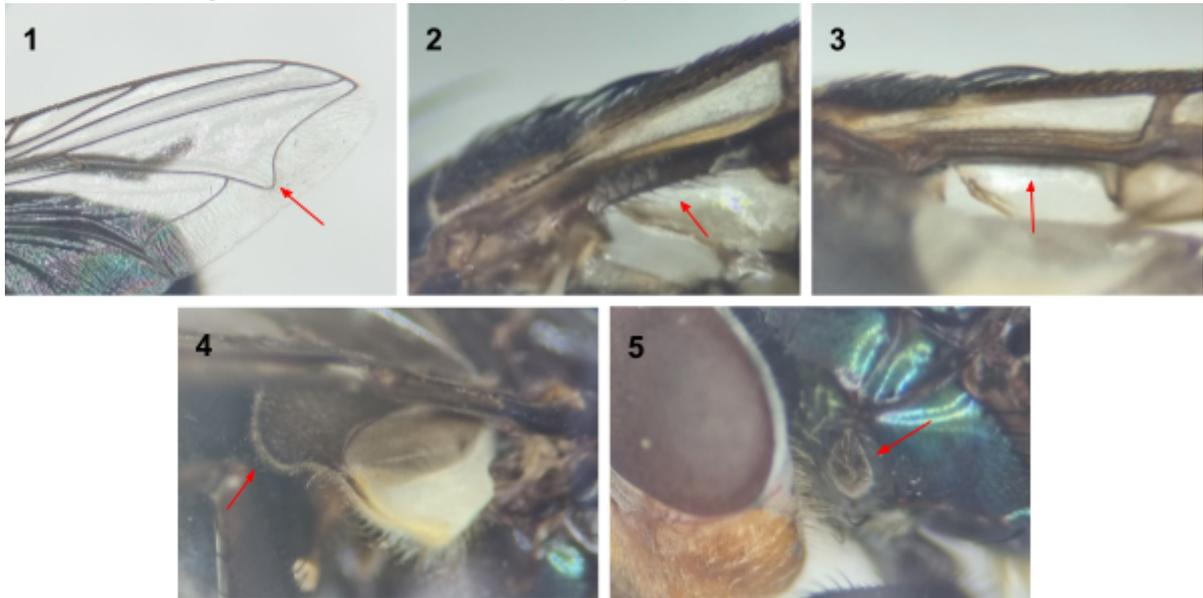


Fonte: Arquivo pessoal.

Após o tempo de aclimatação, foi realizada a triagem das moscas para isolar apenas os indivíduos da espécie de interesse – *C. megacephala*. Para isso, as moscas foram, individualmente, coletadas da gaiola em um tubo plástico com tampa e mantidas por dois a três minutos no *freezer*, a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, com o objetivo de deixá-las imóveis e facilitar a identificação (Guimarães, 2019; Queiroz; Vairo; Caneparo, 2021). Em seguida, foram transferidas para uma placa de Petri e, sob microscópio estereoscópio, rapidamente analisadas para isolar os indivíduos de *C. megacephala*, sendo descartados os indivíduos de outras espécies (Cipriani, 2020).

Para a identificação da espécie *C. megacephala*, foi empregada uma chave dicotômica para espécies brasileiras de califorídeos (Kosmann *et al.*, 2013), observando-se, conforme a figura 7: (1) asa com veia mediana distintamente angular; (2) base da veia radial com cerdas em vista dorsal; (3) base da veia radial sem cerdas em vista ventral; (4) caliptra inferior com cerdas em toda a superfície e (5) espiráculo torácico anterior marrom ou cinza. Os exemplares identificados como *C. megacephala* também passaram pela diferenciação sexual, através da análise dos olhos da mosca, uma vez que machos são holópticos e fêmeas são dicópticas (Name, 2008). Em seguida, os indivíduos foram transferidos para uma gaiola de criação previamente preparada e forrada com papel filtro.

Figura 7 - Caracteres morfológicos (evidenciados pelas setas vermelhas) para a identificação de adultos de *C. megacephala* conforme a chave dicotômica



Fonte: Arquivo pessoal.

3.2 ESTABELECIMENTO E MONITORAMENTO DA COLÔNIA

A colônia foi iniciada a partir dos adultos de *C. megacephala* triados e mantidos na gaiola de criação, constituindo a geração parental (P). Foi disponibilizado na gaiola de criação apenas água com açúcar, sem a dieta, além de recipientes contendo carne bovina moída para a oviposição. Os recipientes foram removidos da gaiola quando observou-se a presença de ovos na carne e esta foi transferida para um recipiente maior contendo mais carne moída fresca, utilizada para a alimentação das larvas. Este recipiente com carne foi acondicionado dentro de outro recipiente, forrado com vermiculita (substrato para pupariação) e coberto por tecido *voile* preso por um elástico (Trivia, 2017; Queiroz; Vairo; Caneparo, 2021).

O desenvolvimento dos ovos e das subsequentes larvas foi acompanhado ao longo dos dias até a formação das pupas, que foram transferidas para placas de Petri forradas com vermiculita e inseridas em novas gaiolas de criação. Uma vez que ocorreu a emergência dos adultos, foi realizada uma rápida triagem para isolar 25 fêmeas e 25 machos da geração F1, totalizando 50 indivíduos. Estes foram transferidos para outra gaiola de criação, contendo água com açúcar e a mesma dieta descrita anteriormente (açúcar, levedo de cerveja, leite em pó e água), disponibilizados por dois dias. Em seguida, a dieta foi removida, sendo mantida a água com açúcar, além de ser acrescentado um recipiente contendo fígado bovino. Este

recipiente esteve disponível no terceiro e quarto dia após emergência, durante oito (8) horas, e no quinto e sexto dia, durante quatro (4) horas, para estimular o desenvolvimento ovariano uniforme nas fêmeas (Linhares, 1988). No sétimo dia, foi introduzida uma placa de Petri contendo carne bovina moída para oviposição.

Uma vez observada a oviposição na carne, a placa de Petri foi removida da gaiola e, no dia seguinte, as larvas de primeiro ínstar foram transferidas com o auxílio de um pincel umedecido, para evitar lesão na larva, para novos recipientes, da seguinte forma: 16 recipientes de plástico, cada um com 30 g de carne bovina moída e 20 larvas – 1,5 g/larva –, totalizando 320 larvas. Estes recipientes estavam acondicionados, cada um, dentro de um recipiente maior, forrado com vermiculita e coberto com *voile*. Ainda, foi separada outra oviposição para garantir um número maior de exemplares, seguindo-se o mesmo procedimento descrito anteriormente, porém sendo utilizados 14 potes, totalizando 280 larvas.

Os recipientes permaneceram no insetário, sendo monitorados ao longo de quatro dias, até o momento em que as larvas de terceiro ínstar pararam de se alimentar e começaram a se deslocar da carne moída para a vermiculita (Caneparo; Silva; Flissak, 2021), quando se tornam larvas errantes. Estas foram transferidas para placas de Petri, também forradas com vermiculita, conforme a figura 8, para facilitar a visualização do processo de pupariação. A partir deste momento, as placas foram mantidas sob temperatura de $19,2 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (média obtida para os dias 31/05 a 07/06 a partir de dados do INMET – Instituto Nacional de Meteorologia), $70\% \pm 5\%$ de UR e fotoperíodo natural, sendo observadas em intervalos de 1 hora.

Figura 8 - Larvas errantes sobre vermiculita na placa de Petri



Fonte: Arquivo pessoal.

3.3 AMOSTRAGEM DURANTE PERÍODO INTRAPUPARIAL

A partir do momento em que a primeira larva errante iniciou a pupariação – cessou por completo sua movimentação na vermiculita, reduziu de tamanho e passou a apresentar formato de barril –, conforme a figura 9, a cada intervalo de uma hora, todos os exemplares que haviam iniciado a pupariação eram isolados em uma nova placa de Petri, nomeada com a data e o horário da pupariação, dando início à contagem de tempo para o período intrapuparial (Salazar-Souza; Couri; Aguiar, 2018). Assim, amostras de 10 exemplares foram coletadas, com auxílio de uma pinça, em intervalos de 3 horas durante as primeiras 24 horas. A primeira coleta foi realizada às 0 horas, correspondendo ao início da pupariação. Após o primeiro dia de amostragem, as coletas passaram a ser feitas em intervalos de 6 horas até a emergência do primeiro adulto (Pujol-Luz; Barros-Cordeiro, 2012).

Figura 9 - Pré-pupa sobre vermiculita, logo após início da pupariação



Fonte: Arquivo pessoal.

Logo após a coleta, os exemplares eram eutanasiados com água quente (entre 70 e 90 °C), sendo mantidos por 10 segundos em uma placa de Petri de vidro. Em seguida, a água era escorrida com o auxílio de uma peneira de metal e em cada pupário eram feitos três furos (dois nas extremidades e um no meio) com uma agulha fina e auxílio de uma pinça. Estes exemplares foram imersos em solução fixadora AFA – álcool, formaldeído e ácido acético em proporção 93:5:2 – dentro de um frasco plástico, cada um contendo 1,25 ml de solução e 10 exemplares. O frasco foi mantido a temperatura de -20 °C durante, no mínimo, 24 horas. Após este tempo, para preservação, as amostras foram transferidas para outro frasco plástico contendo álcool 70% (Caneparo; Silva; Flissak, 2021).

3.4 DISSECAÇÃO E REGISTRO FOTOGRÁFICO DAS AMOSTRAS

As amostras preservadas em álcool 70% foram transferidas, com auxílio de uma pinça, do frasco plástico para uma placa de Petri posicionada sob estereomicroscópio binocular para dissecação. Com o auxílio de bisturi, pinças, agulha e tesouras de ponta fina (Figura 10), foram feitos cortes transversais em cada pupário até sua completa remoção. Em seguida, os pupários foram descartados e o conteúdo intrapuparial foi retornado para o tubo com álcool 70% (Caneparo; Silva; Flissak, 2021).

Figura 10 - Materiais utilizados no processo de dissecação (bisturi, pinças, agulha e tesouras de ponta fina, respectivamente)



Fonte: Arquivo pessoal.

Posteriormente, os exemplares, agora sem pupário, foram novamente transferidos para placas de Petri e analisados sob o estereomicroscópio para identificação de características morfológicas que variam de acordo com as fases do período intrapuparial. Em seguida, alguns exemplares foram selecionados para serem fotografados em vista dorsal, lateral e ventral. Para isso, foi utilizado o estereomicroscópio Olympus SZX16, com sistema de captura de imagens CellSens Dimension 1.12 com câmera digital colorida DP73 - 17mpixe, disponibilizado pelo Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). Depois de analisados e fotografados, os exemplares foram devolvidos ao tubo com álcool 70%.

3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DO PERÍODO INTRAPUPARIAL E ASSOCIAÇÃO COM O INTERVALO DE TEMPO

Para a identificação de cada fase do período intrapuparial, foi necessário, inicialmente, definir os caracteres morfológicos do conteúdo intrapuparial que permitissem diferenciar essas fases. Como fundamento para esta etapa, foram utilizados os estudos de Barros-Cordeiro, Pujol-Luz e Bão (2021) e Zhang *et al.* (2017), que também descrevem as fases do período intrapuparial de *C. megacephala*, porém com algumas alterações mais condizentes com o presente estudo.

As fases do período intrapuparial foram identificadas, então, a partir dos caracteres morfológicos definidos. Para isso, foram analisados todos os exemplares já dissecados. Neste caso, seguiu-se a terminologia proposta por Fraenkel e Bhaskaran (1973) e revisada por Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016), além de incluir adaptações de Barros-Cordeiro, Pujol-Luz e Bão (2021) e Zhang *et al.* (2017).

Assim, com as fases do período intrapuparial identificadas, foi possível associar cada uma a um intervalo de tempo apurado, de acordo com o horário das coletas dos exemplares pertencentes àquela fase. Por fim, também foi determinado o tempo médio decorrido para a ocorrência de cada fase do período intrapuparial de *C. megacephala*, utilizando o programa Excel (Microsoft Office) para o cálculo de média e desvio padrão.

4 RESULTADOS

No presente estudo, das 600 larvas de primeiro ínstar de *C. megacephala* obtidas, 343 alcançaram o terceiro ínstar, iniciaram o processo de pupariação e foram separadas na etapa de coleta para dissecação e análise intrapuparial. Procurou-se manter um total de 10 exemplares de cada amostra – de cada horário – para serem analisados após a dissecação, porém, as estruturas da mosca durante esse período são muito delicadas e, por isso, alguns exemplares foram perdidos durante o processo de dissecação. Dessa forma, manteve-se, ao final, entre 8 e 10 exemplares para cada amostra – com exceção da amostra de hora zero (0), em que houve uma grande perda e sobraram apenas 4 exemplares –, totalizando 280 exemplares analisados.

Nas condições de $19,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 5\%$ de UR e fotoperíodo natural, a duração do período intrapuparial para *C. megacephala* foi de 156 horas – 6,5 dias – entre o início da pupariação e a emergência do primeiro adulto de dentro do pupário. Quanto às coletas, realizou-se um total de 31 coletas, considerando as 9 coletas efetuadas em intervalos de 3 horas nas primeiras 24 horas (0h, 3h, 6h, 9h, 12h, 15h, 18h, 21h e 24h) e as 22 coletas efetuadas em intervalos de 6 horas a partir das primeiras 24 horas até a emergência (30h, 36h, 42h, 48h, 54h, 60h, 66h, 72h, 78h, 84h, 90h, 96h, 102h, 108h, 114h, 120h, 126h, 132h, 138h, 144h, 150h e 156h).

Analisando o conteúdo intrapuparial após a dissecação, foi possível definir caracteres morfológicos que auxiliaram na distinção entre as diferentes fases do período intrapuparial. Após 3h do início da pupariação, foram observados os seguintes caracteres: (1) corpo semelhante à larva, porém mais curto; (2) segmentos larvais bem evidentes; (3) esqueleto céfalo-faríngeo embutido na extremidade frontal. Após 9h foram observados caracteres diferentes, como: (4) segmentos larvais discretos; (5) esqueleto céfalo-faríngeo internalizado, mas facilmente visível; (6) retração da extremidade anterior do corpo; (7) visualização de apêndices torácicos (pernas), com comprimento inferior a $\frac{1}{3}$ do corpo, sem ultrapassar o limite do segmento; (8) visualização de um par de cornos respiratórios claros na extremidade frontal. Já a partir de 15h foi observada apenas uma mudança morfológica: (9) apêndices torácicos (pernas e asas) ultrapassando o limite do segmento, mas ainda com comprimento inferior a $\frac{1}{3}$ do corpo.

Após 18h do início da pupariação, foram observadas mudanças em algumas características já citadas: (10) esqueleto céfalo-faríngeo bem internalizado, de difícil visualização; (11) apêndices torácicos alcançando quase metade do corpo; (12) par de cornos respiratórios escurecidos, ainda na extremidade frontal. Já a partir das 24h, houveram mudanças mais drásticas, como: (13) corpo dividido em três tagmas (cabeça, tórax e abdômen), mas com má definição da segmentação; (14) apêndices torácicos compridos; (15) par de cornos respiratórios lateralizados (localizados na base da cabeça); (16) visualização do aparelho bucal, ainda pouco definido. Após 36h observou-se os seguintes caracteres: (17) corpo dividido em três tagmas e segmentação bem definida; (18) antenas visíveis, com contorno claro. Já após 72h observou-se apenas uma nova característica: (19) olhos bem delimitados, ainda que incolores.

Após 102h do início da pupariação novos caracteres foram observados, como: (20) olhos bem delimitados e parcialmente pigmentados em tom rosado; (21) presença de cerdas marrons sobre o tórax e/ou abdômen; (22) antenas nítidas, com contorno escuro; (23) peças bucais nítidas, com lábio amarelo. Após 120h foi observado: (24) olhos bem delimitados e totalmente pigmentados; (25) presença de cerdas pretas sobre o tórax e abdômen, com cobertura média; (26) asas com coloração cinza clara; (27) pernas parcialmente pretas, com extremidade marrom. A partir de 126h obteve-se: (28) alta cobertura de cerdas pretas sobre o tórax e abdômen; (29) asas com coloração cinza escura; (30) pernas totalmente pretas; (31) lábio marrom claro; (32) arista incolor, mas com cerdas pretas. Seguindo para o final do período intrapuparial, as últimas mudanças são apenas quanto à coloração do lábio e das aristas. Após 138h do início da pupariação: (33) lábio marrom escuro; (34) arista marrom claro (pouco pigmentada). Já após 144h: (35) aristas com coloração marrom escura.

No total, foram definidos 35 caracteres morfológicos que auxiliaram no processo de diferenciar as fases do período intrapuparial. Assim, foram identificadas as quatro fases do período intrapuparial (pré-pupa, pupa criptocefálica, pupa fanerocefálica e adulto farado), que puderam ser, ainda, subdivididas em 12 subfases, considerando todos os caracteres definidos, o que permite uma análise mais apurada. No quadro 1 estão apresentadas as 12 subfases do período intrapuparial aqui identificadas e a relação de cada uma com um grupo de caracteres morfológicos definidos.

Quadro 1 - Subfases do período intrapuparial no desenvolvimento de *C. megacephala* e o conjunto de caracteres morfológicos indicativos de cada subfase

(continua)

Subfase		Caracteres morfológicos
Pré-pupa		(1) Corpo semelhante à larva, porém encurtado (2) Segmentos larvais bem evidentes (3) Esqueleto céfalo-faríngeo embutido na extremidade frontal
Pupa criptocefálica	Inicial	(4) Segmentos larvais discretos (5) Esqueleto céfalo-faríngeo internalizado, mas facilmente visível (6) Extremidade anterior retraída (7) Apêndices torácicos curtos – comprimento inferior a $\frac{1}{3}$ do corpo, sem ultrapassar o limite do segmento (8) Par de cornos respiratórios claros na extremidade frontal
	Média	(4), (5), (6), (8) (9) Apêndices torácicos curtos – comprimento inferior a $\frac{1}{3}$ do corpo, ultrapassando o limite do segmento
	Tardia	(4) (10) Esqueleto céfalo-faríngeo bem internalizado, de difícil visualização (11) Apêndices torácicos médios – quase metade do corpo (12) Par de cornos respiratórios escurecidos
Pupa fanerocefálica		(13) Corpo dividido em três tagmas (cabeça, tórax e abdômen), mas com má definição da segmentação (14) Apêndices torácicos compridos (15) Par de cornos respiratórios lateralizados (16) Aparelho bucal ainda pouco definido
Adulto farado	AF1	(14), (15), (16) (17) Corpo dividido em três tagmas e segmentação bem definida (18) Antenas visíveis, com contorno claro
	AF2	(14), (15), (16), (17), (18) (19) Olhos bem delimitados, ainda que incolores
	AF3	(14), (15), (17) (20) Olhos bem delimitados e parcialmente pigmentados, em tom rosado (21) Cerdas marrons sobre o tórax e/ou abdômen (22) Antenas nítidas, com contorno escuro (23) Peças bucais nítidas, com lábio amarelo

Quadro 1 - Subfases do período intrapuparial no desenvolvimento de *C. megacephala* e o conjunto de caracteres morfológicos indicativos de cada subfase

(conclusão)

Subfase		Caracteres morfológicos
Adulto farado	AF4	(14), (17), (22), (23) (24) Olhos bem delimitados e totalmente pigmentados (25) Média cobertura de cerdas pretas sobre o tórax e abdômen (26) Asas com coloração cinza clara (27) Pernas parcialmente pretas, com extremidade marrom
	AF5	(14), (17), (22), (24) (28) Alta cobertura de cerdas pretas sobre o tórax e abdômen (29) Asas com coloração cinza escura (30) Pernas totalmente pretas (31) Lábio marrom claro (32) Aristas incolores, mas com cerdas pretas
	AF6	(14), (17), (22), (24), (28), (29), (30) (33) Lábio marrom escuro (34) Arista marrom claro (pouco pigmentada)
	AF7	(14), (17), (22), (24), (28), (29), (30), (33) (35) Aristas marrom escuro

Fonte: Elaborado pelo autor.

É importante destacar que algumas estruturas podem estar aderidas ao pupário, como é o caso do esqueleto céfalo-faríngeo e dos cornos respiratórios lateralizados. Por este motivo, durante a dissecação, o primeiro foi perdido em diversas ocasiões, assim como o segundo ficou rompido em vários exemplares. Entretanto, não foi comprometido o uso de tais características para a identificação das subfases, pois a presença do esqueleto ainda foi identificada após a dissecação e foi possível observar a “cicatriz” de onde houve o rompimento dos cornos.

Vale ressaltar, também, que na subfase AF7 foi observado, em dois exemplares prestes a emergir, a estrutura de ptilino inchado (Figura 11, L1). Apesar da ocorrência ser exclusiva desta subfase, a característica não foi incluída entre os caracteres morfológicos por não ocorrer de forma uniforme ao longo da subfase. Na figura 11 estão apresentados exemplares de cada uma das 12 subfases, destacando alguns dos caracteres morfológicos descritos e enumerados acima.

Figura 11 - Exemplos de *C. megacephala* ao longo do período intrapuparial, em vista dorsal (1) e ventral (2), com destaque para alguns caracteres morfológicos, indicados pelas setas vermelhas e azuis

(continua)

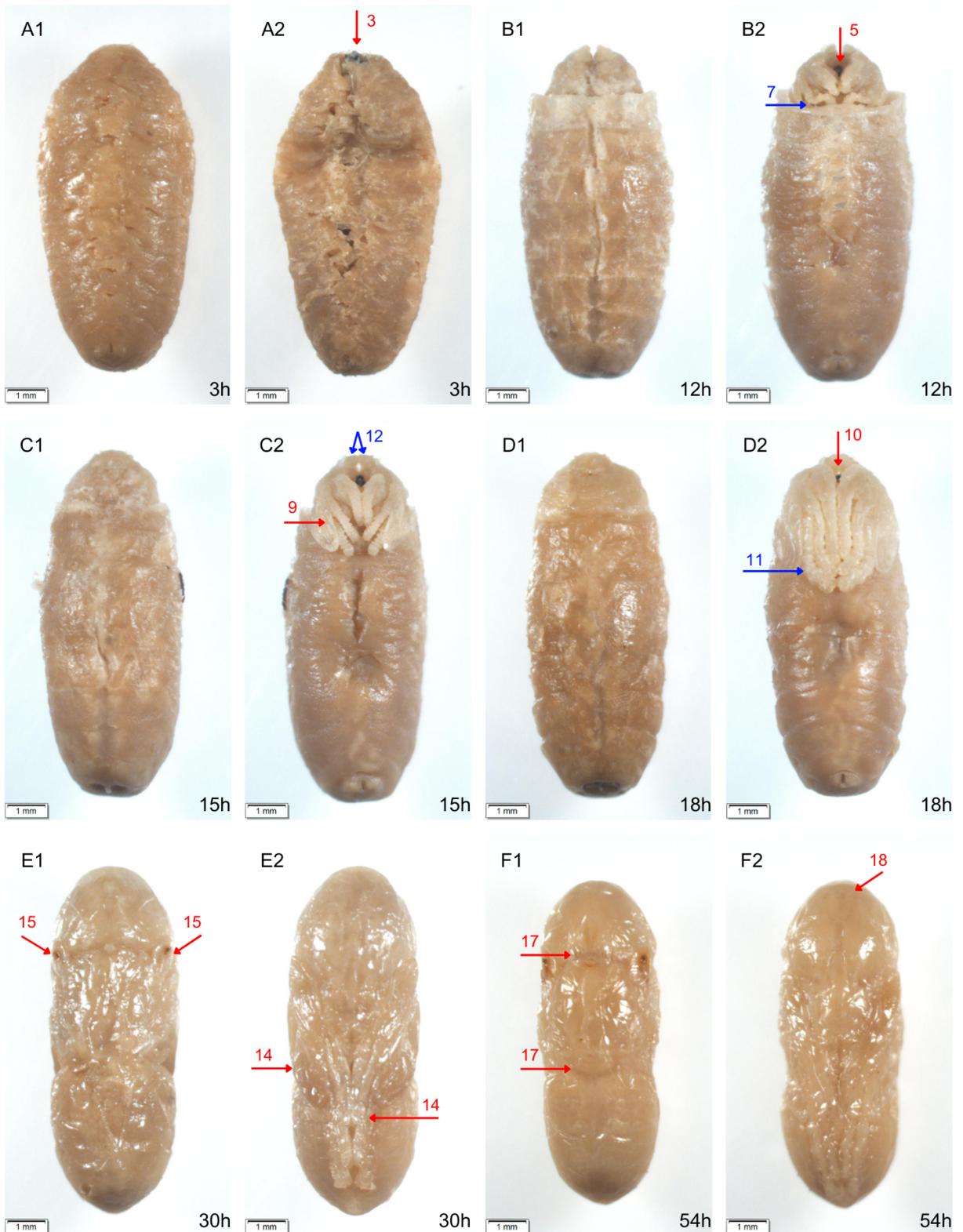
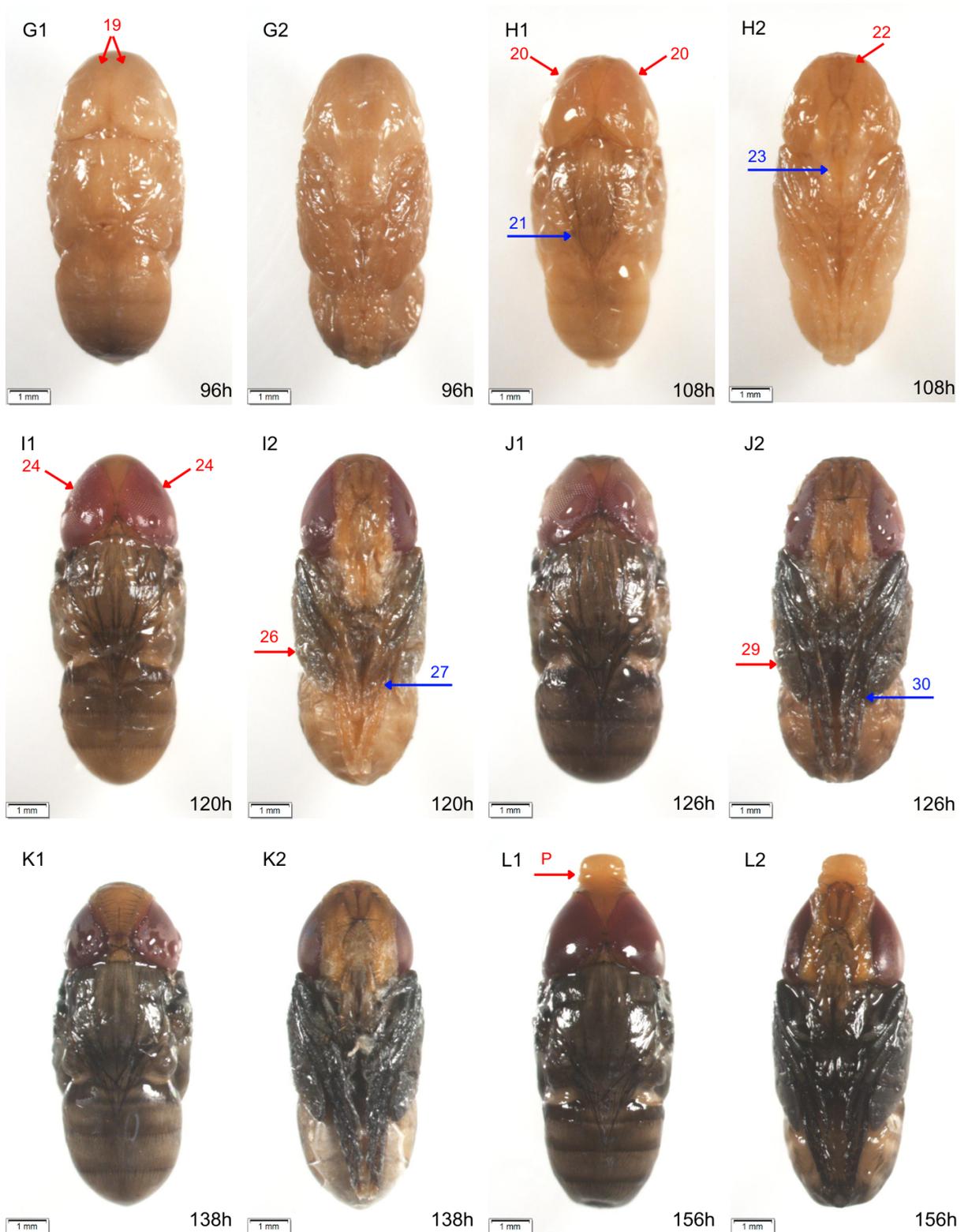


Figura 11 - Exemplos de *C. megacephala* ao longo do período intrapuparial, em vista dorsal (1) e ventral (2), com destaque para alguns caracteres morfológicos, indicados pelas setas vermelhas e azuis

(conclusão)

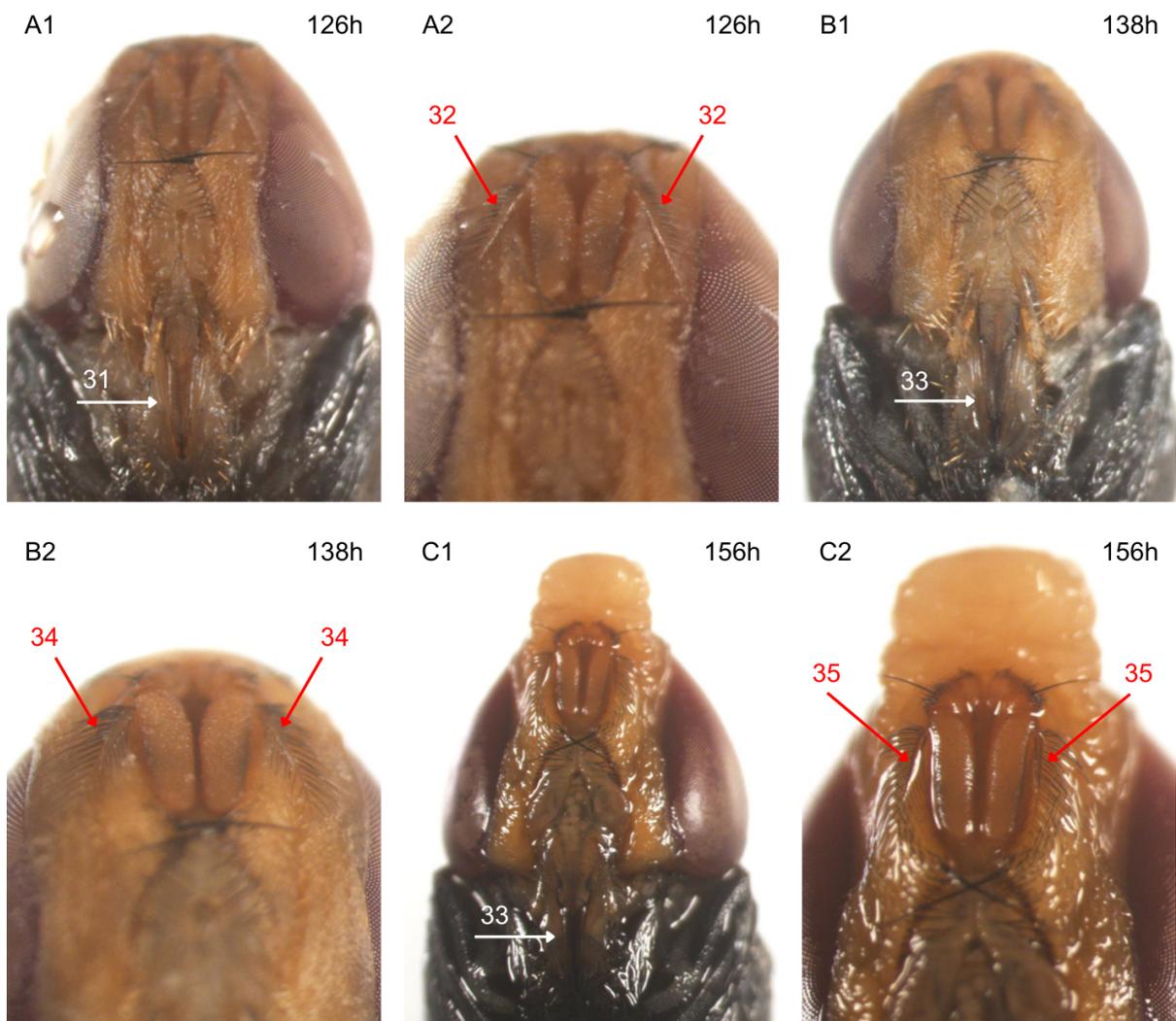


Fonte: Arquivo pessoal.

Notas: (A) Pré-pupa; (B) pupa criptocefálica inicial; (C) pupa criptocefálica média; (D) pupa criptocefálica tardia; (E) pupa fanerocefálica; (F) adulto farado AF1; (G) adulto farado AF2; (H) adulto farado AF3; (I) adulto farado AF4; (J) adulto farado AF5; (K) adulto farado AF6; (L) adulto farado AF7; P= ptilino.

Já na figura 12, observam-se imagens ampliadas, em vista ventral, da região cefálica de exemplares das seguintes subfases: adulto farado AF5, adulto farado AF6 e adulto farado AF7. Na figura é possível observar, com maiores detalhes, as aristas e os lábios, que estão entre os caracteres morfológicos já descritos e enumerados.

Figura 12 - Imagens ampliadas da região cefálica de exemplares de *C. megacephala* nas subfases de adulto farado AF5, AF6 e AF7, em vista ventral, com destaque para alguns caracteres morfológicos, indicados pelas setas brancas e vermelhas



Fonte: Arquivo pessoal.

Notas: (A) adulto farado AF5; (B) adulto farado AF6; (C) adulto farado AF7.

Uma vez que os caracteres morfológicos foram definidos e as subfases do período intrapuparial identificadas, foi possível fazer a associação entre os tempos de coleta em que determinados caracteres foram observados e a subfase correspondente. Além disso, foi calculado o tempo médio decorrido para a ocorrência de cada subfase, considerando o número de exemplares representantes de determinada subfase observados em cada horário de coleta. Na tabela 1 estão estabelecidos os intervalos de tempo (tempo mínimo e tempo máximo), em horas, correspondentes às subfases do período intrapuparial para *C. megacephala*, com base em amostra local de Florianópolis-SC, além do tempo médio decorrido, também em horas, e o número total de exemplares observados em cada subfase.

Tabela 1 - Intervalo de tempo (em horas) e tempo médio decorrido (em horas) para a ocorrência de cada subfase do período intrapuparial no desenvolvimento de *C. megacephala*, com base em amostra local de Florianópolis-SC

	Subfase	Intervalo de tempo (h)	Tempo médio (h) X ± DP	n
	Pupariação	0	-	4
1	Pré-pupa	3 - 6	4,41 ± 1,54	17
2	Pupa criptocefálica inicial	9 - 15	10,95 ± 2,01	20
3	Pupa criptocefálica média	15	15,00 ± 0,00	8
4	Pupa criptocefálica tardia	18 - 42	21,68 ± 6,80	22
5	Pupa fanerocefálica	24 - 54	30,00 ± 8,27	21
6	Adulto farado AF1	36 - 78	54,11 ± 12,71	56
7	Adulto farado AF2	72 - 108	89,88 ± 11,22	51
8	Adulto farado AF3	102 - 114	110,40 ± 4,97	15
9	Adulto farado AF4	120	120,00 ± 0,00	10
10	Adulto farado AF5	126 - 138	130,29 ± 4,70	21
11	Adulto farado AF6	138 - 144	139,50 ± 2,78	8
12	Adulto farado AF7	132 - 156	149,78 ± 6,11	27
	Emergência	156	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Notas: n= número de exemplares observados em cada subfase; X ± DP= média ± desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento da espécie *C. megacephala* é constantemente alvo de diversos estudos. Barros-Cordeiro e Pujol-Luz (2010) descreveram a duração do desenvolvimento pós-embrionário e a morfologia das estruturas pós-embrionárias. De forma semelhante, Cipriani (2020) avaliou o efeito da manutenção em laboratório sobre o desenvolvimento da espécie. Já Zhang *et al.* (2017) testaram, na China, a influência de diferentes temperaturas na duração dos estágios pós-embrionários da espécie, da mesma forma que o fez Barcelos (2014), porém na região de Florianópolis-SC. Além de Cipriani (2020) e Barcelos (2014), outros diversos estudos desenvolvidos no LTH analisaram o desenvolvimento de *C. megacephala*, inclusive quanto à influência de diversos fármacos, como Losartana Potássica (Barbosa, 2020), Levonorgestrel (Guimarães, 2019) e Carbamazepina (Marques, 2017).

Já em relação ao estudo do desenvolvimento intrapuparial para a espécie, foram encontrados poucos trabalhos publicados, todos muito recentes. Wang *et al.* (2019) estudaram o desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala* a partir da expressão gênica, fornecendo indicadores moleculares para identificar a idade da amostra. Fu *et al.* (2023) verificaram o uso de proteínas expressas durante o período intrapuparial para a identificação da espécie. Já Zhang *et al.* (2017) e Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021) analisaram o desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala* a partir de caracteres morfológicos, conforme o presente estudo.

Em relação às fases do período intrapuparial, no quadro 2 estão relacionadas as divisões adotadas pelo presente estudo, por Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021) e por Zhang *et al.* (2017). Para o presente estudo, em que não foram feitas análises histológicas, nem tomografias micro-computadorizadas virtuais para identificação dos processos de apólise, optou-se pelo uso do termo pré-pupa para a primeira fase, assim como o fez Zhang *et al.* (2017). A fase de pupa fanerocefálica foi a única denominada de maneira uniforme nos três estudos. Já a última fase, definida como “adulto farado” apenas neste estudo e no de Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021), foi subdividida de acordo com as diferentes cores dos olhos por Zhang *et al.* (2017) e Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021), mas no presente estudo optou-se por defini-la a partir de outras características.

Quadro 2 - Relação entre as fases do período intrapuparial de *C. megacephala* definidas por três diferentes estudos

	Presente estudo	Barros-Cordeiro, Pujol-Luz e Bão (2021)	Zhang <i>et al.</i> (2017)
1	Pré-pupa	Apólise larva-pupa	Pré-pupa
2	Pupa criptocefálica inicial, média e tardia	Pupa criptocefálica	Pupa criptocefálica inicial e tardia
3	Pupa fanerocefálica	Pupa fanerocefálica	Pupa fanerocefálica
4	Adulto farado AF1, AF2, AF3, AF4, AF5, AF6 e AF7	Adulto farado de olhos transparentes, amarelos, rosados e vermelhos	Olho amarelo inicial, médio e tardio; rosado; vermelho inicial e tardio; marrom

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021) e Zhang *et al.* (2017).

As divergências entre os três estudos quanto à denominação das fases do período intrapuparial ocorreram, principalmente, por conta da aplicação de diferentes caracteres morfológicos na identificação das fases. A primeira etapa do desenvolvimento intrapuparial, para Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021), ficou delimitada ao processo de apólise larva-pupa. De acordo com Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016, p. 1249, traduzido pela autora)¹, “da pupariação ao primeiro evento de apólise o inseto deveria ser chamado de pré-pupa”. No presente estudo e para Zhang *et al.* (2017), que apenas verificaram morfológicamente as alterações ao longo do período intrapuparial, o termo pré-pupa foi adaptado e utilizado para abranger todo o período decorrido entre a pupariação e o início da fase seguinte, abrangendo a apólise larva-pupa.

A fase seguinte foi definida como pupa criptocefálica pelos três estudos, em que “as pernas e asas foram parcialmente evaginadas, mas não a cabeça; a morfologia da pupa ainda se assemelha a da pré-pupa” (Martín-Vega; Hall;

¹ “From pupariation to the first apolytic event the insect should be called a prepupa”.

Simonsen, 2016, p. 1249, traduzido pela autora)². Para Zhang *et al.* (2017), a fase realmente foi definida pelo surgimento dos apêndices torácicos e aparência ainda semelhante à larva – ou pré-pupa –, conforme também estabelecido no presente estudo. As subdivisões foram definidas, principalmente, quanto ao comprimento dos apêndices: “inicial” para até $\frac{1}{3}$ do corpo e “tardia” para $\frac{1}{2}$ do corpo. No presente estudo, “inicial” foi, ainda, dividida em “inicial” e “média”, ao considerar se os apêndices com comprimento inferior a $\frac{1}{3}$ do corpo ultrapassam (média) ou não (inicial) o limite do segmento. Já no estudo de Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021), a fase foi definida, principalmente, pela fusão da mandíbula e maxila ao pupário, e pela presença de uma fina membrana envolvendo a pupa, sem ser citado o surgimento dos apêndices torácicos.

A fase de pupa fanerocefálica, como já comentado, foi a única denominada de maneira uniforme nos três estudos, sem adição de subdivisões. Conforme Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016, p. 1249, traduzido pela autora)³, “a cabeça, as pernas e as asas evaginam completamente, e a pupa criptocefálica torna-se a pupa fanerocefálica (‘cabeça visível’), onde cabeça, tórax e abdômen são discerníveis”. Nos três estudos foi seguida esta definição (corpo dividido em três tagmas e evaginação completa dos apêndices), além de que, para o presente estudo e para Zhang *et al.* (2017), foi acrescentada a má definição da segmentação entre tagmas para definir a fase. Entretanto, no estudo de Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021) a evaginação dos apêndices torácicos é dita como um processo que só vem a acontecer na fase de pupa fanerocefálica, diferindo da terminologia empregada e dos outros dois estudos, que descrevem o surgimento dessas estruturas já na fase anterior (pupa criptocefálica).

Segundo Martín-Vega, Hall e Simonsen (2016), após a fase de pupa fanerocefálica inicia-se a apólise pupa-adulto, que finaliza com a transformação da pupa em adulto farado – última fase do período. No presente estudo, assim como para a fase de pré-pupa e apólise larva-pupa, utilizou-se apenas caracteres morfológicos para definir o final da fase de pupa fanerocefálica e o início de adulto farado, sem definir a apólise pupa-adulto. Os estudos de Zhang *et al.* (2017) e Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021) também fizeram essa ponte direta entre as

² “the legs and wings have partially everted but not the head; the morphology of the pupa still resembles that of the prepupa”.

³ “the head, legs, and wings evert completely, and the cryptocephalic pupa becomes the phanerocephalic pupa (‘visible head’), where head, thorax, and abdomen are discernible”.

duas fases, ainda que Zhang *et al.* (2017) não tenham denominado a fase de adulto farado desta forma. Para Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Báu (2021), a fase de adulto farado inicia com a característica de baixa definição entre cabeça, tórax e abdômen, além do surgimento de apêndices do aparelho bucal e seu contorno. Já para Zhang *et al.* (2017), inicia com a clara segmentação entre cabeça, tórax e abdômen, além de antenas se tornando visíveis e labela duplo lobada. No presente estudo seguiu-se a descrição de Zhang *et al.* (2017), optando-se por não incluir a característica de labela duplo lobada, pois não foi possível identificá-la nos exemplares.

A subdivisão da fase de adulto farado não é apoiada por grandes transformações das estruturas do conteúdo intrapuparial, como observado nas fases anteriores, já que está ocorrendo apenas a maturação do adulto farado, caracterizada pela pigmentação gradual de partes do corpo do inseto (Barros-Cordeiros; Pujol-Luz; Báu, 2021). Uma grande divergência entre o presente estudo e os outros dois é que, enquanto ambos utilizam as diferentes cores de olhos ao longo do processo de maturação para classificar as subfases de adulto farado, no presente estudo optou-se por não definir as subfases a partir da pigmentação dos olhos, pois observou-se a ocorrência de diferentes cores de olhos em exemplares que apresentavam, por exemplo, características verificadas apenas ao final do período intrapuparial – como lábio e aristas marrom escuro. Desta forma, não foi possível estabelecer uma boa relação entre as subfases de adulto farado definidas nos três estudos, que divergiram tanto em relação às cores dos olhos, quanto aos caracteres observados e às cores e/ou tons dos caracteres.

Quanto ao tempo decorrido até a emergência do adulto de dentro do pupário, que pode ser traduzido como o tempo de duração do período intrapuparial, Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Báu (2021) realizaram sua pesquisa sob temperatura média de 27 ± 1.0 °C, e obtiveram um tempo de duração mínima para o período intrapuparial de *C. megacephala* de 96h. Já Zhang *et al.* (2017) trabalharam com diferentes temperaturas e obtiveram os seguintes resultados: para 16 °C, duração de 344h; para 22 °C, duração de 184h. No presente estudo, sob temperatura média de $19,2 \pm 0,8$ °C, o período intrapuparial da espécie teve duração mínima de 156h. Na tabela 2 estão apresentados esses resultados, além dos intervalos de tempo correspondentes a cada fase do período intrapuparial de *C. megacephala* para os três estudos. A fim de comparação, considerou-se apenas as quatro fases, sem as subdivisões.

Tabela 2 - Intervalos de tempo (em horas) correspondentes às fases do período intrapuparial de *C. megacephala*, e tempo decorrido para emergência do adulto, para diferentes estudos

Fase	Intervalo de tempo (h)			
	Presente estudo	Zhang <i>et al.</i> (2017)	Zhang <i>et al.</i> (2017)	Barros-Cordeiro, Pujol-Luz e Bão (2021)
	19,2 ± 0,8 °C	16 °C	22 °C	27 ± 1,0 °C
1 Pré-pupa ou apólise larva-pupa	3 - 6	0 - 16	0 - 8	0 - 12
2 Pupa criptocefálica	9 - 42	8 - 40	8 - 24	3 - 15
3 Pupa fanerocefálica	24 - 54	32 - 64	24 - 48	6 - 21
4 Adulto farado	36 - 156	56 - 344	40 - 184	9 - 96
Emergência	156	344	184	96

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Zhang *et al.* (2017) e Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021).

Conforme o estudo de Zhang *et al.* (2017), temperatura e duração do período intrapuparial são inversamente proporcionais, ou seja, quanto maior a temperatura, menor a duração do período. Assim, conforme esperado, observa-se que a duração do período intrapuparial no presente estudo foi maior do que no estudo de Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021). Já o início e término das fases ocorreu mais tardiamente, com exceção da primeira fase, que terminou de forma mais precoce no presente estudo. Entretanto, vale ressaltar que, conforme já apontado, houveram divergências entre o presente estudo e a pesquisa de Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021) quanto aos caracteres morfológicos utilizados para identificar as fases do desenvolvimento intrapuparial.

Comparando o presente estudo com o estudo de Zhang *et al.* (2017) à temperatura de 16 °C, os resultados estão apresentados conforme o esperado, com duração do período intrapuparial mais curta e com início e término das fases mais precoce, com exceção da fase de pupa criptocefálica, que apresentou início e término um pouco mais tardios. Já quanto à temperatura de 22 °C, a duração do

período intrapuparial no presente estudo foi menor – quando se esperava uma duração maior que 184h –, além de que a fase de adulto farado apresentou um início e término mais precoce e a fase de pré-pupa um término mais precoce. Porém, vale ressaltar que, por conta da falta de dados disponíveis no estudo de Zhang *et al.* (2017), não foi possível verificar se tais divergências são estatisticamente significativas, sendo esta comparação apenas visual.

As divergências observadas podem estar relacionadas com fatores associados às próprias amostras utilizadas. Segundo Pujol-Luz, Arantes e Constantino (2008, p.487), “as estimativas devem ser aferidas de acordo com os padrões regionais e locais”, tendo em vista que diferentes países – como é o caso do estudo de Zhang *et al.* (2017), proveniente da China – ou diferentes regiões de um mesmo país apresentam distintas entomofaunas e condições locais próprias. Diante disso, é possível que haja alterações genéticas nessas diferentes populações de *C. megacephala*, resultando em distinções nas taxas de desenvolvimento. Além disso, conforme observado por Pires *et al.* (2009), a metodologia aplicada para a criação dos insetos – como o tipo de substrato utilizado na dieta das larvas – pode influenciar em seu desenvolvimento e resultar em períodos de desenvolvimentos maiores ou menores. Logo, seria necessário realizar uma pesquisa com um método padrão, utilizando exemplares dessas distintas regiões, para determinar se existem diferenças no desenvolvimento das populações de *C. megacephala*.

Ainda considerando essas divergências observadas, também é relevante a execução de um estudo futuro utilizando as mesmas temperaturas aplicadas nos estudos de Zhang *et al.* (2017) e Barros-Cordeiros, Pujol-Luz e Bão (2021), com o objetivo de verificar se as variações nos intervalos de tempo do período intrapuparial estão associadas a outros fatores que não as diferentes temperaturas, já que essas divergências observadas aqui podem ser apenas pontos fora de uma curva de temperatura × crescimento.

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, foram definidos 35 caracteres morfológicos que auxiliaram no processo de identificação das fases do desenvolvimento intrapuparial de *C. megacephala*. Assim, com base na observação deste caracteres, foram identificadas as 4 fases (pré-pupa, pupa criptocefálica, pupa fanerocefálica e adulto farado), a partir do processo de pupariação até a emergência, que foram, ainda, subdivididas em 12 subfases, classificadas como: pré-pupa, pupa criptocefálica inicial, média e final, pupa fanerocefálica e adulto farado AF1, AF2, AF3, AF4, AF5, AF6 e AF7. Ainda, cada subfase foi associada ao intervalo de tempo em que foi observada, que variou entre 0h (pupariação) e 156h (emergência).

Os resultados obtidos apresentaram discrepâncias em relação aos outros dois estudos provenientes de diferentes regiões, demonstrando a importância de um estudo com estimativas regionais, a partir da entomofauna local e de condições locais. Assim, os resultados encontrados aqui podem ser úteis para a estimativa do IPM em investigações criminais na região de Florianópolis-SC, quando forem encontrados nas cenas de crime imaturos de mosca em estágio mais avançado de desenvolvimento, ou seja, dentro do pupário. Além disso, os dados podem ser utilizados em futuras pesquisas quanto ao desenvolvimento intrapuparial de outras espécies da família Calliphoridae ou da própria *Chrysomya megacephala*, em diferentes temperaturas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. C.; FERMINO JUNIOR, N.; OLIVEIRA, R. P.; ANCHIETA, J.; TRONCHINI, M. P.; CONCEIÇÃO, T. S.; SILVA, J. S. F. P.; ROSA, R.; SALLES, J. C. Noções de Perícia Criminal e o Vestígio Entomológico na Estimativa do IPM. *In*: GOMES, L. (org.). **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 133-168.
- AMENDT, J.; CAMPOBASSO, C. P.; GAUDRY, E.; REITER, C.; LEBLANC, H. N.; HALL, M. J. R. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. **International Journal Of Legal Medicine**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 90-104, 2006.
- BADENHORST, R.; VILLET, M. H. The uses of *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) in forensic entomology. **Forensic Sciences Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 2-15, 2018.
- BARBOSA, F. A. **Análise do efeito do anti-hipertensivo Losartana Potássica no desenvolvimento de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020
- BARCELOS, P. S. **Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya Megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) em temperatura ambiente e o efeito de baixas temperaturas sobre a eclosão dos ovos**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- BARROS-CORDEIRO, K. B.; PUJOL-LUZ, J. R. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia**, [s. l.], v. 50, n. 47, p. 709-717, 2010.
- BARROS-CORDEIRO, K. B.; PUJOL-LUZ, J. R.; BÃO, S. N. A Study of the Pupal Development of Five Forensically Important Flies (Diptera: brachycera). **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 1643-1653, 2021.
- BERNASCHINA, L. M. T. **Levantamento de Fauna Diptera de Interesse Forense em Carcaça de Suíno em Ambiente de Restinga Arbórea em Florianópolis, Santa Catarina**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. Insects of Forensic Importance. *In*: BYRD, J. H.; CASTNER, J. L. (ed.). **Forensic Entomology: the utility of arthropods in legal investigations**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2001. p. 43-79.
- CANEPARO, M. F. C.; SILVA, S. M.; FLISSAK, J. Imaturos de Diptera e Coleoptera de interesse forense. *In*: VAIRO, K. P.; MOURA, M. O. (coord.). **Entomologia forense na prática: do laboratório à utilização do vestígio**. 1. ed. Campinas: Millenium Editora, 2021. p. 131-164.

CATTS, E. P.; GOFF, M. L. Forensic Entomology in Criminal Investigations. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 253-272, 1992.

CIPRIANI, G. **Efeito da manutenção em laboratório sobre o desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae)**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.

FRAENKEL, G.; BHASKARAN, G. Pupariation and Pupation in Cyclorrhaphous Flies (Diptera): terminology and interpretation. **Annals of The Entomological Society of America**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 418-422, 1973.

FRANCEZ, P.; AVILA, E.; DIAS FILHO, C. Biologia Forense. In: VELHO, J. A.; GEISER, G. M.; ESPINDULA, A. (org.). **Ciências forenses: uma introdução às principais áreas da criminalística moderna**. 2. ed. Campinas: Millennium Editora, 2013. p. 199-226.

FU, C.; ZHANG, P.; ZOU, X.; SONG, T. Descriptive analyses of differentially expressed proteins during intrapuparial stage based on the label-free proteomics technique between *Chrysomya megacephala* and *Synthesiomyia nudiseta*. **Legal Medicine**, [s. l.], v. 64, p. 102-109, 2023.

GOFF, M. L. Estimation of Postmortem Interval Using Arthropod Development and Successional Patterns. **Forensic Science Review**, [s.l.], v. 5, n. 2, p. 81-94, 1993.

GOMES, G.; DESUÓ, I. C.; MORLIN JÚNIOR, J. J.; MURAKAMI, A. S. N.; GOMES, L. Insetos, Entomologia e Ciências Forenses. In: GOMES, L. (org.). **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010. p. 17-86.

GUIMARÃES, G. P. **Influência de levonorgestrel no desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius), 1794 (Diptera:Calliphoridae)**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

GUIMARÃES, J. H.; AMORIM, D. S. Diptera. In: COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C. E. (ed.). **Insetos imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2006. p. 147-160.

GUIMARÃES, J. H.; PRADO, A. P.; BURALLI, G. M. Dispersal and distribution of there newly introduced species of *Chrysomya* Robineau - Desvoid in Brazil (Diptera: Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 23, n. 4, p. 245-255, 1979.

GULLAN, P. J.; CRANSTON, P. S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. Tradução de Sonia Maria Marques Hoenen. 4. ed. São Paulo: Roca, 2012. 480 p.

INMET (Brasil). Ministério da Agricultura e Pecuária. **Condições Registradas**. 2023. Disponível em: <https://tempo.inmet.gov.br/CondicoesRegistradas>. Acesso em: 7 nov. 2023.

JUK, L. B. **Levantamento da fauna de artrópodes em carcaça de suíno em ambiente silvestre com vegetação de restinga na Ilha de Santa Catarina como subsídio para as ciências forenses.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

KOSMANN, C.; MELLO, R. P.; HARTEIREITEN-SOUZA, E. S.; PUJOL-LUZ, J. R. A List of Current Valid Blow Fly Names (Diptera: Calliphoridae) in the Americas South of Mexico with Key to the Brazilian Species. **EntomoBrasilis**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 74-85, 2013.

LINHARES, A. X. The gonotrophic cycle of *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae) in the laboratory. **Revista Brasileira de Entomologia**, [s. l.], v. 32, p. 383- 392, 1988.

MARCHIORI, C. H.; PRADO, A. P. Tabelas de vida de *Fannia pusio* (Wied.) (Diptera: Fanniidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 557-563, 1999.

MARQUES, J. S. **O efeito da Carbamazepina sobre o desenvolvimento larval de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae).** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

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**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 1249-1251, 2016.

MARTINS SOBRINHO, M. F. **Levantamento da dipterofauna necrófaga no Parque do Manguezal Do Itacorubi, Florianópolis, Santa Catarina.** 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

MENDONÇA, P. M. **Identificação de imaturos de dípteros muscóides (Diptera: Calliphoridae) de importância sanitária e forense através da microscopia eletrônica de varredura.** 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

NAME, K. P. O. **Análise morfológica das espermatídes e dos espermatozóides de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) nos tratos reprodutores.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

PEREIRA, C. T. **Levantamento de dípteros coletados em cadáveres humanos nas ocorrências atendidas pelo Instituto Geral de Perícias de Florianópolis, SC.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

PIRES, S.M.; CÁRCAMO, M.C.; ZIMMER, C.R.; RIBEIRO, P.B. Influência da dieta no desenvolvimento e investimento reprodutivo de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae). **Arquivos do Instituto Biológico**, [s. l.], v. 76, n. 1, p. 41-47, 2009.

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

PUJOL-LUZ, J. R.; BARROS-CORDEIRO, K. B. Intra-puparial development of the females of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 269-272, 2012.

QUEIROZ, M. M. C.; VAIRO, K. P.; CANEPARO, M. F. C. Criação de dípteros e coleópteros de importância forense em condições controladas. *In*: VAIRO, K. P.; MOURA, M. O. (coord.). **Entomologia forense na prática: do laboratório à utilização do vestígio**. 1. ed. Campinas: Millennium Editora, 2021. p. 105-130.

RAFAEL, J. A.; MELO, G. A. R.; CARVALHO, C. J. B.; CASARI, S. A.; CONSTANTINO, R. (ed.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, Editora, 2012. 810 p.

ROSA, D. O.; OLIVEIRA-COSTA, J. Identificação I - Moscas Varejeiras (Diptera: Calliphoridae). *In*: OLIVEIRA-COSTA, J. (coord.). **Insetos "peritos": entomologia forense no Brasil**. 1. ed. Campinas: Millennium Editora, 2013. p. 63-70.

SALAZAR-SOUZA, M.; COURI, M. S.; AGUIAR, V. M. Chronology of the Intrapuparial Development of the Blowfly *Chrysomya albiceps* (Diptera: calliphoridae). **Journal Of Medical Entomology**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 825-832, 2018.

SEBASTIÃO, M. L. **Contribuição da Entomologia na Investigação Forense da Morte**: caracterização da fauna cadavérica do município de Viana, Luanda/Angola. 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.

SMITH, K. G. V. **A Manual of Forensic Entomology**. 1. ed. Londres: British Museum (Natural History), 1986. 205 p.

STORK, N. E. How Many Species of Insects and Other Terrestrial Arthropods Are There on Earth? **Annual Review Of Entomology**, [s. l.], v. 63, n. 1, p. 31-45, 2018.

THYSSEN, P. J. Entomologia Forense. *In*: MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011. p. 229-238.

TRIVIA, A. L. **Análise do efeito de quimioterápicos em *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

WALKER, K. ***Chrysomya megacephala* (Fabricius)**. 1990. 4 fotografias. Disponível em: <https://www.padil.gov.au/pests-and-diseases/pest/136218>. Acesso em 14 out. 2023.

WANG, Y.; GU, Z.; LI, L.; WANG, J. Gene expression during the intra-puparial stage of *Chrysomya megacephala*: implications for postmortem interval estimation. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 841-846, 2019.

WOLFF, J. **Sinantropia de Calliphoridae (Insecta: Diptera) no município de São José, SC**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; YANG, L.; TAO, L.; WANG, J. Development of *Chrysomya megacephala* at constant temperatures within its colony range in Yangtze River Delta region of China. **Forensic Sciences Research**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 74-82, 2017.

ZHANG, Z. Animal biodiversity: an introduction to higher-level classification and taxonomic richness. **Zootaxa**, [s. l.], v. 3148, n. 1, p. 7, 2011.

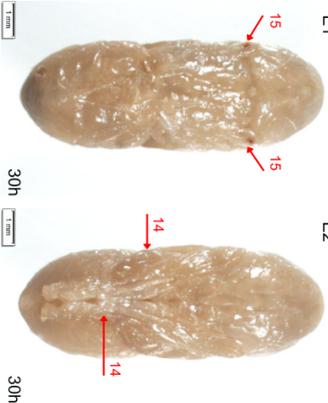
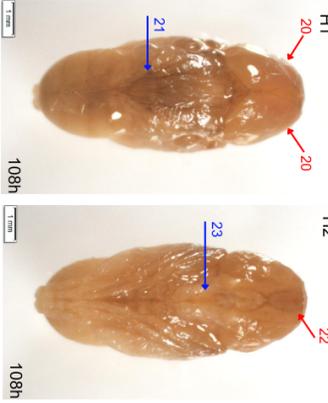
APÊNDICE A - GUIA DE IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DO PERÍODO INTRAPUPARIAL DE *Chrysomya megacephala*

(continua)

A: Pré-pupa 3h - 6h	B: Pupa criptocefálica inicial 9h - 15h	C: Pupa criptocefálica média 15h	D: Pupa criptocefálica tardia 18h - 42h
 	 	 	 
<p>(1) Corpo semelhante à larva, porém encurtado</p> <p>(2) Segmentos larvais bem evidentes</p> <p>(3) Esqueleto céfalo-faríngeo embutido na extremidade frontal</p>	<p>(4) Segmentos larvais discretos</p> <p>(5) Esqueleto céfalo-faríngeo internalizado, mas facilmente visível</p> <p>(6) Extremidade anterior retráida</p>	<p>(4), (5), (6), (8)</p> <p>(9) Apêndices torácicos curtos – comprimento inferior a 1/3 do corpo, ultrapassando o limite do segmento</p>	<p>(4)</p> <p>(10) Esqueleto céfalo-faríngeo bem internalizado, de difícil visualização</p> <p>(11) Apêndices torácicos médios – quase metade do corpo</p> <p>(12) Par de cornos respiratórios escurecidos</p>
<p>(7) Apêndices torácicos curtos – comprimento inferior a 1/3 do corpo, sem ultrapassar o limite do segmento</p> <p>(8) Par de cornos respiratórios claros na extremidade frontal</p>			

**APÊNDICE A - GUIA DE IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DO PERÍODO
INTRAPUPARIAL DE *Chrysomya megacephala***

(continuação)

E: Pupa fanerocefálica	F: Adulto farado AF1	G: Adulto farado AF2	H: Adulto farado AF3
<p>24h - 54h</p>  <p>E1 30h</p> <p>E2 30h</p> <p>(13) Corpo dividido em três tagmas (cabeça, tórax e abdômen), mas com má definição da segmentação</p> <p>(14) Apêndices torácicos comprimidos</p> <p>(15) Par de cornos respiratórios lateralizados</p> <p>(16) Aparelho bucal ainda pouco definido</p>	<p>36h - 78h</p>  <p>F1 54h</p> <p>F2 54h</p> <p>(14), (15), (16)</p> <p>(17) Corpo dividido em três tagmas e segmentação bem definida</p> <p>(18) Antenas visíveis, com contorno claro</p>	<p>72h - 108h</p>  <p>G1 96h</p> <p>G2 96h</p> <p>(14), (15), (16), (17), (18)</p> <p>(19) Olhos bem delimitados, ainda que incolores</p>	<p>102h - 114h</p>  <p>H1 108h</p> <p>H2 108h</p> <p>(14), (15), (17)</p> <p>(20) Olhos bem delimitados e parcialmente pigmentados, em tom rosado</p> <p>(21) Cerdas marrons sobre o tórax e/ou abdômen</p> <p>(22) Antenas nítidas, com contorno escuro</p> <p>(23) Peças bucais nítidas, com lábio amarelo</p>

**APÊNDICE A - GUIA DE IDENTIFICAÇÃO DAS FASES DO PERÍODO
INTRAPUPARIAL DE *Chrysomya megacephala***

(conclusão)

I: Adulto farado AF4	J: Adulto farado AF5	K: Adulto farado AF6	L: Adulto farado AF7
120h	126h - 138h	138h - 144h	132h - 156h
 I1 I2	 J1 J2	 K1 K2	 L1 L2
(14), (17), (22), (23)	(14), (17), (22), (24)	(14), (17), (22), (24), (28), (29), (30), (33)	(14), (17), (22), (24), (28), (29), (30), (33)
(24) Olhos bem delimitados e totalmente pigmentados	(28) Alta cobertura de cerdas pretas sobre o tórax e abdômen	(33) Lábio marrom escuro	(35) Aristas marrom escuro
(25) Média cobertura de cerdas pretas sobre o tórax e abdômen	(29) Asas com coloração cinza escura	(34) Arista marrom claro (pouco pigmentada)	
(26) Asas com coloração cinza clara	(30) Pernas totalmente pretas		
(27) Pernas parcialmente pretas, com extremidade marrom	(31) Lábio marrom claro		
	(32) Aristas incolores, mas com cerdas pretas		